

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 680**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2003 E 03759385 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 1542718**

54 Título: **Inhibidores derivados de péptidos de fusión contra la infección del VIH**

30 Prioridad:

24.09.2002 US 412797 P

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

08.02.2016

73 Titular/es:

**XIE, DONG (33.3%)
13944 Bromfield Road
Germantown, MD 20874, US;
JIANG, HE (33.3%) y
FRONTIER BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**XIE, DONG y
JIANG, HE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 558 680 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

Inhibidores derivados de péptidos de fusión contra la infección del VIH

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a derivados peptídicos en C-terminal de gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana (en lo sucesivo "VIH") que son inhibidores de la infección viral y/o exhiben propiedades antifusogénicas. En particular, la presente invención se refiere a derivados peptídicos que presentan una actividad inhibitoria contra el virus del VIH y el virus de la inmunodeficiencia en simios (en lo sucesivo "VIS"), con una solubilidad mejorada y duración prolongada de la acción para el tratamiento de las respectivas infecciones virales.

10 Análisis de la técnica relacionada

Los eventos de fusión de membranas son comunes en los procesos biológicos de células normales, y la fusión de membranas también se implica en una variedad de estadios de la enfermedad, incluyendo, por ejemplo, la entrada de virus envueltos en las células. Algunos virus envueltos se fusionan con las células diana mediante reacciones de unión específicas entre proteínas de la envoltura vírica y las proteínas de la superficie celular que desencadenan cambios conformacionales en proteínas virales asociadas que a su vez favorecen la fusión de la envoltura viral con la membrana celular.

El VIH, un virus con envoltura, es un miembro de la familia lentivirus de los retrovirus, y prevalecen dos tipos de VIH, VIH-1 y VIH-2, habiéndose identificado diversas cepas de cada uno de ellos. La fusión de VIH y sus células huésped se median por la unión de las proteínas de gp120 y gp41 de la envoltura viral, con la glicoproteína CD4 y un correceptor de quimiocina en la superficie celular. La unión de gp120 a CD4 en la superficie de los linfocitos T y a un correceptor (por ejemplo, CCR5 o CXCR4) continúa con la inserción de gp41 en la membrana de la célula diana; a continuación las hélices de la parte N-terminal de gp41 forman estructuras super-hélices con hélices de la parte C-terminal de la misma proteína, que junta al virus y a la célula para la fusión (Malashkevich, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 4 de agosto de 1998; 95(16):9134-9).

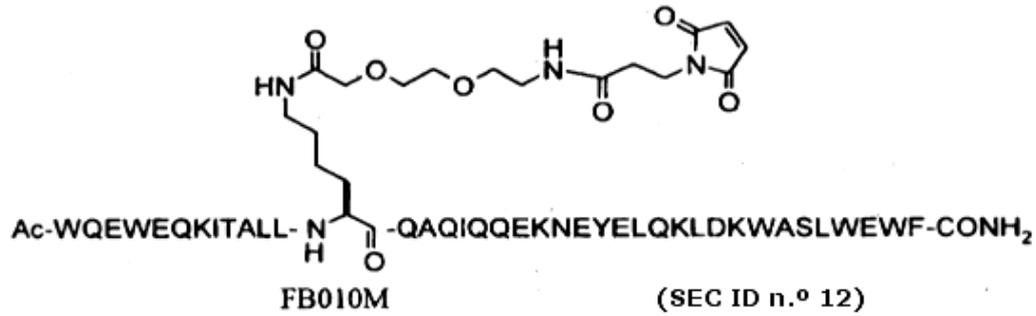
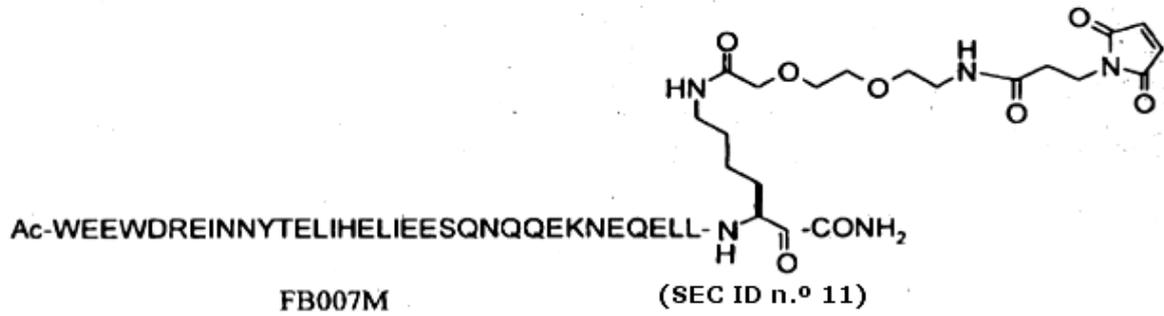
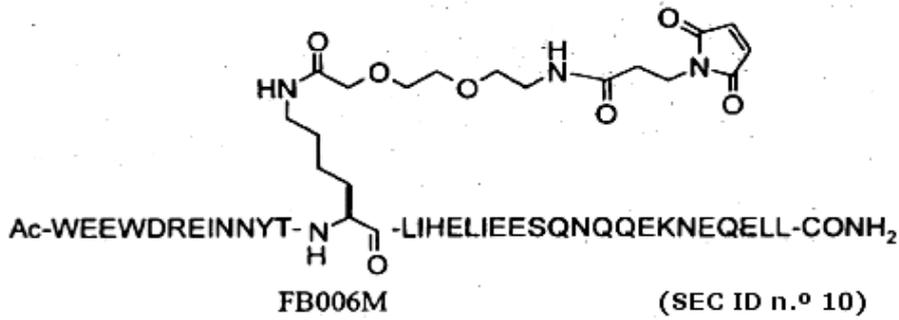
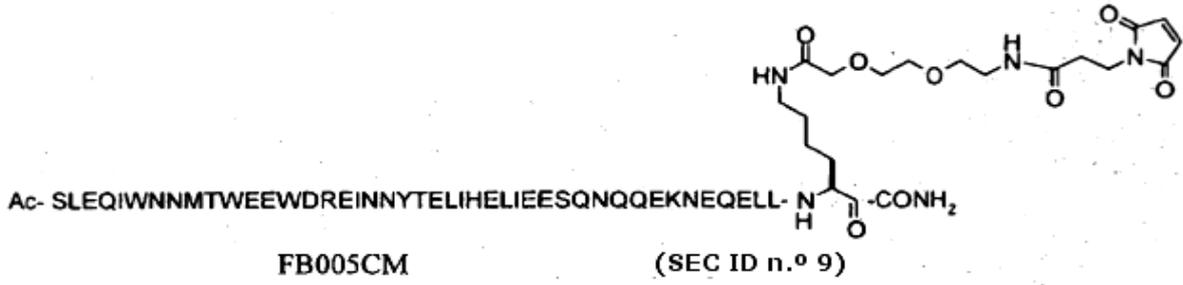
Los péptidos se conocen por inhibir o interrumpir eventos asociados a la fusión de membranas, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la transmisión retroviral a células no infectadas. Los péptidos de la segunda región de repetición heptavalente de la proteína de gp41 de la envoltura de VIH, incluyendo T20 (DP 178) y C34, han mostrado una actividad antiviral potente contra el VIH *in vitro* (véanse, Wild, y col., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 91:9770-4; Chan, y col., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 95:15613-15617). La actividad antiviral demostrada incluye la inhibición de la infección de células CD4⁺ por un virus libre y/o la inhibición de la formación de sincitios inducidos por VIH entre células CD4⁺ infectadas y no infectadas. Se considera que la inhibición se produce por la unión de estos péptidos a la primera región de repetición heptavalente en gp41, impidiendo así que la primera y segunda regiones de repetición heptavalentes formen la estructura fusogénica en horquilla.

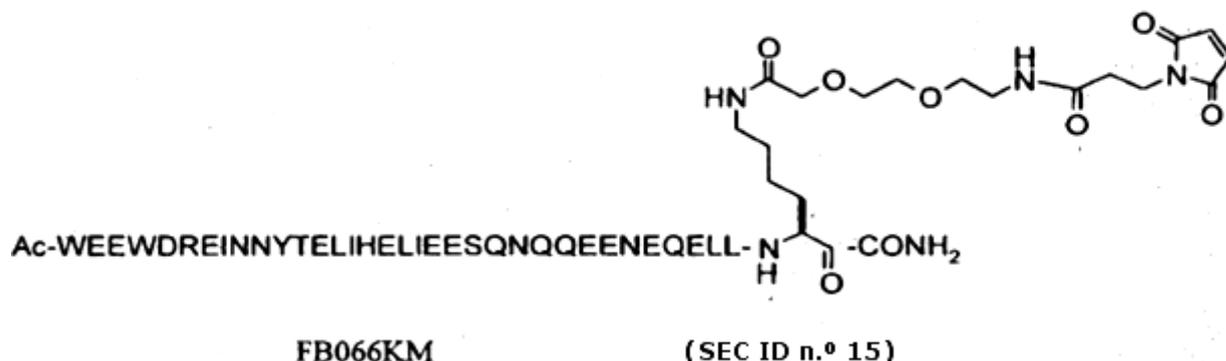
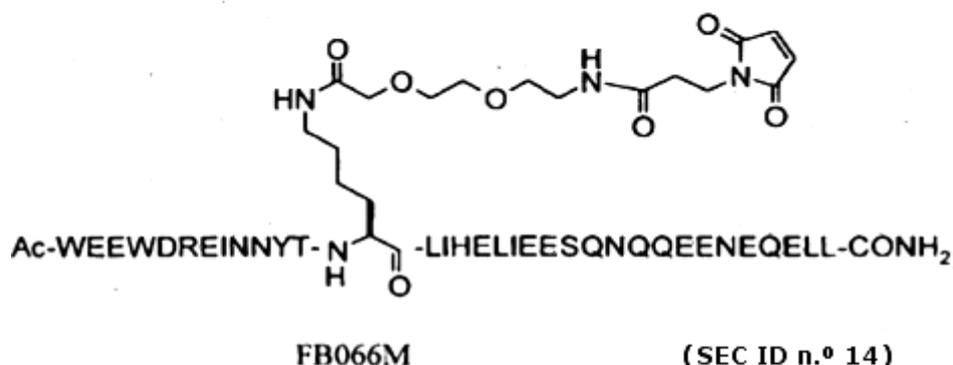
Los documentos WO0151673, WO9640191 y WO99596615 desvelan que los fragmentos peptídicos de gp41 de VIH tienen una actividad antiviral.

Aunque muchos de los péptidos antivirales y antifusogénicos descritos en la materia exhiben una actividad antiviral y/o antifusogénica potente *in vitro*, estos tienen una breve semivida *in vivo*, principalmente debido a la rápida depuración del suero, y a la actividad de peptidasas y proteasas. Esto, a su vez, reduce en gran medida su actividad antiviral eficaz. Por lo tanto, existe una necesidad de un procedimiento para prolongar la semivida de los péptidos *in vivo* sin que afecte sustancialmente a la actividad antifusogénica.

Se desvela en la Patente Estadounidense n.º 5.612.034 un procedimiento para prolongar la semivida de los péptidos, que describe un procedimiento para acoplar de forma covalente un péptido terapéutico a una proteína nativa hallada en el flujo sanguíneo. El péptido se modifica con un resto químicamente reactivo que puede reaccionar con funcionalidades presentes en las proteínas en el flujo sanguíneo. Tras la inyección del péptido modificado en el flujo sanguíneo, se une a un componente sanguíneo de larga vida formando un depósito de larga vida del péptido. Sin embargo, puesto que el peso molecular de las proteínas en el flujo sanguíneo oscila entre 50-600 kD, existe la preocupación de que la actividad biológica de tales péptidos unidos puede verse comprometida por el impedimento estérico de la proteína de tamaño mucho mayor.

Se desvela en la Publicación de la Patente Internacional WO 00/69902 un intento por prolongar la semivida de un péptido antifusogénico conocido (en lo sucesivo "la publicación '902") de ConjuChem, Inc. En la presente divulgación, DP178 se modifica al unir ácido 3-maleimidopropiónico mediante un enlace amida al grupo amino épsilon de lisina, que, a su vez, se une mediante un enlace peptídico a Phe C-terminal de DP178. La publicación '902 propone también análogos de DP178 modificado que o bien son truncamientos de DP178 o fragmentos correspondientes de gp41 de otros aislados virales de VIH. La publicación '902 no sugiere ningún otro criterio de diseño para péptidos antifusogénicos.





La presente invención proporciona nuevas composiciones, que contienen péptidos que tienen una modificación de
 5 residuos predeterminados (es decir, mutaciones puntuales) con relación al péptido nativo que se introduce para
 mejorar la actividad y la solubilidad. Los residuos predeterminados consisten en los restos de aminoácidos
 subrayados de las secuencias peptídicas proporcionadas en la tabla 3. Los péptidos con residuos modificados
 incluyen restos de aminoácidos sustituidos en los que los restos de aminoácidos que tienen cualquiera de las
 propiedades de aumento hidrófilo o hidrofobicidad se sustituyen con restos de aminoácidos nativos. Los péptidos
 variantes de gp41 también pueden sustituirse con restos de aminoácidos que tienen elevadas tendencias para
 10 formar hélices alfa. Alternativamente, los péptidos que tienen residuos modificados incluyen restos de aminoácidos
 derivatizados en los que se conjuga un grupo de acoplamiento a un resto de aminoácido predeterminado,
 permitiendo así el enlace covalente del péptido derivatizado a un componente sanguíneo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los derivados de
 las fórmulas previas en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones son
 útiles para inhibir la actividad de VIH (incluyendo VIH-1, VIH-2 y todos sus serotipos) y VIS.

15 En una realización adicional de la presente invención, se proporcionan los derivados de la función previa para su uso
 en la inhibición de la infección de VIH o VIS. El uso comprende administrar a un sujeto, preferentemente un
 mamífero, y más preferentemente un ser humano, una cantidad eficaz para inhibir un virus de uno o más péptidos
 variantes de gp41, solo o en combinación con un transportador farmacéutico, o en combinación con otros agentes
 antivirales incluyendo otros péptidos variantes de gp41. En una realización particularmente preferente de la
 20 invención, se puede administrar al menos uno de los péptidos variantes de gp41, solo o en combinación con un

transportador farmacéutico, o en combinación con otros agentes antivirales incluyendo otros péptidos variantes de gp41, a un sujeto en una cantidad para inhibir al virus.

- 5 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un conjugado que comprende al menos uno de los péptidos variantes de gp41 unidos covalentemente a un componente sanguíneo. En una realización de la invención, los componentes sanguíneos preferentes para la reacción con los compuestos de la presente invención incluyen proteínas tales como inmunoglobulinas, incluyendo IgG e Igm, seroalbúmina, ferritina, proteínas de unión a esteroides, transferrina, proteína de unión a tiroxina, y α -2-macroglobulina, en una realización más preferente seroalbúmina e IgG, y seroalbúmina en una realización más preferente de la invención.

Breve descripción de los dibujos

- 10 Figura 1 -- La Figura 1 muestra las secuencias alineadas de diversos péptidos desvelados en la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Como se utiliza en el presente documento, "derivatización" significará la adición de grupos de acoplamiento a las secuencias peptídicas. A continuación, se proporcionan de forma particular los grupos de acoplamiento representativos.

- 15 Como se utiliza en el presente documento, "modificación" significará la sustitución de un primer aminoácido en una secuencia peptídica nativa con un segundo aminoácido. El segundo aminoácido puede seleccionarse entre el grupo no limitante de ácidos hidrófilos, aminoácidos hidrofóbos, aminoácidos que tienen tendencias helicoidales, aminoácidos de origen no natural y D-isómeros de L-aminoácidos de origen natural.

- 20 La fusión del VIH-1 y los lentivirus relacionados con las células diana pueden inhibirse por fragmentos peptídicos de las proteínas de la envoltura viral nativas que cumplen la fusión. Estos fragmentos peptídicos se pueden unir a las proteínas de la envoltura y bloquear la unión de las partes distales de las proteínas de la envoltura viral, inhibiendo así los cambios conformacionales en la proteína nativa que son críticos para efectuar la fusión de VIH-1 a las células diana. Estos péptidos, al bloquear la fusión del virus con las células, interrumpen el proceso infeccioso necesario para la progresión de la enfermedad.

- 25 La presente invención mejora las propiedades de péptidos antivirales y antifusogénicos existentes y proporciona composiciones peptídicas novedosas útiles para tratar VIH y VIS. Los virus que pueden inhibirse mediante los péptidos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, retrovirus humano de VIH (incluyendo VIH-1 y VIH-2, así como todos sus otros serotipos) y VIS.

Péptidos modificados

- 30 Según la presente invención, pueden prepararse péptidos modificados derivatizados con actividad antifusogénica contra los lentivirus. Los péptidos antifusogénicos son péptidos que forman hélices en base a una secuencia de la proteína de gp41 nativa, que se modifican mediante el cambio de aminoácidos seleccionados entre los péptidos. Los aminoácidos modificados se seleccionan para evitar interrumpir las interacciones que contribuyen a la formación de complejos de super-hélice con hélices de la proteína de gp41 de la envoltura viral. En una realización, los restos de aminoácidos seleccionados para la modificación son aquellos cuyas cadenas laterales se alejan de la interfaz de super-hélice. Estos residuos se sustituyen con residuos alternativos que potenciarán cualquiera de las propiedades hidrófobas o hidrófilas de los péptidos, o de manera alternativa, se derivatizan para proporcionar restos reactivos que permiten el enlace covalente de los péptidos a proteínas sanguíneas circulantes. La introducción de residuos hidrófilos en una secuencia peptídica aumentará la solubilidad del péptido. La introducción de residuos hidrofóbos en una secuencia peptídica disminuirá la solubilidad del péptido. En una realización de la invención, los péptidos modificados incluyen los péptidos designados FB005, FB006 y FB066, y en especial los derivados de estos péptidos con restos de acoplamiento de maleimida, tales como ácido 3-maleimidopropiónico acoplado a lisina a través del ácido [2-(2-amino-etoxi)etoxi] acético, u otras estructuras de acoplamiento equivalentes. En otra realización de la invención, los aminoácidos en la secuencia peptídica se sustituyen con aminoácidos que tienen una tendencia a formar hélices alfa.

- De manera alternativa, los grupos químicos pueden añadirse a sus extremos terminales amino y/o carboxi, de manera tal que por ejemplo, se potencia la estabilidad, la reactividad y/o la solubilidad de los péptidos. Por ejemplo, se pueden añadir grupos hidrofóbos tales como grupos carbobenzoxilo, dansilo, acetilo o t-butiloxicarbonilo, a los extremos terminales amino de los péptidos. Asimismo, un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo puede situarse en los extremos terminales amino de los péptidos. Adicionalmente, puede añadirse el grupo hidrófobo, t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido a los extremos terminales carboxi de los péptidos. Del mismo modo, se puede situar un grupo éster de para-nitrobenzilo en los extremos terminales carboxi de los péptidos. Las técnicas para introducir tales modificaciones se conocen bien por los expertos en la materia.

- 55 Los péptidos pueden sintetizarse de manera que se altere su configuración estérica. Por ejemplo, se puede utilizar el D-isómero de uno o más de los restos de aminoácidos del péptido, en lugar del L-isómero habitual. En una realización de la invención, al menos dos o más sustituciones de aminoácidos comprenden D-isómeros de los L-

aminoácidos de origen natural. En otra realización de la invención, cada uno de los L-aminoácidos de origen natural en la secuencia peptídica completa se sustituye con un D-isómero del mismo aminoácido. La invención también contempla que al menos uno de los restos de aminoácidos de los péptidos variantes de gp41 pueda sustituirse con uno de los restos de aminoácidos no naturales bien conocidos. En otra realización de la invención, cualquier combinación de sustituciones de los D-isómeros de los L-aminoácidos de origen natural, o aminoácidos de origen no natural, se puede fabricar en los péptidos variantes de gp41. Alteraciones como estas pueden servir para aumentar la estabilidad, la resistencia a proteasas, la actividad, la reactividad y/o la solubilidad de los péptidos variantes de gp41.

Los aminoácidos de origen no natural se conocen bien en la materia. Además, se conocen bien en la materia los procedimientos de síntesis de péptidos que tienen o bien D-isómeros de los L-aminoácidos de origen natural o aminoácidos de origen no natural (véanse, por ejemplo, las divulgaciones de las Patentes Estadounidenses n.º 5.840.697 y 6.268.479, así como *Biochemistry* (Cap. 4), D. Voet y J.G. Voet, Wiley & Sons (1990).

En una realización de la invención, los péptidos modificados incluyen los péptidos designados FB005, FB006 y FB066, y en especial los derivados de estos péptidos con restos de acoplamiento de maleimida, tales como ácido 3-maleimidopropiónico acoplado a lisina a través del ácido [2-(2-amino-etoxi) etoxi] acético, u otras estructuras de acoplamiento equivalentes.

La invención abarca además péptidos variantes de gp41 en los que sus restos de aminoácidos se sustituyen con residuos hidrófilos o hidrófobos, alterando así las características acuosas de los péptidos. Alternativamente, se derivatizan otros restos de aminoácidos de los péptidos variantes de gp41 con un resto de unión a maleimida. En una realización preferente de la invención, se sustituyen los restos de aminoácidos subrayados en los siguientes péptidos variantes de gp41 (presentados en la tabla 3) con residuos hidrófilos o hidrófobos, o alternativamente se derivatizan con un resto de unión a maleimida. Cualquier otro péptido abarcado en la presente invención que tiene un residuo de lisina C-terminal también puede presentar un residuo de lisina C-terminal sustituido con residuos hidrófilos, o alternativamente derivatizado con un resto de unión a maleimida:

Tabla 3

SLEQIWNNMTWEEWDREINNYTELIELIEESQNQQEKNEQELL	(SEC ID N° 1)
WEEWDREINNYTKLIELIEESQNQQEKNEQELL	(SEC ID N° 2)
WEEWDREINNYTKLIELIEESQNQQEENEQELL	(SEC ID N° 7)
SLEQIWNNMTWEEWDREINNYTXLIELIEESQNQQEKNEQELL	(SEC ID N° 8)
SLEQIWNNMTWEEWDREINNYTELIELIEESQNQQEKNEQELLX	(SEC ID N° 9)
WEEWDREINNYTXLIELIEESQNQQEKNEWELL	(SEC ID N° 10)
WEEWDREINNYTELIELIEESQNQQEKNEQELLX	(SEC ID N° 11)
WQEWEQKITALLXQAQIQQEKNEYELQKLDKWA SL WEWF	(SEC ID N° 12)
WQEWEQKITALIEQAQIQQEKNEYELQKLDKWA SL WEWFX	(SEC ID N° 13)

Los aminoácidos hidrófilos que pueden sustituirse con cualquiera de los aminoácidos subrayados incluyen aquellos aminoácidos enumerados en la tabla 4.

Los aminoácidos hidrófobos que pueden sustituirse con cualquiera de los aminoácidos subrayados incluyen aquellos aminoácidos enumerados en la tabla 5.

Adicionalmente, pueden derivatizarse cualquiera de los restos de aminoácidos subrayados presentados en la tabla 3 con un resto de unión a maleimida, proporcionando así el resto de aminoácido con el que el(los) péptido(s) variante(s) de gp41 puede(n) unirse covalentemente al(los) grupo(s) tiol disponible(s) presente(s) en los componentes sanguíneos. En una realización preferente de la invención, los residuos de lisina se derivatizan con un resto de unión a maleimida. En una realización particularmente preferente de la invención, el(los) residuo(s) de lisina derivatizado(s) con un resto de unión a maleimida se une(n) covalentemente a un grupo(s) tiol presente(s) en un componente sanguíneo.

En otra realización de la invención, cualquiera de los restos de aminoácidos subrayados presentados en la tabla 3 pueden sustituirse con aminoácidos que presentan una elevada tendencia helicoidal (véase, Creamer, T., y col., *Alpha-helix-forming propensities in peptides and proteins. Proteins*, jun; 19(2):85-97 (1994)). Los aminoácidos con elevada tendencia helicoidal se enumeran en la tabla 6 en orden descendente de tendencia α -helicoidal. Se considera que debido a la conformación activa de estos péptidos al ser alfa helicoidales cuando se unen a la diana viral de gp41, el incremento en las tendencias para formar hélices puede aumentar potencialmente la actividad antiviral.

Tabla 4-Aminoácidos hidrófilos

Aminoácido	Abreviatura
Arginina	Arg
Lisina	Lys
Acido aspártico	Asp
Ácido glutámico	Asn
Glutamina	Gln
Histidina	His
Serina	Ser
Treonina	Thr
Glicina	Gly

Tabla 5-Aminoácidos hidrófobos

Aminoácido	Abreviatura
Alanina	Ala
isoleucina	Ile
Leucina	Leu
Metionina	Met
Fenilalanina	Phe
Triptófano	Trp
Valina	Val
Tirosina	Tyr

5

Tabla 6-Aminoácidos con alta tendencia helicoidal¹

Aminoácido	Preferencia α-helicoidal
Ácido glutámico	1,59
Alanina	1,41
Leucina	1,34
Metionina	1,30
Glutamina	1,27
Lisina	1,23
Arginina	1,21
Fenilalanina	1,16
Isoleucina	1,09
Histidina	1,05
Triptófano	1,02
Acido aspártico	0,99
Valina	0,90
Treonina	0,76
Asparagina	0,76
Tirosina	0,74
Cisteína	0,66
Serina	0,57
Glicina	0,43

(continuación)

Aminoácido	Preferencia α -helicoidal
Prolina	0,34
Fuente: T.E Creighton, <i>Proteins: Structure and Molecular Properties</i> (2ª ed.), W.H. Freeman y Co., 1993.	

- 5 En términos generales, los péptidos de la invención son análogos C-34 que comprenden cinco heptavalentes de una hélice alfa de un complejo proteico super-hélice, los análogos preferentes que presentan grupos de acoplamiento a maleimida y los residuos más polares que la secuencia parental se sustituyeron en el residuo 2 de 7 del primer heptavalente, en el residuo 6 de 7 del segundo heptavalente, en el residuo 3 de 7 del tercer heptavalente y/o en el residuo 7 de 7 del cuarto heptavalente. En otra realización de la invención, los péptidos de la invención abarcan estos péptidos previamente mencionados, pero además incluyen 10 residuos adicionales de gp41 introducidos en el extremo N-terminal del péptido C-34.
- 10 El péptido FB006 se basa en el péptido C34 con el segundo y decimoséptimo residuos mutados en glutamato, y el decimotercer residuo mutado en lisina. Las posiciones de mutación se seleccionaron en base a la estructura cristalina del complejo N36/C34. El criterio de selección es que estos residuos no se implican en la unión a las hélices N36. Las mutaciones en el glutamato y la lisina tienen por objetivo mejorar la solubilidad y la tendencia helicoidal, que es la tendencia para formar una hélice en solución acuosa. Debido a que se considera que la conformación activa de C34 es helicoidal como en la estructura cristalina N36/C34, el aumento de la tendencia helicoidal, debería mejorar por consiguiente la actividad biológica. Los péptidos FB005, FB006, FB066, FB005M, FB005CM, FB006M, y FB007M también contienen estas sustituciones.
- 15 Los péptidos variantes de gp41 abarcan las secuencias peptídicas enumeradas en las tablas 1, 2 y 3, y en la Figura 1, así como sus formas modificadas y derivatizadas. El péptido FB005 se basa en el péptido FB006, aunque tiene 10 restos de aminoácidos adicionales situados en el extremo N-terminal en relación con otros péptidos variantes de gp41.
- 20 El péptido FB066 se basa en FB006. Se diferencia de FB006 en que alberga una única sustitución de aminoácidos, al cambiar la lisina en la posición 28 a un ácido glutámico. Este cambio deja al 13^{er} resto de aminoácido como el único residuo de lisina para funcionar como el sitio de conjugación. Este cambio simplifica significativamente la síntesis de los análogos con modificaciones de maleimida.
- 25 La invención también proporciona derivados en base a FB005, FB006, y T-1249 (véase el documento WO 01/03723) que pueden conjugarse con seroalbúmina para convertirse en inhibidores de larga duración. Los péptidos FB005M y FB005CM se basan en la secuencia FB005; los péptidos FB006M y FB007M se basan en la secuencia FB006; y los péptidos FB010M y FB010KM se basan en la secuencia T-1249.
- 30 El procedimiento de selección del sitio de unión en el péptido que permite la unión al transportador de proteína sanguínea es también novedoso. Los inventores descubrieron que la unión del péptido variante de gp41 a la albúmina a través de un residuo de lisina interno del péptido produce un conjugado con una mayor eficacia en un enlace C-terminal. La CI_{50} para FB006, FB006M y FB007M es 1,4, 3,9 y 9,1 nM, respectivamente (el valor CI_{50} es la concentración del fármaco para lograr la inhibición viral al 50 %, y el valor CT_{50} es la concentración del fármaco para lograr una citotoxicidad al 50 %). FB006 es el péptido nativo, FB006M es un complejo peptídico modificado que alberga un enlace de maleimida en el 13^{er} residuo, mientras que FB007M se une al extremo C-terminal. Cuando FB006M se une a la seroalbúmina, la cantidad requerida para el efecto antiviral aumenta 2,8 veces, mientras que uniéndose a la albúmina a través del enlace del extremo C-terminal de FB007M provoca que la CI_{50} aumente su valor en 6,5 veces. Aunque se anticipó unirse a una molécula transportadora para prolongar la $\frac{1}{2}$ vida del péptido, conceptualmente también se esperaba que la conjugación en la albúmina (una proteína de 66 kDa) bloqueara la actividad biológica de los péptidos proporcionando un impedimento estérico. Sin embargo, de manera inesperada, cuando los inventores prepararon los péptidos FB006M y los conjugaron en la albúmina, se descubrió que la actividad antiviral del complejo no se vio sensiblemente comprometida (solo aumentó 2,8 veces).
- 35 40 45 Los grupos de acoplamiento de la invención son grupos químicos que pueden formar un enlace covalente con una funcionalidad presente en un componente sanguíneo. Los grupos de acoplamiento son generalmente estables en un entorno acuoso. Las funcionalidades reactivas que se disponen en los componentes sanguíneos para el enlace covalente a los grupos de acoplamiento son principalmente grupos amino, grupos carboxilo y grupos tiol. En una realización de la invención, los grupos de acoplamiento incluyen dobles enlaces reactivos, grupos carboxi, fosforilo, o acilo convenientes, ya sea como un éster o un anhídrido mezclado, o un imidato, de ese modo pueden formar un enlace covalente con funcionalidades tales como grupos amino, grupos hidroxilo o grupos tiol en el sitio diana en proteínas móviles, en particular, en proteínas sanguíneas. Los grupos de acoplamiento de éster reactivos consisten en compuestos fenólicos, ésteres de tiol, ésteres alquílicos, o ésteres de fosfato. En una realización particularmente preferente de la invención, los grupos de acoplamiento consisten en grupos succinimidilo o maleimido.
- 50 55 El enfoque de la presente invención es modificar las secuencias peptídicas de gp41 para conferir una biodisponibilidad mejorada, una semivida prolongada y una mejor distribución (mediante la conjugación selectiva del

péptido en un transportador proteico) en los péptidos sin modificar sustancialmente las propiedades antivirales, virostáticas o antifusogénicas de los péptidos. La derivatización de los péptidos variantes de gp41 como se describe en el presente documento permite que los péptidos derivatizados reaccionen con grupos en componentes sanguíneos (en particular grupos tiol disponibles) para formar enlaces covalentes estables. Los derivados preferentes de péptidos variantes de gp41 se conciben para reaccionar de forma específica con grupos tiol en proteínas sanguíneas móviles. Tal reacción se establece mediante el enlace covalente del péptido con un enlace de maleimida a un grupo tiol en una proteína sanguínea móvil tal como seroalbúmina o IgG. Por consiguiente, una forma de realización de la invención comprende un péptido modificado covalentemente unido a una proteína sanguínea, incluyendo una proteína sanguínea móvil. Una realización particularmente preferente de la invención implica la unión covalente del péptido modificado a seroalbúmina.

Los componentes sanguíneos, en los que los presentes derivados de péptidos variantes de gp41 se unen covalentemente, pueden ser fijos o móviles. Los componentes sanguíneos fijos son componentes sanguíneos no móviles e incluyen tejidos, receptores de membrana, proteínas intersticiales, proteínas de fibrina, colágenos, plaquetas, células endoteliales, células epiteliales y su membrana asociada y receptores membranosos, células corporales somáticas, células musculares lisas y esqueléticas, componentes neuronales, osteocitos y osteoclastos, y todos los tejidos corporales, especialmente aquellos asociados con los sistemas circulatorio y linfático. Los componentes sanguíneos móviles son componentes sanguíneos que no tienen un situs fijo durante un periodo prolongado de tiempo, generalmente no superior a 5 minutos, y más usualmente un minuto. Estos componentes sanguíneos no se asocian a la membrana y se presentan en la sangre durante periodos de tiempo prolongados en una concentración mínima de al menos 0,1 µg/ml. Los componentes sanguíneos móviles incluyen seroalbúmina, transferrina, ferritina e inmunoglobulinas tales como IgM e IgG. La semivida de los componentes sanguíneos móviles es al menos aproximadamente 12 horas. Un transportador elegido para la presente invención es albúmina conjugada a través de su tiol libre.

En otra realización de la invención se proporciona un procedimiento para generar inhibidores de la fusión del péptido que tienen actividad antiviral, antivirostática o fusogénica para prevenir o tratar la infección por virus, incluyendo retrovirus. Según el procedimiento, se identifican las proteínas virales implicadas en la entrada viral en una célula y/o que presentan actividad fusogénica. Se considera que las secuencias de aminoácidos de dichas proteínas virales que se exploran en las regiones que forman la hélice alfa se implican en la asociación proteína-proteína. Un experto en la materia puede utilizar algoritmos basados en ordenador para explorar las regiones que forman la hélice alfa de las secuencias proteicas. Los algoritmos basados en ordenador útiles para identificar las regiones que forman la hélice alfa incluyen, pero no se limitan a, algoritmos Garnier-Robson y Chou-Fasman de preferencia helicoidal, disponibles en paquetes de programas como DNASTAR.

Los péptidos, obtenidos a partir de las regiones que forman la hélice alfa de las proteínas virales, se pueden concebir según los procedimientos que se han desvelado previamente mediante la sustitución de restos de aminoácidos predeterminados con los restos de aminoácidos que potencian la hidrofiliidad, hidrofobicidad o las tendencias que forman la hélice alfa de la secuencia peptídica. Alternativamente, las sustituciones que utilizan D-isómeros de los L-aminoácidos de origen natural o aminoácidos de origen no natural se pueden fabricar en los péptidos de la invención. En una realización de la invención, al menos dos o más sustituciones de aminoácidos comprenden D-isómeros de los L-aminoácidos de origen natural. En otra realización de la invención, la secuencia peptídica completa comprende D-isómeros de los L-aminoácidos de origen natural. Alteraciones tales como estas pueden servir para aumentar la estabilidad, la resistencia a proteasas, la actividad, la reactividad y/o la solubilidad de los péptidos de la invención.

Las formas derivatizadas de estos péptidos son útiles como tratamientos con semivida prolongada una vez conjugados en componentes sanguíneos tales como, por ejemplo, seroalbúmina. Se espera que las secuencias peptídicas que comprenden D-isómeros de los L-aminoácidos de origen natural demuestren una mayor resistencia a la actividad de las proteasas de una manera proporcional al número de D-isómeros de los L-aminoácidos de origen natural presentes en la secuencia peptídica, independiente de si los péptidos se conjugan en componentes sanguíneos.

Se desvela además una prueba *in vitro* de las composiciones peptídicas para verificar la actividad antiviral, antivirostática o fusogénica. Por ejemplo, un experto en la materia podría modificar las enseñanzas del Ejemplo 9 en el presente documento de manera similar al constructo de un ensayo de exploraciones para la actividad antiviral. A modo de ejemplo no limitativo, un experto en la materia podría utilizar o modificar las enseñanzas del Ejemplo 9 para evaluar los efectos de los péptidos antivirales en presencia de un virus que tiene una especificidad para un tipo de célula, tal como por ejemplo, CMSP, con el fin de determinar los valores CI_{50} y CT_{50} . Tras la infección de un tipo de célula tanto en presencia como en ausencia de inhibidores peptídicos (con controles apropiados), y la incubación de dichas células, se determinan los títulos virales y se determinan los valores CI_{50} y CT_{50} .

Los virus a los que se aplica el presente procedimiento de la invención incluyen retrovirus humanos, incluidos, VIH-1, VIH-2, virus del linfocito T (HTLV-I y HTLV-II), y retrovirus no humanos, incluyendo virus de la leucosis bovina, virus del sarcoma felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), virus del sarcoma en simios, leucemia en simios y virus de la neumonía progresiva de ovejas. Los virus no retrovirales también pueden inhibirse mediante los péptidos antivirales, virostáticos o antifusogénicos, que incluyen, pero no se limitan a, virus

sincitial respiratorio humano (VSR), virus del moquillo canino, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la parainfluenza humana (VPIH), virus de la gripe, virus del sarampión, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis B y virus Mason-Pfizer en simios. Los virus no envueltos también pueden inhibirse mediante los péptidos de la invención, incluyendo picornavirus tales como virus de la polio, virus de hepatitis A, enterovirus, ecovirus, virus Cocksackie, papovavirus tales como virus del papiloma, parvovirus, adenovirus y reovirus.

Síntesis peptídica

Los péptidos variantes de gp41 derivatizados se pueden sintetizar por procedimientos convencionales de la química de péptidos en fase sólida bien conocidos por uno cualquiera de los expertos en la materia. Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse mediante las técnicas químicas en fase sólida siguiendo los procedimientos descritos en Stewart y col. en *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Ed., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984), utilizando un sintetizador Rainin PTI Symphony. Alternativamente, los fragmentos peptídicos pueden sintetizarse y posteriormente combinarse o unirse entre sí para formar las secuencias peptídicas de gp41 en solución (condensación de segmentos, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente Estadounidense n.º 6.281.331.

Para la síntesis de péptidos en fase sólida, se puede hallar un sumario de las numerosas técnicas en Stewart y col. en *Solid Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 y Meienhofer, *Hormonal Proteins and Peptides*, 1973, 2 46. Para la síntesis clásica en solución, véase por ejemplo Schroder y col. en *The Peptides*, volumen 1, Academic Press (Nueva York). En general, tales procedimientos comprenden la adición secuencial de uno o más aminoácidos o aminoácidos apropiadamente protegidos en una cadena peptídica en crecimiento en un polímero. Normalmente, el grupo amino o carboxilo del primer aminoácido se protege con un grupo protector adecuado. El aminoácido protegido y/o derivatizado se une entonces a un soporte sólido inerte o se utiliza en solución añadiendo el aminoácido siguiente a la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) apropiadamente protegido y en las condiciones adecuadas para la formación del enlace de amida. Se elimina entonces el grupo protector de este resto de aminoácido recién añadido y se añade el siguiente aminoácido (adecuadamente protegido).

Después de que se hayan unido todos los aminoácidos deseados en la secuencia apropiada, cualquier grupo protector restante (y cualquier soporte sólido) se escinde secuencial o simultáneamente para proporcionar el péptido final. Mediante la simple modificación del presente procedimiento general, es posible añadir más de un aminoácido a la vez a una cadena en crecimiento, por ejemplo, por acoplamiento (en condiciones que no racemicen los centros quirales) de un tripéptido protegido con un dipéptido apropiadamente protegido para formar, después de la desprotección, un pentapéptido. Los grupos protectores pueden ser necesarios durante el procedimiento de síntesis del presente derivado peptídico. Estos grupos protectores son convencionales en el campo de la síntesis de péptidos, y generalmente pueden describirse como restos químicos capaces de proteger al derivado peptídico frente a reacciones con otros grupos funcionales. Se disponen comercialmente diversos grupos protectores, y ejemplos de los mismos pueden hallarse en la Patente Estadounidense n.º 5.493.007. Los ejemplos de grupos protectores típicos adecuados incluyen acetilo, fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), t-butiloxycarbonilo (BOC), benciloxycarbonilo (CBZ). Además, la tabla 7 proporciona las abreviaturas tanto de tres letras como de una letra de los aminoácidos de origen natural.

Tabla 7: Aminoácidos de origen natural y sus abreviaturas

Nombre	Abreviatura de 3 letras	Abreviatura de 1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P

(continuación)

Nombre	Abreviatura de 3 letras	Abreviatura de 1 letra
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Un procedimiento particularmente preferente de preparación de péptidos variantes de gp41 implica la síntesis de péptidos en fase sólida en la que el aminoácido α -N-terminal se protege con un ácido o grupo sensible de base. Tales grupos protectores deben tener la propiedad de ser estables a las condiciones de formación de enlace peptídico al mismo tiempo que han de eliminarse fácilmente sin destruir la cadena peptídica en crecimiento o racemización de cualquiera de los centros quirales contenidos en ellos. Los ejemplos de grupos protectores N y los grupos protectores de carboxi se desvelan en Greene, *"Protective Groups in Organic Synthesis"*, (John Wiley & Sons, Nueva York págs. 152-186 (1981)). Los ejemplos de grupos protectores N comprenden grupos alcanilo inferior tales como formilo, acetilo ("Ac"), propionilo, pivaloilo, t-butilacetilo y similares; otros grupos acilo incluyen 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, o-nitrofenoxiacetilo, -clorobutirilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, 4-nitrobenzoilo y similares; grupos sulfonilo tales como benzenosulfonilo, p-toluenosulfonilo, o-nitrofenilsulfonilo, y 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (pmc); grupos que forman carbamato tales como t-amiloxicarbonilo, benciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 2,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 4-etoxibenciloxicarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,4,5-trimetoxibenciloxicarbonilo, 1-(p-bifenilil)-1-metiletoxibenciloxicarbonilo, α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, benzhidriloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo (boc), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, aliloxicarbonilo (Aloc), 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, fenoxicarbonilo, 4-nitrofenoxicarbonilo, fluorenil-9-metoxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo y similares; grupos arilalquilo tales como bencilo, bifenilisopropiloxicarbonilo, trifenilmetilo, benciloximetilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y grupos sililo tales como trimetilsililo. Los grupos α -N protectores preferentes son grupos o-nitrofenilsulfenilo; 9-fluorenilmetiloxicarbonilo; t-butiloxicarbonilo (boc), isoborniloxicarbonilo; 3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo; t-amiloxicarbonilo; 2-ciano-t-butiloxicarbonilo, siendo el 9-fluorenil-metiloxicarbonilo (Fmoc), aún más preferente, mientras que los grupos protectores N de cadena lateral comprenden 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (pmc), nitro, p-toluenosulfonilo, 4-metoxibenceno-sulfonilo, Cbz, Boc y adamantiloxicarbonilo para los grupos amino de cadena lateral como en lisina y arginina; Aloc para lisina; bencilo, o-bromobenciloxicarbonilo, 2,6-diclorobencilo, isopropilo, t-butilo (t-Bu), ciclohexilo, ciclopentilo y acetilo (Ac) para tirosina; t-butilo, bencilo y tetrahidropiranilo para serina; tritilo, bencilo, Cbz, p-toluenosulfonilo y 2,4-dinitrofenilo para histidina; formilo para triptófano; bencilo y t-butilo para ácido aspártico y ácido glutámico; y trifenilmetilo (tritilo) para cisteína.

Un grupo protector carboxi se refiere convencionalmente a un éster protector de ácido carboxílico o grupo amida. Tales grupos protectores carboxi se conocen bien por los expertos en la materia, habiéndose utilizado ampliamente en la protección de grupos carboxilo en los campos de penicilina y cefalosporina como se describe en las Patentes Estadounidenses n.º 3.840.556 y 3.719.667.

Los grupos protectores carboxi representativos comprenden alquilo inferior C1-C8; arilalquilo tal como fenetilo o bencilo y sus derivados sustituidos tales como grupos alcoxibencilo o nitrobencilo; arilalqueno tal como feniletlenilo; arilo y sus derivados sustituidos tales como 5-indanilo; dialquilaminoalquilo tal como dimetilaminoetilo; grupos alcaniloxialquilo tales como acetoximetilo, butiriloximetilo, valeriloximetilo, isobutiriloximetilo, isovaleriloximetilo, 1-(propioniloxi)-1-etilo, 1-(pivaloiloxil)-1-etilo, 1-metil-1-(propioniloxi)-1-etilo, pivaloiloximetilo, propioniloximetilo; grupos cicloalcaniloxialquilo tales como ciclopropilcarboniloximetilo, ciclobutilcarboniloximetilo, ciclopentilcarboniloximetilo, ciclohexilcarboniloxi-metilo; ariloxialquilo tal como benzoiloximetilo, benzoiloxietilo; arilalquilcarboniloxialquilo tal como bencilcarboniloximetilo, 2-bencilcarboniloxietilo; alcocarbonilalquilo o cicloalquiloxicarbonilalquilo tal como metoxicarbonilmetilo, ciclohexiloxicarbonilmetilo, 1-metoxicarbonil-1-etilo; alcocarboniloxialquilo o cicloalquilxicarboniloxialquilo tal como metoxicarboniloximetilo, t-butiloxicarboniloximetilo, 1-etoxicarboniloxi-1-etilo, 1-ciclohexiloxicarboniloxi-1-etilo; ariloxi-carboniloxialquilo tal como 2-(fenoxicarboniloxi)etilo, 2-(5-indaniloxicarboniloxi)-etilo; alcocarboniloxialquilo tal como 2-(1-metoxi-2-metilpropan-2-oloxi)-etilo; arilalquiloxicarboniloxialquilo tal como 2-(benciloxicarboniloxi)-etilo; arilalqueniloxicarboniloxialquilo tal como 2-(3-fenilpropen-2-iloxicarboniloxi)etilo; alcocarbonilaminoalquilo tal como t-butiloxicarbonilaminometilo; alquilaminocarbonilaminoalquilo tal como metilaminocarbonilaminometilo; alcanilaminoalquilo tal como acetilaminometilo; heterociclocarboniloxialquilo tal como 4-metilpiperazinilcarboniloximetilo; dialquilaminocarbonilalquilo tal como dimetilaminocarbonilmetilo, dietilaminocarbonilmetilo; (5-(alquilo inferior)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)alquilo tal como (5-t-butil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il) metilo; y (5-fenil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)alquilo tal como (5-fenil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo. Los grupos protectores carboxiamida representativos comprenden

grupos aminocarbonilo y alquiloaminocarbonil inferiores. De los grupos protectores carboxi previos, se prefieren alquilo inferior, éster de cicloalquilo o arilalquilo, por ejemplo, éster metílico, éster etílico, éster propílico, éster isopropílico, éster butílico, éster sec-butílico, éster isobutílico, éster amílico, éster isoamílico, éster octílico, éster ciclohexílico, éster feniletílico o un éster alcanoilalquílico, cicloalcanoilalquílico, aroilalquílico o arilalquilcarbonilalquílico. Los grupos protectores carboxiamida preferentes son los grupos alquilaminocarbonil inferiores.

En el procedimiento de síntesis en fase sólida de los péptidos, el aminoácido α -C-terminal se une a un soporte sólido o resina adecuado. Los soportes sólidos adecuados útiles para la síntesis previa son aquellos materiales inertes a los reactivos y condiciones de reacción de las reacciones de condensación-desprotección escalonadas, así como insolubles en los medios utilizados. El soporte sólido preferente para la síntesis de péptidos carboxi α -C-terminal es la resina 4-hidroximetilfenoxiacetil-4'-metilbenzihidrilamina (resina HMP). El soporte sólido preferente para los péptidos amida α -C-terminal es una resina Ramage protegida por Fmoc, fabricada y vendida por Bachem Inc., California.

En síntesis preferentes, la unión a lisina se protege por Alloc. Después de que se haya completado la síntesis, el Alloc se escinde con $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ mientras que el péptido se encuentra aún en la resina, y permite el acoplamiento de la molécula enlazadora y el grupo maleimido. Específicamente, el enlazador es ácido [2-(2-amino)etoxi] acético, y el grupo maleimido es ácido 3'-maleimidopropiónico. Después de la modificación, los grupos Fmoc se eliminan y el péptido se escinde de la resina.

Al final de la síntesis en fase sólida, el péptido se separa de la resina y se desprotege, ya sea en operaciones sucesivas o en una única operación. La eliminación del péptido y la desprotección pueden llevarse a cabo convencionalmente en una única operación tratando el polipéptido unido a la resina con un reactivo de escisión que comprende tioanisol, triisopropilo silano, fenol y ácido trifluoroacético. En casos en los que el α -C-terminal del péptido es una alquilamida, la resina se escinde por aminólisis con una alquilamina. Alternativamente, el péptido puede eliminarse por transesterificación, por ejemplo con metanol, seguido de aminólisis o por transamidación directa. El péptido protegido puede purificarse en este punto o llevarse directamente a la siguiente etapa. La eliminación de los grupos protectores de cadena lateral se consigue utilizando la mezcla de escisión que se ha descrito previamente. El péptido completamente desprotegido se puede purificar mediante una secuencia de etapas cromatográficas empleando todos o cualquiera de los siguientes tipos: intercambio iónico en una resina ligeramente básica (forma de acetato); cromatografía de adsorción hidrófoba en poliestireno-divinilbenceno no derivatizado (tal como Amberlite XAD); cromatografía de adsorción de gel de sílice; cromatografía de intercambio iónico en carboximetilcelulosa; cromatografía de partición, por ejemplo en Sephadex G-25, LH-20 o distribución en contracorriente; cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), especialmente HPLC en fase inversa en relleno de columna de fase unida a octilo- o fenilo/hexilsililo-sílice. El experto en la materia puede determinar las etapas o secuencias cromatográficas preferentes requeridas para obtener una purificación aceptable de los péptidos variantes de gp41.

Alternativamente, los fragmentos peptídicos, incluyendo la adición del grupo maleimido pueden sintetizarse en fase sólida y el péptido derivatizado final se puede obtener por acoplamiento de solución de estos fragmentos.

Los pesos moleculares de estos péptidos pueden determinarse utilizando espectrometría de masas de tipo electrospray o espectrometría de masas MALDI-TOF.

40 **Uso terapéutico de los péptidos modificados**

Los péptidos variantes de gp41, incluyendo los compuestos enumerados en las tablas 1, 2 y 3, inhiben la infección viral de las células, por ejemplo, mediante la inhibición de la fusión célula-célula o la infección de virus libre. La ruta de infección puede implicar la fusión de membranas, como ocurre en el caso de los virus envueltos o encapsulados, o algún otro evento de fusión que implica estructuras virales y celulares, tales como receptores celulares.

45 Los péptidos variantes de gp41 se pueden administrar *in vivo* de tal modo que la conjugación con componentes sanguíneos se produce *in vivo*, o pueden conjugarse en primer lugar con componentes sanguíneos *ex vivo* y el derivado conjugado resultante se administra *in vivo*. En otra realización de la invención, la plasmaféresis se utiliza para separar componentes sanguíneos deseados en la muestra sanguínea de un paciente, que luego se conjuga con los péptidos de la invención antes de administrarse de nuevo al paciente.

50 Los grupos tiol son menos abundantes *in vivo* que, por ejemplo, los grupos amino en las proteínas plasmáticas. El (los) péptido(s) variante(s) modificado(s) de gp41 con maleimida se unirá(n) covalentemente a unas pocas proteínas. Por ejemplo, en la albúmina (la proteína más abundante en la sangre) existe un grupo tiol. Por lo tanto, un conjugado de péptido-maleimida-albúmina de gp41 modificado tenderá a comprender aproximadamente una relación molar 1:1 del péptido de gp41 con respecto a la albúmina. Además de la albúmina, las moléculas de IgG (clase II) presentan también tioles libres. Dado que las moléculas de IgG y la seroalbúmina constituyen la mayoría de la proteína soluble en la sangre, constituyen también la mayoría de los grupos tiol libres disponibles en la sangre para unirse covalentemente a los péptidos variantes de gp41.

Además, incluso entre las proteínas sanguíneas que contienen tiol libre, incluyendo IgGs, el etiquetado específico con una maleimida conduce a la formación preferencial de un conjugado de péptido-maleimida-albúmina de gp41 modificado debido a las características únicas de la albúmina misma. El único grupo tiol libre de la albúmina, muy preservado entre las especies, se encuentra en el resto de aminoácido 34 (Cys34). Se ha demostrado recientemente que Cys34 de la albúmina ha incrementado la reactividad relativa frente a tioles libres en otras proteínas que contienen tiol libre. Esto se debe, en parte, al valor muy bajo de pK de 5,5 para Cys34 de la albúmina. Es mucho más bajo que los valores de pK típicos para los residuos de cisteína en general, que son típicamente aproximadamente 8. Debido a este bajo pK, en condiciones fisiológicas normales, Cys34 de la albúmina se encuentra predominantemente en forma ionizada, lo que incrementa dramáticamente su reactividad. Además del bajo valor de pK de Cys34, otro factor que potencia la reactividad de Cys34 es su ubicación, que se encuentra en un bolsillo hidrófobo próximo a la superficie de un bucle de la región V de la albúmina. Esta ubicación hace que Cys34 esté fácilmente disponible para los ligandos de todo tipo, y es un factor importante en la función biológica de Cys34 como captador del radical libre y depurador de tiol libre. Estas propiedades hacen que Cys34 sea altamente reactivo con péptidos de gp41 que albergan enlaces de maleimida, y la aceleración de la velocidad de reacción puede ser de hasta 1000 veces en relación con las velocidades de reacción de los péptidos variantes de gp41 con enlaces de maleimida con otras proteínas que contienen tiol libre.

Otra ventaja de los conjugados de péptido-maleimida-albúmina de gp41 modificados es la reproducibilidad asociada a la carga 1:1 de péptido con respecto a la albúmina, específicamente en Cys34. Otras técnicas, tales como glutaraldehído, DCC, EDC y otras activaciones químicas de, por ejemplo, aminas libres, carecen de esta selectividad. Por ejemplo, la albúmina contiene 52 residuos de lisina de los cuales 25-30 se ubican en la superficie de la albúmina y por consiguiente son accesibles para la conjugación. La activación de estos residuos de lisina, o de manera alternativa la modificación de péptidos variantes de gp41 para acoplarse a través de estos residuos de lisina, da lugar a una población heterogénea de conjugados. Incluso si se emplean las relaciones molares 1:1 de péptidos de maleimida gp41 con respecto a la albúmina, el rendimiento de la albúmina derivatizada de amina consistirá en múltiples productos de conjugación, conteniendo algunos 0, 1, 2 o más péptidos de gp41 por albúmina, y teniendo cada uno el péptido acoplado al azar en uno o más de los 25-30 sitios de lisina disponibles. Dadas las numerosas combinaciones posibles, la caracterización de la composición y naturaleza exactas de cada conjunto de conjugados resulta difícil, y la reproducibilidad de lote a lote resulta casi imposible, convirtiendo tales conjugados menos deseables como un agente terapéutico.

Adicionalmente, aunque pueda parecer que la conjugación a través de residuos de lisina de la albúmina tiene al menos la ventaja de administrar más agente terapéutico por molécula de albúmina, los estudios han demostrado que se prefiere una relación 1:1 de agente terapéutico con respecto a la albúmina. En el artículo de Stehle, y col, "The Loading Determines Tumor Targeting properties of Methotrexate-Albumin Conjugates in Rats", *Anti-Cancer Drugs*, Vol. 8, págs. 677-685 (1988), los autores informan que una relación 1:1 de metotrexato del fármaco contra el cáncer con respecto a la albúmina conjugado a través de glutaraldehído proporcionó los resultados más prometedores. Estos conjugados se recogen preferencialmente por las células tumorales, mientras que los conjugados que llevan moléculas de metotrexato al 5:1 a 20:1 habían alterado los perfiles de HPLC y se recogieron rápidamente por el hígado *in vivo*. Se plantea que en estas relaciones más altas, los cambios conformacionales en la albúmina disminuyen su eficacia como transportador terapéutico.

Mediante la administración controlada de los péptidos variantes de gp41 *in vivo*, puede controlarse el etiquetado específico de albúmina e IgG *in vivo*. En las administraciones típicas, el 80-90 % de los péptidos variantes de gp41 derivatizados administrados marcarán la albúmina y menos del 5 % marcará IgG. También se producirán trazas de etiquetado de tioles libres como el glutatión. Se prefiere este etiquetado específico para su uso *in vivo* ya que permite un cálculo preciso de la semivida estimada de los péptidos variantes de gp41.

Además de proporcionar el etiquetado *in vivo* específico controlado, los péptidos variantes derivatizados de gp41 pueden proporcionar el etiquetado específico de la seroalbúmina e IgG *ex vivo*. Este etiquetado *ex vivo* implica la adición de péptidos variantes de gp41 que albergan vínculos de maleimida a la sangre, suero o solución salina que contiene seroalbúmina y/o IgG. Una vez que se ha producido la conjugación *ex vivo* con los péptidos variantes de gp41, pueden administrarse de nuevo la sangre, el suero o la solución salina en la sangre del paciente para el tratamiento *in vivo*, o liofilizado.

Los péptidos variantes de gp41 se pueden utilizar solos o en combinación para optimizar sus efectos terapéuticos. En otra realización de la invención, los péptidos variantes de gp41 se coadministran con uno o más tratamientos antivirales adicionales de VIH. Los tratamientos para el VIH antivirales adicionales que se pueden coadministrar con los péptidos variantes de gp41 incluyen, pero no se limitan a, AGENERASE (amprenavir; GlaxoSmithKline); COMBIVIR (lamivudina, zidovudina; GlaxoSmithKline); CRIXIVAN (indinavir, IDV, MK-639; Merck); EMTRIVA (FTC, emtricitabina; Gilead Sciences); EPIVIR (lamivudina, 3TC; GlaxoSmithKline); FORTOVASE (saquinavir; Hoffmann-La Roche); HIVID (zalcitabina, ddC, didesoxicitudina; Hoffmann-La Roche); INVIRASE (mesilato de saquinavir, SQV, Hoffmann-La Roche); KALETRA (lopinavir, ritonavir, Abbott Laboratories); NORVIR (ritonavir, ABT-538; Abbott Laboratories); RESCRIPTOR (delaviridina, DLV; Pfizer); RETROVIR (zidovudina, AZT, azidotimidina, ZDV; GlaxoSmithKline); REYATAZ (sulfato de atazanavir, Bristol Myers-Squibb); SUSTIVA (efavirenz, Bristol Myers-Squibb); TRIZIVIR (abacavir, zidovudina, lamivudina, GlaxoSmithKline); VIDEX CE (didanosina recubierta entérica, Bristol Myers-Squibb); VIDEX (didanosina, ddl, didesoxiinosina; Bristol Myers-Squibb); VIRACEPT (mesilato de

nelfinavir, NFV; Agouron Pharmaceuticals); VIRAMUNE (nevirapina, BI-RG-587, Boehringer Ingelheim); VIREAD (tenofovir disoproxil fumarato; Gilead); ZERIT (estavudina, d4T, Bristol Myers-Squibb); ZIAGEN (abacavir, GlaxoSmithKline).

5 En una realización adicional de la invención, los péptidos variantes de gp41 se coadministran con uno o más compuestos adicionales utilizados para tratar el VIH o enfermedades inducidas por VIH. Estos compuestos adicionales que pueden coadministrarse con los péptidos variantes de gp41 incluyen TRIMETREXATO GLUCURONATO (para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis carinii*); GANCICLOVIR (para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus); PENTAMIDINA (para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis carinii*); ERITROPOYETINA (para el tratamiento de la anemia relacionada con Zidovudina); ATOVACUONA (para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis carinii*); RIFABUTINA (para el tratamiento de *Mycobacterium avium*); VISTIDE (para el tratamiento de las recaídas de la retinitis por citomegalovirus); y SEROSTIM (para el tratamiento de la emaciación relacionada con el SIDA).

15 Los péptidos variantes de gp41, incluyendo aquellos péptidos proporcionados en las tablas 1, 2 y 3, pueden coadministrarse con uno o más péptidos variantes de gp41 adicionales enumerados en las tablas 1, 2 y 3. En otra realización de la invención, los péptidos variantes de gp41, incluyen, pero no se limitan a, los péptidos proporcionados en las tablas 1, 2 y 3, pueden coadministrarse con péptidos T-20 o T-1249.

20 Los péptidos variantes de gp41 se administran en un medio fisiológicamente aceptable, por ejemplo agua desionizada, solución salina tamponada con fosfato (STF), solución salina, etanol acuoso u otro alcohol, plasma, soluciones proteínicas, manitol, glucosa acuosa, alcohol o aceite vegetal. Preferentemente, la composición farmacéutica que comprende los péptidos variantes de gp41 se administra con un transportador farmacéuticamente aceptable. Otros componentes que pueden añadirse incluyen tampones, en los que los medios generalmente se tamponan en un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a 10, en el que la concentración del tampón oscilará generalmente de aproximadamente 50 a 250 mM; sal, en la que la concentración de sal oscilará generalmente de aproximadamente 5 a 500 mM; y estabilizadores fisiológicamente aceptables. Las composiciones pueden liofilizarse para su conveniente almacenamiento y transporte.

25 Los péptidos variantes de gp41 pueden administrarse por vía oral, parenteral, tal como vía intravascular (IV), intraarterial (IA), intramuscular (IM), subcutánea (SC), o similares. La administración puede realizarse, si es apropiado, por transfusión. En algunos casos, cuando la reacción del grupo funcional es relativamente lenta, la administración puede ser oral, nasal, rectal, transdérmica o por aerosol, si la naturaleza del conjugado permite la transferencia al sistema vascular. Por lo general, se empleará una única inyección aunque puede utilizarse más de una inyección, si se desea. El derivado peptídico puede administrarse por cualquier medio conveniente, incluyendo jeringuillas, trocar o catéter. La forma particular de administración variará en función de la cantidad a administrar, ya sea un bolo único o administración continua. Preferentemente, la administración será intravascular, el sitio de introducción no es crítico para la presente invención, preferentemente en un sitio en el que el flujo sanguíneo sea rápido, por ejemplo, intravenosamente, por vena periférica o central. Otras vías pueden emplearse si la administración se asocia con técnicas de liberación retardada o a una matriz protectora. La intención es que los péptidos variantes de gp41 puedan administrarse con eficacia en la sangre, de manera que sean capaces de reaccionar con los componentes sanguíneos. La cantidad del conjugado administrado variará ampliamente, generalmente oscila de aproximadamente 1 mg a 500 mg. La totalidad administrada por vía intravascular se encontrará generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,5 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg, más usualmente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg.

30 Al unirse a los componentes de larga vida de la sangre, la inmunoglobulina, seroalbúmina, glóbulos rojos y plaquetas, se produce una serie de ventajas. La actividad de los péptidos variantes de gp41 se prolonga de días a semanas. Durante este periodo de tiempo solo se necesita una única administración. Se puede lograr una mayor especificidad, ya que el compuesto activo se une principalmente a moléculas grandes en las que es menos probable que se recojan intracelularmente e interfieran con otros procesos fisiológicos.

35 La formación del enlace covalente con el componente sanguíneo puede ocurrir *in vivo* o *ex vivo*. Para la formación del enlace covalente *ex vivo*, se añaden péptidos variantes de gp41 derivatizados al suero sanguíneo o a una solución salina que contiene componentes sanguíneos purificados, tales como seroalbúmina humana o IgG, para permitir la formación de enlaces covalentes entre el derivado y el componente sanguíneo. En una realización preferente, los péptidos variantes de gp41 se hacen reaccionar con seroalbúmina humana en una solución salina. Después de la formación del conjugado, este último puede administrarse al sujeto o liofilizarse.

40 Se puede monitorizar la actividad de la sangre del huésped mamífero y/o la presencia de los péptidos variantes de gp41. Tomando una muestra de sangre del huésped en distintos momentos, se puede determinar si los péptidos variantes de gp41 se han unido a los componentes sanguíneos de larga vida en una cantidad suficiente para ser terapéuticamente activos y, a continuación, se puede determinar el nivel de los péptidos variantes de gp41 en sangre. Si se desea, también se puede determinar a cuál de los componentes sanguíneos se han unido covalentemente los péptidos variantes de gp41. La monitorización también puede realizarse utilizando ensayos específicos para la actividad del péptido de gp41, HPLC-MS o anticuerpos dirigidos contra péptidos variantes de gp41.

60

Los péptidos variantes de gp41 pueden administrarse a los pacientes según los procedimientos descritos en el presente documento y otros procedimientos conocidos en la materia. Los pacientes para los que se contempla la terapia incluyen pacientes infectados con cualquiera de los virus mencionados en el presente documento, especialmente VIH-1 y VIH-2. Las dosis terapéuticas eficaces de los péptidos variantes de gp41 pueden determinarse mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia y estos tendrán en cuenta las preocupaciones relativas a la toxicidad potencial de estos péptidos de gp41.

Los péptidos variantes de gp41 también pueden administrarse profilácticamente a individuos previamente no infectados. Esta administración puede resultar ventajosa en aquellos casos en los que un individuo se ha sometido a un gran riesgo de exposición a un virus, como puede ocurrir cuando un paciente ha estado en contacto con un individuo infectado y hay un gran riesgo de transmisión viral. Esto puede resultar especialmente ventajoso puesto que no existe una cura conocida para el virus, como el virus VIH. A modo de ejemplo, la administración profiláctica de un péptido de gp41 sería ventajosa en una situación en la que un sanitario se ha expuesto a la sangre de un individuo infectado por VIH, o en otras situaciones en las que los pacientes involucrados en actividades de alto riesgo se exponen potencialmente al virus del VIH. Otras aplicaciones de los péptidos variantes de gp41 abarcan la administración de la misma a los individuos que albergan un virus, tal como VIH, con el fin de prevenir la transmisión del virus del individuo infectado a un individuo sin infectar. Estas aplicaciones también incluyen la prevención de la transmisión materno-infantil durante la lactancia u otros contactos diarios, o la transmisión que se produce a través de la actividad sexual.

En otra realización de la invención, los péptidos variantes de gp41, incluyendo los péptidos proporcionados en las tablas 1, 2 y 3, pueden coadministrarse con uno o más péptidos adicionales enumerados en las tablas 1, 2 y 3, Figura 1, T-20, T-1249, u otros tratamientos contra el VIH para prevenir la replicación del VIH (incluyendo VIH-1, VIH-2, o todos sus otros serotipos) y las partículas virales de VIS en el paciente.

Aplicación tópica

Los péptidos variantes de gp41, incluidos los proporcionados en las tablas 1, 2 y 3 se pueden utilizar solo o en forma de una composición que contiene o que consiste esencialmente en una concentración eficaz del péptido y un transportador farmacéuticamente aceptable. Una concentración eficaz puede determinarse observando si la infección por virus puede obstaculizarse después de la aplicación del(los) agente(s).

Las composiciones de la invención incluyen usos microbicidas tópicos, virostáticos o antifusogénicos para fines tanto *in vitro* como *in vivo*, especialmente para su uso intravaginal e intrarrectal. Para estos fines, el péptido modificado se puede formular en cualquier transportador apropiado, es decir, siempre que la actividad antifusión del péptido modificado no se vea disminuida por el transportador. Por consiguiente, las composiciones pueden estar en forma de cremas, geles, espumas, lociones, pomadas, comprimidos, soluciones o pulverizaciones. El diluyente transportador o vehículo puede ser acuoso o no acuoso, por ejemplo alcohólico u oleaginoso, o su mezcla, y puede contener adicionalmente otros tensioactivos, emolientes, lubricantes, estabilizadores, colorantes, perfumes, agentes antimicrobianos ya sean como principios activos o como conservantes y ácidos o bases para ajustar el pH. El pH preferente es aproximadamente 4 a 5. Se utilizan los procedimientos convencionales en la preparación de las composiciones.

Preferentemente, el transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable para las composiciones aplicadas por vía tópica se encuentra en forma de un líquido, gelatina o espuma que contiene el compuesto de la presente invención. El compuesto puede incorporarse en: (a) ungüentos y gelatinas, (b) insertos (supositorios, esponjas), (c) espumas, (d) duchas vaginales y (e) fluidos limpiadores o jabones corporales. La composición se introduce preferentemente en la vagina de una mujer o en el recto de un hombre o mujer, aproximadamente en el momento de, y preferentemente antes de las relaciones sexuales, pero puede también administrarse en otras membranas mucosas. Las composiciones pueden emplearse para el tratamiento de y para la protección contra las enfermedades de transmisión sexual incluido el VIH. El modo de administración se concebirá preferentemente para obtener un contacto directo de las composiciones que contienen péptidos de la invención con los agentes causantes de enfermedades de transmisión sexual.

Para aplicaciones tópicas, el transportador farmacéuticamente aceptable puede comprender adicionalmente disolventes orgánicos, emulsionantes, agentes gelificantes, humectantes, estabilizadores, otros tensioactivos, agentes humectantes, conservantes, agentes de liberación prolongada, y cantidades menores de agentes humectantes, agentes secuestrantes, colorantes, perfumes, y otros componentes comúnmente empleados en composiciones farmacéuticas para la administración tópica.

Con respecto a los artículos proporcionados por la presente invención, las composiciones de la invención se pueden impregnar en materiales de sustrato de absorción, tales como esponjas, o revestirse en la superficie de materiales del sustrato sólido, tales como condones, diafragmas o guantes médicos, para administrar las composiciones al epitelio vaginal u otro potencialmente infectado, preferentemente antes o durante las relaciones sexuales. Otros artículos y sistemas de administración de este tipo resultarán fácilmente evidentes por los expertos en la materia. Los artículos actualmente preferentes son condones, que se recubren por pulverización de péptidos modificados en las superficies de los condones, o impregnando los péptidos en el condón durante la fabricación por procedimientos

conocidos en la materia. Las composiciones de revestimiento preferentes incluyen silicio que proporciona lubricidad y libera el péptido modificado en una forma de liberación prolongada. Los polímeros bioadhesivos también se pueden utilizar para prolongar los aspectos de liberación prolongada del medicamento tópico particular u otro empleado.

- 5 Las formas de dosificación sólidas para la administración tópica incluyen supositorios, polvos, comprimidos y gránulos. En las formas de dosificación sólidas, las composiciones pueden mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón, y pueden comprender adicionalmente agentes lubricantes, agentes de tamponamiento y otros componentes bien conocidos por los expertos en la materia.

- 10 Los niveles de dosificación reales de los péptidos modificados en las composiciones y los artículos de la invención pueden variarse a fin de obtener cantidades en el sitio de fluidos de transmisión sexual para obtener la respuesta terapéutica o profiláctica deseada para un péptido y un procedimiento de administración particular. Por consiguiente, el nivel de dosificación seleccionado dependerá de la naturaleza y el sitio de infección, la respuesta terapéutica deseada, la vía de administración, la duración deseada del tratamiento y otros factores. Generalmente, la dosificación preferente para péptidos modificados de la presente invención se encontrará en el intervalo de
- 15 aproximadamente 0,01 a 2,0 por ciento en peso. Una forma de dosificación vaginal tópica preferente es una crema o supositorio como se ha descrito previamente que contiene 0,01 a 2,0 por ciento en peso de la composición según la invención. En cada tratamiento, por lo general, dicha forma de dosificación se aplica dos veces al día, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml por vía intravaginal, preferentemente en el orificio vaginal o en el recto. Se evitan generalmente cantidades mayores para minimizar las pérdidas.

- 20 Los procedimientos y composiciones de la invención pueden utilizarse para prevenir y tratar un amplio espectro de infecciones por microbios patógenos.

Ejemplos

A fin de facilitar una comprensión más completa de la invención, se proporcionan a continuación una serie de ejemplos.

25 *General*

- A menos que se especifique lo contrario, se realizó la síntesis de cada péptido variante de gp41 utilizando un procedimiento automatizado en fase sólida en un sintetizador de péptidos Symphony con intervención manual durante la generación del derivado. La síntesis se realizó en una resina conectora amida Ramage protegida por Fmoc, utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc. El acoplamiento se logra utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) como activador en solución de N,N-dimetilformamida (DMF) y diisopropiletilamina (DIEA) como base. El grupo protector Fmoc se eliminó utilizando piperidina/DMF al 20 %. Todos los aminoácidos utilizados durante la síntesis poseen la estereoquímica L. Durante la síntesis, se utilizaron recipientes de reacción de vidrio.
- 30

Ejemplo 1 Síntesis de FB005

- 35 Etapa 1: El ejemplo describe la síntesis de péptidos en fase sólida del compuesto en una escala 1 mmol. Se añaden secuencialmente a la resina los siguientes aminoácidos protegidos: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH,
- 40 Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, según la secuencia, se activaron utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se logra utilizando una solución de piperidina al 20 % (v/v) en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (etapa 1). El grupo amino del aminoácido final se acetiló con ácido acético activado utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA).
- 45

- Etapa 2: El péptido se escindió de la resina utilizando TFA al 85 %/triisopropilsilano (TIPS) al 5 %/tioanisol al 5 % y fenol al 5 %, seguido de precipitación con Et₂O helado en frío seco (Etapa 2).
- 50

Ejemplo 2 Síntesis de FB005M

- Etapa 1: El ejemplo describe la síntesis de péptidos en fase sólida del compuesto en una escala 1 mmol. Se añaden secuencialmente a la resina los siguientes aminoácidos protegidos: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH,
- 55

- 5 Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, según la secuencia, se activan utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se logra utilizando una solución de piperidina al 20 % (v/v) en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (etapa 1). El grupo amino del aminoácido final se acetiló con ácido acético activado utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA).
- 10 Etapa 2: La desprotección selectiva del grupo Lys (Aloc) se realizó manualmente y se logró tratando la resina con una solución de 3 eq de Pd(PPh₃)₄ disuelto en 5 ml de C₆H₆CHCl₃ (1:1): NMM al 2,5 % (v:v): AcOH al 5 % (v:v) durante 2 h (Etapa 2). La resina se lava después con CHCl₃ (6 x 5 ml), AcOH al 20 % en DCM (6 x 5 ml), DCM (6 x 5 ml), y DMF (6 x 5 ml).
- 15 Etapa 3: La síntesis se volvió a automatizar con la adición de Fmoc-AEEA-OH y ácido 3-maleimidopropiónico (Etapa 3). Entre cada acoplamiento, la resina se lavó 3 veces con N,N-dimetilformamida (DMF) y 3 veces con isopropanol (iPrOH).
- Etapa 4: El péptido se escindió de la resina utilizando TFA al 85 %/TIS al 5 %/tioanisol al 5 % y fenil al 5 %, seguido de precipitación con Et₂O helado en frío seco (Etapa 4).

Ejemplo 3 Síntesis de FB005CM

- 20 Etapa 1: El ejemplo describe la síntesis de péptidos en fase sólida del compuesto en una escala 1 mmol. Se añaden secuencialmente a la resina los siguientes aminoácidos protegidos: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu (tBu)-OH, Fmoc-Argpbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, según la secuencia, se activan utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se logra utilizando una solución de piperidina al 20 % (v/v) en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (etapa 1). El grupo amino del aminoácido final se acetiló con ácido acético activado utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA).
- 25
- 30 Etapa 2: La desprotección selectiva del grupo Lys (Aloc) se realizó manualmente y se logró tratando la resina con una solución de 3 eq de Pd(PPh₃)₄ disuelto en 5 ml de C₆H₆CHCl₃ (1:1): NMM al 2,5 % (v:v): AcOH al 5 % (v:v) durante 2 h (Etapa 2). La resina se lava después con CHCl₃ (6 x 5 ml), AcOH al 20 % en DCM (6 x 5 ml), DCM (6 x 5 ml), y DMF (6 x 5 ml).
- 35 Etapa 3: La síntesis se volvió a automatizar con la adición de Fmoc-AEEA-OH y ácido 3-maleimidopropiónico (Etapa 3). Entre cada acoplamiento, la resina se lavó 3 veces con N,N-dimetilformamida (DMF) y 3 veces con isopropanol (iPrOH).
- 40 Etapa 4: El péptido se escindió de la resina utilizando TFA al 85 %/TIS al 5 %/tioanisol al 5 % y fenol al 5 %, seguido de precipitación con Et₂O helado en frío seco (Etapa 4).

Ejemplo 4 Síntesis de FB006

- 45 Etapa 1: El ejemplo describe la síntesis de péptidos en fase sólida del compuesto en una escala 1 mmol. Se añaden secuencialmente a la resina los siguientes aminoácidos protegidos: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu) OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, según la secuencia, se activan utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se logra utilizando una solución de piperidina al 20 % (v/v) en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (etapa 1). El grupo amino del aminoácido final se acetiló con ácido acético activado utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA).
- 50
- 55

Etapa 4: El péptido se escindió de la resina utilizando TFA al 85 %/TIS al 5 %/tioanisol al 5 % y fenol al 5 %, seguido de precipitación con Et₂O helado en frío seco (Etapa 4).

Ejemplo 5 Síntesis de FB006M

5 Etapa 1: El ejemplo describe la síntesis de péptidos en fase sólida del compuesto en una escala 1 mmol. Se añaden secuencialmente a la resina los siguientes aminoácidos protegidos: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, 10 Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, según la secuencia, se activan utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se logra utilizando una solución de piperidina al 20 % (v/v) en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (etapa 1). El grupo amino del aminoácido final se acetiló con ácido acético activado utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). 15

Etapa 2: La desprotección selectiva del grupo Lys (Aloc) se realizó manualmente y se logró tratando la resina con una solución de 3 eq de Pd(PPh₃)₄ disuelto en 5 ml de C₆H₆CHCl₃ (1:1): NMM al 2,5 % (v:v): AcOH al 5 % (v:v) durante 2 h (Etapa 2). La resina se lava después con CHCl₃ (6 x 5 ml), AcOH al 20 % en DCM (6 x 5 ml), DCM (6 x 5 ml), y DMF (6 x 5 ml). 20

Etapa 3: La síntesis se volvió a automatizar con la adición de Fmoc-AEEA-OH y ácido 3-maleimidopropiónico (Etapa 3). Entre cada acoplamiento, la resina se lavó 3 veces con N,N-dimetilformamida (DMF) y 3 veces con isopropanol (iPrOH).

Etapa 4: El péptido se escindió de la resina utilizando TFA al 85 %/TIS al 5 %/tioanisol al 5 % y fenol al 5 %, seguido de precipitación con Et₂O helado en frío seco (Etapa 4). 25

Ejemplo 6 Síntesis de FB007M

Etapa 1: El ejemplo describe la síntesis de péptidos en fase sólida del compuesto en una escala 1 mmol. Se añaden secuencialmente a la resina los siguientes aminoácidos protegidos: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, según la secuencia, se activan utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se logra utilizando una solución de piperidina al 20 % (v/v) en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (etapa 1). El grupo amino del aminoácido final se acetiló con ácido acético activado utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). 30 35

Etapa 2: La desprotección selectiva del grupo Lys (Aloc) se realizó manualmente y se logró tratando la resina con una solución de 3 eq de Pd(PPh₃)₄ disuelto en 5 ml de C₆H₆CHCl₃ (1:1): NMM al 2,5 % (v:v): AcOH al 5 % (v:v) durante 2 h (Etapa 2). La resina se lava después con CHCl₃ (6 x 5 ml), AcOH al 20 % en DCM (6 x 5 ml), DCM (6 x 5 ml), y DMF (6 x 5 ml). 40

Etapa 3: La síntesis se volvió a automatizar con la adición de Fmoc-AEEA-OH y ácido 3-maleimidopropiónico (Etapa 3). Entre cada acoplamiento, la resina se lavó 3 veces con N,N-dimetilformamida (DMF) y 3 veces con isopropanol (iPrOH). 45

Etapa 4: El péptido se escindió de la resina utilizando TFA al 85 %/TIS al 5 %/tioanisol al 5 % y fenol al 5 %, seguido de precipitación con Et₂O helado en frío seco (Etapa 4).

Ejemplo 7 Síntesis de FB010M

50 Etapa 1: El ejemplo describe la síntesis de péptidos en fase sólida del compuesto en una escala 1 mmol. Se añaden secuencialmente a la resina los siguientes aminoácidos protegidos: Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, 55

Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, según la secuencia, se activan utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se logra utilizando una solución de piperidina al 20 % (v/v) en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (etapa 1). El grupo amino del aminoácido final se acetiló con ácido acético activado utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA).

Etapa 2: La desprotección selectiva del grupo Lys (Aloc) se realizó manualmente y se logró tratando la resina con una solución de 3 eq de Pd(PPh₃)₄ disuelto en 5 ml de C₆H₆CHCl₃ (1:1): NMM al 2,5 % (v:v): AcOH al 5 % (v:v) durante 2 h (Etapa 2). La resina se lava después con CHCl₃ (6 x 5 ml), AcOH al 20 % en DCM (6 x 5 ml), DCM (6 x 5 ml), y DMF (6 x 5 ml).

Etapa 3: La síntesis se volvió a automatizar con la adición de Fmoc-AEEA-OH y ácido 3-maleimidopropiónico (Etapa 3). Entre cada acoplamiento, la resina se lavó 3 veces con N,N-dimetilformamida (DMF) y 3 veces con isopropanol (iPrOH).

Etapa 4: El péptido se escindió de la resina utilizando TFA al 85 %/TIS al 5 %/tioanisol al 5 % y fenol al 5 %, seguido de precipitación con Et₂O helado en frío seco (Etapa 4).

Ejemplo 8 Síntesis de FB010KM

Etapa 1: El ejemplo describe la síntesis de péptidos en fase sólida del compuesto en una escala 1 mmol. Se añaden secuencialmente a la resina los siguientes aminoácidos protegidos: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, según la secuencia, se activan utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se logra utilizando una solución de piperidina al 20 % (v/v) en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (etapa 1). El grupo amino del aminoácido final se acetiló con ácido acético activado utilizando hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA).

Etapa 2: La desprotección selectiva del grupo Lys (Aloc) se realizó manualmente y se logró tratando la resina con una solución de 3 eq de Pd(PPh₃)₄ disuelto en 5 ml de C₆H₆CHCl₃ (1:1): NMM al 2,5 % (v:v): AcOH al 5 % (v:v) durante 2 h (Etapa 2). La resina se lava después con CHCl₃ (6 x 5 ml), AcOH al 20 % en DCM (6 x 5 ml), DCM (6 x 5 ml), y DMF (6 x 5 ml).

Etapa 3: La síntesis se volvió a automatizar con la adición de Fmoc-AEEA-OH y ácido 3-maleimidopropiónico (Etapa 3). Entre cada acoplamiento, la resina se lavó 3 veces con N,N-dimetilformamida (DMF) y 3 veces con isopropanol (iPrOH).

Etapa 4: El péptido se escindió de la resina utilizando TFA al 85 %/TIS al 5 %/tioanisol al 5 % y fenol al 5 %, seguido de precipitación con Et₂O helado en frío seco (Etapa 4).

Ejemplo 9 Inhibición viral mediante péptidos modificados

La actividad antiviral y la citotoxicidad de FB005, FB006, FB006M, FB007M, FB010KM y FM010M se evaluaron contra el VIH-1_{III}B en cultivos de CMSP humanas recientes. Los cuatro péptidos modificados FB006M, FB007M, FB010M, y FB010KM se conjugaron en la seroalbúmina humana (SAH) mediante la mezcla antes de la prueba antiviral. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 8, en la que el valor CI₅₀ es la concentración del fármaco de inhibición viral al 50 %, y el valor CT₅₀ es la concentración de la citotoxicidad del fármaco al 50 %.

Ensayo celular contra el VIH

Las alícuotas pretituladas de VIH-1_{III}B se retiraron del congelador (-80 °C) y se descongelaron rápidamente a temperatura ambiente en una cabina de seguridad biológica inmediatamente antes de su uso.

Las CMSP humanas recientes se aislaron a partir de donantes explorados, seronegativos para el VIH y el VHB (Banco de Sangre Interestatal, Inc.; Memphis, TN). Las células se peletaron/lavaron 2-3 veces por centrifugación a baja velocidad y se volvieron a suspender en STF para eliminar las plaquetas contaminantes. A continuación, la sangre leucoprocada se diluyó 1:1 con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (STF) y se colocó en capas en 14 ml de Medio de Separación de Linfocitos en un tubo de centrifugación de 50 ml y después se centrifugó durante 30 minutos a 600 X g. Las CMSP unidas se aspiraron gradualmente de la interfaz resultante y posteriormente se lavaron 2 veces con STF mediante centrifugación a baja velocidad. Después del lavado final, las

5 células se contaron mediante exclusión de azul de tripano y se volvieron a suspender en 1×10^7 células/ml en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 15 %, 2 mM de L-glutamina, 4 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA-P, Sigma). Las células se dejaron incubar durante 48-72 horas a 37 °C. Tras la incubación, se centrifugaron las CMSP y se volvieron a suspender en RPMI 1640 con SBF al 15 %, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 20 U/ml de IL-2 humana recombinante (R&D Systems, Inc). Las CMSP se mantuvieron en este medio a una concentración de $1-2 \times 10^6$ células/ml con cambios de medio cada dos semanas hasta que se utilizaron en el protocolo de ensayo. Las células se mantuvieron en cultivo durante un máximo de dos semanas antes de considerarse demasiadas viejas para su uso en ensayos y se desecharon. Los monocitos se deplecionaron a partir del cultivo como resultado de la adherencia al matraz del cultivo de tejidos.

10 Para el ensayo de CMSP convencional, se agruparon las células que estimularon PHA-P de al menos dos donantes normales, se diluyeron en un medio fresco a una concentración final de 1×10^6 células/ml, y se sembraron en los pocillos interiores de una microplaca de fondo redondo de 96 a 50 $\mu\text{l/pocillo}$ (5×10^4 células/pocillo). Cada placa contiene pocillos de control de virus/célula (células más virus), pocillos experimentales (fármacos más células más virus) y los pocillos de control del compuesto (fármacos más medios y sin células, necesarios para la monitorización de MTS de citotoxicidad). Dado que el VIH-1 no es citopático en CMPS, esto permite la utilización de la misma placa de ensayo tanto para las mediciones de citotoxicidad como la actividad antiviral. Las diluciones del fármaco de prueba se prepararon en una concentración 2X en tubos de microtítulo y se colocaron 100 μl de cada concentración en pocillos adecuados utilizando el formato convencional. Se colocaron 50 μl de una dilución predeterminada de un estoque viral en cada pocillo de prueba (MOI final $\approx 0,1$). Los cultivos de CMSP se mantuvieron durante siete días después de la infección a 37 °C, CO₂ al 5 %, después de lo cual se recogieron muestras de sobrenadante libre de células para el análisis de la actividad de la transcriptasa inversa y/o contenido p24 del VIH. Después de la eliminación de las muestras de sobrenadante, se midió la citotoxicidad del compuesto mediante la adición de MTS a las placas para determinar la viabilidad celular. Los pocillos también se examinaron microscópicamente y se anotó cualquier anomalía.

25 **Ensayo de citotoxicidad secundaria**

Con el fin de evaluar la citotoxicidad de los compuestos en concentraciones superiores a los utilizados en la evaluación de la eficacia contra el VIH, se utilizó un ensayo secundario. Este ensayo fue esencialmente idéntico al descrito previamente para la evaluación de la eficacia contra el VIH, sin embargo no se añadió virus alguno a los pocillos (reemplazado por medios sin virus) y la concentración elevada del ensayo se aumentó a 25 μM . Tras la incubación, se analizaron las placas para determinar la viabilidad celular utilizando MTS como se describe a continuación.

Tabla 8

Compuesto	Observación	CI50 (nM)	CT50 (nM)
FB005	Péptido sin modificar	0,93	14.300
FB006	Péptido sin modificar	1,41	15.900
FB006M	Péptido modificado conjugado con SAH	3,94	> 25.000
FB007M	Péptido modificado conjugado con SAH	9,09	> 25.000
FB010M	Péptido modificado conjugado con SAH	7,78	> 25.000
FB010KM	Péptido modificado conjugado con SAH	15,7	> 25.000

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Xie, Dong Jiang, He
 <120> Inhibidores derivados peptídicos de la fusión contra la infección del VIH
 <130> 63024.000002
 <150> 60/412,797
 <151> 2002-09-24

40 <160> 15
 <170> Patente en versión 3.1
 <210> 1

<211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia peptídica

<400> 1

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

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

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu
 35 40

<210> 2
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia peptídica

<400> 2

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

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

Leu Leu

15 <210> 3
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia peptídica

<400> 3

Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln
 1 5 10 15

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

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
 35

<210> 4
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia peptídica
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia peptídica
 15 <400> 5

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

<210> 6
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia peptídica
 <400> 6

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

25

ES 2 558 680 T3

<210> 7
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia peptídica
 <400> 7

```

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

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

Leu Leu
    
```

<210> 8
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia peptídica
 15 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <213> Xaa representa un residuo de lisina derivatizado con un resto de maleimida
 <400> 8

```

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

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

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu
          35           40
    
```

20 <210> 9
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia peptídica

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (45)..(45)
 30 <213> Xaa representa un residuo de lisina derivatizado con un resto de maleimida
 <400> 9

ES 2 558 680 T3

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

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

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Xaa
35 40 45

5 <210> 10
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia peptídica
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<213> Xaa representa un residuo de lisina derivatizado con un resto de maleimida
<400> 10

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

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

Leu Leu

15 <210> 11
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia peptídica
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<213> Xaa representa un residuo de lisina derivatizado con un resto de maleimida
<400> 11

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

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

Leu Leu Xaa
35

25

<210> 12
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia peptídica

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)

10 <213> Xaa representa un residuo de lisina derivatizado con un resto de maleimida
 <400> 12

Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Xaa Gln Ala Gln
 1 5 10 15

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

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
 35

15 <210> 13
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia peptídica

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 <213> Xaa representa un residuo de lisina derivatizado con un resto de maleimida
 <400> 13

Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Ile Glu Gln Ala Gln
 1 5 10 15

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

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe Xaa
 35 40

25 <210> 14
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia peptídica

<220>
 <221> MISC_FEATURE

ES 2 558 680 T3

<222> (13)..(13)

<213> Xaa representa un residuo de lisina derivatizado con un resto de maleimida

<400> 14

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

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

Leu Leu

5 <210> 15
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia peptídica

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<213> Xaa representa un residuo de Lisina derivatizado con un resto de maleimida

15 <400> 15

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

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

Leu Leu Xaa
35

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado seleccionado entre un péptido FB005 que comprende la secuencia de SEC ID N° 1, un péptido FB006 que comprende la secuencia de SEC ID N° 2, y un péptido FB066 que comprende la secuencia de SEC ID N° 7.
- 5 2. Un péptido aislado, derivatizado, seleccionado entre:
- (a) el péptido FB005M de la SEC ID N° 8;
 - (b) el péptido FB005CM de la SEC ID N° 9;
 - (c) el péptido FB006M de la SEC ID N° 10;
 - (d) el péptido FB007M de la SEC ID N° 11;
 - 10 (e) el péptido FB010M de la SEC ID N° 12;
 - (f) el péptido FB010KM de la SEC ID N° 13;
 - (g) el péptido FB066M de la SEC ID N° 14; y
 - (h) el péptido FB066KM de la SEC ID N° 15.
3. Un péptido aislado, derivatizado, seleccionado entre:
- 15 (a) SEC ID N° 1;
 - (b) SEC ID N° 2;
 - (c) SEC ID N° 7;
- en el que los restos de aminoácidos predeterminados en la secuencia peptídica se derivatizan conjugando un grupo de acoplamiento a dichos restos de aminoácidos predeterminados.
- 20 4. El péptido derivatizado de la reivindicación 3, en el que el grupo de acoplamiento es un grupo maleimido; preferentemente el grupo maleimido es 3'-maleimidopropionato ligado al grupo amino épsilon de lisina mediante el ácido [2-(2-amino)etoxil]etoxi acético.
5. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de la reivindicación 1 o el péptido derivatizado de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 y un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Un conjugado que comprende el péptido derivatizado de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, conjugado a un componente sanguíneo.
7. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el componente sanguíneo se selecciona entre:
- (a) proteína de seroalbúmina humana;
 - (b) proteína de transferrina humana;
 - 30 (c) proteína de ferritina humana;
 - (d) proteínas de inmunoglobulina humana;
 - (e) proteína de α -2-macroglobulina humana;
 - (f) proteína de unión a tiroxina humana;
 - (g) proteínas de unión a esteroides humanas; y
 - 35 (h) sus combinaciones.
8. Un procedimiento *ex vivo* para la reducción o prevención de la infección de las células de mamífero por un virus que comprende presentar un péptido según la reivindicación 1 o un derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 a dichas células de mamífero.
- 40 9. Un procedimiento *ex vivo* para la prevención de la replicación viral en las células de mamífero por un virus que comprende presentar un péptido según la reivindicación 1 o un derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 a dichas células de mamífero.
10. El procedimiento de la reivindicación 8 o 9, en el que el péptido se presenta en presencia de dicho virus.
11. El procedimiento de las reivindicaciones 8-10, en el que
- (i) el virus se selecciona entre:
 - 45 (a) virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); y
 - (b) virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS); o
- (ii) el péptido o derivado peptídico se coadministra con uno o más tratamiento(s) de VIH adicional(es); o
 - (iii) el virus es VIH y las células de mamífero son células humanas.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que

- (i) dicho o dichos tratamiento(s) de VIH adicional(es) comprende(n) al menos otro péptido variante de gp41; o
- (ii) el(los) tratamiento(s) de VIH adicional(es) se selecciona(n) entre:

- 5 (a) AGENERASE;
- (b) COMBIVIR;
- (c) CRIXIVAN;
- (d) EMTRIVA;
- (e) EPIVIR;
- 10 (f) FORTOVASE;
- (g) HIVID;
- (h) INVIRASE;
- (i) KALETRA;
- (j) NORVIR;
- 15 (k) RESCRIPTOR;
- (l) RETROVIR;
- (m) REYATAZ;
- (n) SUSTIVA;
- (o) TRIZIVIR;
- 20 (p) VIDEX EC;
- (q) VIDEX;
- (r) VIRACEPT;
- (s) VIRAMUNE;
- (t) VIREAD;
- 25 (u) ZERIT; y
- (v) ZIAGEN.

13. Un derivado de péptido variante de gp41 de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 para su uso en la prevención o reducción de la infección de VIH en un paciente cuyas células han sido expuestas al VIH, en el que dicho derivado peptídico conjuga un componente sanguíneo de dicho paciente, prolongando así la semivida del péptido en la sangre de dicho paciente.

30 14. Un procedimiento *ex vivo* de fabricación de un conjugado antiviral que comprende mezclar péptido(s) variante(s) derivatizado(s) de gp41 de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 con componentes sanguíneos y permitir la formación de enlaces covalentes entre el péptido variante derivatizado de gp41 y los componentes sanguíneos.

35 15. El péptido para su uso en la prevención o reducción de la infección del VIH en un paciente cuyas células han sido expuestas al VIH de la reivindicación 13 o el procedimiento de la reivindicación 14, en el que el componente sanguíneo se selecciona entre:

- (a) proteína de seroalbúmina humana;
 - (b) proteína de transferrina humana;
 - (c) proteína de ferritina humana;
 - 40 (d) proteínas de inmunoglobulina humana;
 - (e) proteína de α -2-macroglobulina humana;
 - (f) proteína de unión a tiroxina humana;
 - (g) proteínas de unión a esteroides humanas; y
 - (h) sus combinaciones, preferentemente
- el componente sanguíneo es la proteína de seroalbúmina humana.

45 16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el(los) componente(s) sanguíneo(s) se separa(n) por plasmaféresis antes de la conjugación al péptido derivatizado.

17. Un péptido según la reivindicación 1 o un derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 para su uso en la reducción de la infección de células de mamífero por un virus.

50 18. Un péptido según la reivindicación 1 o un derivado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 para su uso en la prevención de la replicación viral en las células de mamífero por un virus.

19. El péptido o derivado peptídico para su uso en la reducción de la infección de células de mamífero por un virus a dichas células de mamífero o para su uso en la prevención de la replicación viral en las células de mamífero por un virus de las reivindicaciones 17 o 18, en el que dicho péptido o derivado peptídico es adecuado para la presentación a dichas células en presencia de dicho virus.

55 20. El péptido o derivado peptídico para su uso en la reducción de la infección de células de mamífero por un virus a dichas células de mamífero o para su uso en la prevención de la replicación viral en las células de mamífero por un virus de la reivindicaciones 17-19, en el que

(i) el virus se selecciona entre:

- (a) virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); y
- (b) virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS); o

5 (ii) el medicamento es adecuado para la administración por vía oral, tópica, intravascular, intraarterial, intramuscular, o subcutánea; o
(iii) el medicamento se coadministra con uno o más tratamiento(s) de VIH adicional(es); o
(iv) el virus es el VIH y las células de mamífero son células humanas.

10 21. El péptido o derivado peptídico para su uso en la reducción de la infección de células de mamífero por un virus a dichas células de mamífero o para su uso en la prevención de la replicación viral en las células de mamífero por un virus de la reivindicación 20, en el que

(i) dicho o dichos tratamiento(s) de VIH adicional(es) comprende(n) al menos otro péptido variante de gp41; o
(ii) el(los) tratamiento(s) de VIH adicional(es) se selecciona(n) entre:

- 15 (a) AGENERASE;
- (b) COMBIVIR;
- (c) CRIXIVAN;
- (d) EMTRIVA;
- (e) EPIVIR;
- (f) FORTOVASE;
- 20 (g) HIVID;
- (h) INVIRASE;
- (i) KALETRA;
- (j) NORVIR;
- (k) RESCRIPTOR;
- 25 (l) RETROVIR;
- (m) REYATAZ;
- (n) SUSTIVA;
- (o) TRIZIVIR;
- (p) VIDEX EC;
- (q) VIDEX;
- 30 (r) VIRACEPT;
- (s) VIRAMUNE;
- (t) VIREAD;
- (u) ZERIT; y
- 35 (v) ZIAGEN.

Figura 1

Secuencias que muestran heptavalentes que forman la hélice

T-20	Y T S L I H S L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F	SEC ID n.º 4
T-1249	W Q E W E Q K I T A L L E Q A Q I Q Q E K N E Y E L Q K L D K W A S L W E W F	SEC ID n.º 3
C-34	W M E W D R E I N N Y T S L I H S L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L	SEC ID n.º 5
SIV C34	W Q E W E R K V D F L E E N I T A L L E E A Q I Q Q E K N M Y E L Q	SEC ID n.º 6
FB005	<u>W E E W D R E I N N Y T E L</u> I H E L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L	SEC ID n.º 1
FB006	W <u>E E W D R E I N N Y T K L</u> I H E L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L	SEC ID n.º 2
FB066	W <u>E E W D R E I N N Y T K L</u> I H E L I E E S Q N Q Q E E N E Q E L L	SEC ID n.º 7
FB005M	W E E W D R E I N N Y T X L I H E L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L	SEC ID n.º 8
FB005CM	W E E W D R E I N N Y T E L I H E L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L X	SEC ID n.º 9
FB006M	W E E W D R E I N N Y T X L I H E L I E E S Q N Q Q E K N E W E L L	SEC ID n.º 10
FB007M	W E E W D R E I N N Y T E L I H E L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L X	SEC ID n.º 11
FB066M	W E E W D R E I N N Y T X L I H E L I E E S Q N Q Q E E N E Q E L L	SEC ID n.º 14
FB066KM	W E E W D R E I N N Y T K L I H E L I E E S Q N Q Q E E N E Q E L L X	SEC ID n.º 15
FB010M	W Q E W E Q K I T A L L X Q A Q I Q Q E K N E Y E L Q K L D K W A S L W E W F	SEC ID n.º 12
FB010KM	W Q E W E Q K I T A L I E Q A Q I Q Q E K N E Y E L Q K L D K W A S L W E W F X	SEC ID n.º 13

(X en las fórmulas previas es un residuo de lisina derivatizado con un enlace de unión a maleimida)