

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 988**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2009 E 09749196 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2334318**

54 Título: **Péptidos derivados de estimulantes de la VIH-1 integrasa que interfieren con la proteína Rev-integrasa**

30 Prioridad:

06.10.2008 US 103036 P

13.07.2009 US 225028 P

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

23.06.2016

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HERBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
LTD. (100.0%)**

**Hi Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat
Ram, P.O. Box 39135
91390 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**LEVIN, AVIAD;
HAYOUKA, ZVI;
FRIEDLER, ASSAF y
LOYTER, ABRAHAM**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 574 988 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).

Péptidos derivados de estimulantes de la VIH-1 integrasa que interfieren con la proteína Rev-integrasa**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a péptidos bioactivos derivados de la integrasa de proteína (IN) de virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), y a composiciones que comprenden estos péptidos, útiles en el tratamiento de la infección por VIH-1.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

[0002] El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), la proteína de integrasa (IN) es una proteína de 32-kDa contenida en el virus y siguiente infección, que se libera en el citoplasma de las células infectadas. Después de la fusión célula-virus, un proceso que promueve la entrada del genoma de VIH-1 en una célula infectada, el ARN viral se convierte en ADN de cadena doble (ADNc). El ADN viral que se convierte en parte del complejo de preintegración (PIC) es eventualmente integrado en el ADN cromosómico de huésped (Bukrinsky et al., 1993, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 90, 6125-6129). En el citoplasma, IN cataliza la primera etapa del proceso de integración, a saber el tratamiento del extremo 3' en el que un dímero IN elimina un dinucleótido pGT a partir del extremo 3' de cada repetición terminal larga viral (LTR) (Guiot et al., 2006, J Biol Chem 281, 22707 a 22719). Después de la importación nuclear del PIC, el ADN cromosómico del huésped se convierte en accesible para el ADNc viral y el segundo paso del proceso de integración, a saber, el paso de transferencia de cadena que es catalizada por un tetrámero se realiza. Esta secuencia ordenada de eventos, centrada en la integración, es obligatoria para la replicación del VIH. Aunque cada célula infectada por el VIH-1 contiene varias copias del genoma viral, sólo un número limitado de eventos de integración por célula, sobre todo uno o dos, se han observado.

20

25

[0003] Debido a su papel central en la replicación del VIH, la proteína IN es una diana atractiva para la terapia antiviral. Además, probablemente no existe ningún homólogo celular de IN en las células humanas y, por tanto, inhibidores IN no interferirán con los procesos celulares normales. Sin embargo, sólo unos pocos inhibidores IN han sido identificados hasta la fecha.

30

[0004] Dominios específicos dentro de las proteínas virales son responsables de su interacción con los receptores de la célula huésped y con otras proteínas virales y celulares que permiten la realización del ciclo de propagación viral dentro de la célula huésped. Los péptidos derivados de estos dominios de unión pueden interferir con virus-huésped y interacciones de proteínas virus-virus y, como tal, son candidatos para agentes terapéuticos. Usando este enfoque, los péptidos cortos que inhiben en la actividad enzimática se obtuvieron siguiendo el análisis de la interacción entre dos de las proteínas de HIV-1, la transcriptasa inversa (RT) y IN. El cribado de una biblioteca completa de péptidos derivados de RT demostró que dos dominios de alrededor de 20 aminoácidos median esta interacción. Péptidos que llevan estas secuencias de aminoácidos bloqueados en las actividades enzimáticas in vitro (Oz et al., 2005, J Biol Chem 280, 21987 a 21996).

35

40

[0005] Ya se han descrito un número limitado de péptidos inhibidores. El uso de una biblioteca de péptidos combinatoria, se seleccionó un hexapéptido que inhibía la actividad 3'-procesamiento e integración de IN (Puras et al., 1995, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 92, 11456 a 11460). Basado en la observación de que este péptido también inhibió la IN del VIH-2, FIV, y MLV, se sugirió que una región conservada en todo el dominio catalítico de IN se está convirtiendo en objetivo. Un péptido inhibidor IN también fue seleccionado usando una biblioteca de presentación de fagos (Desjobert et al., 2004, Biochemistry 43, 13097 a 13105). Péptidos derivados de IN que interferían con su oligomerización también bloquearon su actividad enzimática (Maroun et al., 2001, Biochemistry 40, 13840 a 13848). Varios otros péptidos inhibidores se han descrito en los últimos años. Otros estudios descritos en péptidos inhibidores con actividad anti-HIV-1 en algunos tipos de células (de Soultrait et al., 2003, Curr Med Chem 10, 1765 a 1778).

45

50

[0006] El documento WO 2008/053478 describe péptidos inhibidores IN de proteínas derivadas de LEDGF/p75. WO 2008/068765 da a conocer péptidos que comprenden un fragmento de la proteína Rev del VIH-1 que inhiben la actividad y la replicación del virus. Se demostró que los VIH-1 IN y proteínas Rev pueden interactuar entre sí de forma intracelular (Rosenbluh et al., 2007, J Biol Chem 282,15743 a 15753), y especuló que el número limitado de eventos de integración observados en los infectados por el VIH las células pueden ser resultado de la inhibición de la actividad enzimática regulada IN por la proteína Rev viral. Zhao et al, 2003 (Bioorg Med Chem Lett 13, 1175-1177), describe el HLKTAVQMAVFIHNFKR péptido (SEQ ID NO: 1) correspondiente a los residuos de aminoácidos 171-187 de la IN, que bloquean la actividad de la proteína. Levin A. et al. ("Los péptidos derivados de VIH-1 integrasa que se unen Rev estimulan la integración del genoma viral"; Plos One, Vol 4, 1 de enero de 2009.) dan a conocer las secuencias SEQ ID NO: 5 y 7 de la presente invención e informar sobre su interacción con la proteína Rev y su posible papel en la mediación de la interacción Rev-integrasa.

55

60

65

[0007] Existe una necesidad insatisfecha de nuevas y mejoradas composiciones de la infección por VIH-1, en una

manera que sea eficaz y específica para células infectadas y segura para las células sanas, reduciendo así los efectos secundarios asociados con medicamentos conocidos contra el VIH.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 5
- [0008]** La presente invención proporciona moléculas y composiciones que comprenden péptidos específicos derivados de integrasa VIH-1 proteína (IN), y mezclas de tales péptidos, por destrucción selectiva de las células infectadas por VIH-1. Estas moléculas, solas, en mezclas, o en combinación con otro agente anti-VIH 1, son útiles en el tratamiento de infección VIH-1 y el SIDA. Sorprendentemente, las composiciones que comprenden combinaciones específicas de péptidos son capaces de erradicar completamente el virus de las células infectadas.
- 10
- [0009]** Sin desear estar ligado a ninguna teoría, se cree que los péptidos y combinaciones de los mismos son capaces de destruir el VIH-1 en las células infectadas mediante la inducción de múltiples integraciones del ADNc viral en el ADN cromosómico del huésped.
- 15
- [0010]** La presente invención proporciona, según un aspecto, un péptido que consiste en la secuencia WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5), WTAVQMAVFIHNFKRK (SEQ ID NO: 6), o WTHLEGKILVAVHVA (SEQ ID NO: 7). Preferiblemente, el péptido consiste en la secuencia WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5).
- 20
- [0011]** Según otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende los tres péptidos que consisten en la secuencias de WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5), WTAVQMAVFIHNFKRK (SEQ ID NO: 6), y WTHLEGKILVAVHVA (SEQ ID NO: 7).
- 25
- [0012]** Según otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos que consisten en la secuencias de WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5), WTAVQMAVFIHNFKRK (SEQ ID NO: 6), y WTHLEGKILVAVHVA (SEQ ID NO: 7) para uso en el tratamiento de una infección por VIH-1.
- 30
- [0013]** De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica comprende los tres péptidos que consisten en la secuencias de WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5), WTAVQMAVFIHNFKRK (SEQ ID NO: 6), y WTHLEGKILVAVHVA (SEQ ID NO: 7).
- 35
- [0014]** De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición farmacéutica para uso comprende además un agente anti VIH-1.
- [0015]** De acuerdo con algunas realizaciones, la lucha contra el agente VIH-1 es un inhibidor de la proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa (RT).
- 40
- [0016]** De acuerdo con algunas formas de realización específicas el agente anti VIH-1 se selecciona del grupo que consiste en: atazanavir (ATV), amprenavir, fosamprenavir (APV), tipranavir (TPV), indinavir, saquinavir, lopinavir/ritonavir, prezista, nelfinavir (NFV) y azidotimidina (AZT). De acuerdo con realizaciones más específicas del otro agente anti VIH-1 es azidotimidina (AZT) o Ro 31 a 8959 (Saquinavir).
- 45
- [0017]** El amino terminal del péptido, análogo, derivado o mimético descrito en este documento o contenido en una composición farmacéutica de la invención, se pueden modificar, por ejemplo, puede ser acilado. En consecuencia, el término carboxi puede ser modificado, por ejemplo, puede ser amidado, reducido o esterificado.
- 50
- [0018]** Un resto de permeabilidad de mejora se puede conectar de forma covalente a la secuencia del péptido a través de un enlace directo o mediante un enlazador, para formar un conjugado péptido. El resto de la permeabilidad de mejora puede estar conectado a cualquier posición en el resto peptídico, directamente o mediante un espaciador, preferentemente al extremo de amino del péptido.
- [0019]** Tal resto de permeabilidad de mejora puede ser un ácido graso.
- 55
- [0020]** Cualquier resto que se conoce en la técnica pueda facilitar o mejorar permeabilidad activamente o pasivamente del compuesto en las células se pueden usar para la conjugación con el núcleo peptídico. Ejemplos no limitativos incluyen: restos hidrófobos tales como ácidos grasos, esteroides y compuestos aromáticos o alifáticos voluminosos; restos que pueden tener los receptores o transportadores de la membrana celular, como los esteroides, vitaminas y azúcares, aminoácidos naturales y no naturales y péptidos transportadores. El resto hidrófobo puede ser un resto lipídico o un resto aminoácido.
- 60
- [0021]** También se dan a conocer versiones cíclicas de los péptidos descritos en este documento y contenidos en las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención.
- 65
- [0022]** También se describen en la estimulación de péptidos y conjugados peptídicos que comprenden compuestos peptidomiméticos de una secuencia derivada de VIH-1 en proteínas, que tienen adicionalmente propiedades

farmacocinéticas mejoradas tales como la estabilidad y la permeabilidad celular. Los ejemplos no limitantes de tales compuestos incluyen N-alkilación de residuos seleccionados, de modificaciones de cadena lateral de residuos seleccionados, la inclusión de aminoácidos no naturales, el uso de carbamato, urea, sulfonamida y la hidrazina para el reemplazo del enlace peptídico, y la incorporación de restos no péptidos incluyendo, pero no limitándose a piperidina, piperazina y pirrolidina, a través de un enlace peptídico o no peptídico. Enlaces modificados entre residuos de aminoácidos en peptidomiméticos pueden ser seleccionados de entre el grupo que consiste en: una amida, urea, carbamato, hidrazina y enlace sulfonamida. A menos que se indique expresamente lo contrario los enlaces entre los residuos de aminoácidos son todos enlaces de amida.

5
10 **[0023]** Los derivados de péptidos, análogos, derivados y miméticos se pueden utilizar como compuestos de plomo para el diseño, la prueba y la selección de moléculas pequeñas como el VIH-1 contra composiciones.

[0024] También se describen las mezclas que comprenden al menos dos péptidos derivados IN diferentes.

15 **[0025]** También se describen los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la invención que consiste de los aminoácidos naturales.

[0026] Un polinucleótido que codifica una secuencia peptídica seleccionada de entre el grupo que consiste en GSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 2); TAVQMAVFIHNFKRK (SEQ ID NO: 3); THLEKILVAVHVA (SEQ ID NO: 4); WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5); WTAVQMAVFIHNFKRK (SEQ ID NO: 6); WTHLEKILVAVHVA (SEQ ID NO: 7), se proporciona.

[0027] También se describen vectores de expresión y células huésped que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los péptidos de la invención consiste en los aminoácidos naturales.

25 **[0028]** Se ha de entender expresamente que los péptidos conocidos previamente se excluyen de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **[0029]**

Figuras 1A-1D ilustran resultados de ensayo in-vitro que demuestran que el péptido de INS interactúa con Rev-GFP y péptidos derivados Rev, y promueve la disociación de los complejos Rev-IN: **(A)** Unión Rev-GFP o GFP a placas de ELISA recubiertas con los péptidos; **(B)** Péptido de unión al complejo Rev-IN de placas de ELISA, en la relación designada Rev-GFP:péptido; **(C)** Rev 13-23 y Rev 53-67 (conjugado con biotina-BSA) que se une a los péptidos INS que recubren las placas ELISA; **(D)** Rev 13-23 y Rev 53-67 (conjugado con biotina-BSA) que se une a péptidos INr-1 o INr-2 en placas de ELISA recubiertas.

Figuras 2A-2C representan la inhibición de actividad enzimática IN por Rev y su abrogación por el INS y los péptidos INrs: **(A)** Rev-GFP o GFP se incubaron con diferentes relaciones molares de IN (390 nM) y la actividad enzimática IN fue determinada **(B)** Rev-GFP preincubado con el péptido de INS en una relación molar de 5:1 (péptido:Rev-GFP) y se añadió la mezcla resultante a una solución que contiene IN para dar una relación molar de 1:200 y 1:400 (IN:Rev-GFP). Tras un período de incubación, actividad IN determinada. **(C)** Igual que **(B)**, pero con los péptidos INrs.

Figuras 3A-3C demuestran la inhibición de la actividad IN por péptidos derivados de Rev y Rev, y la derogación específica por el INS y los péptidos INr. IN (390 nM) se incubó con 50 μ M de los péptidos derivados de Rev (Rev13-23 o Rev53-67, 1:300 IN:péptido derivado de Rev) péptidos añadidos en varias relaciones molares (10:1 a 1:10 péptido Rev:péptido IN): **(A)** Rev-péptidos con INS; **(B)** Rev13-23 con INr-1 y el INr-2; y **(C)** Rev53-67 con INr-1 y INr-2.

Figuras 4A-4C muestran penetración celular y falta de toxicidad de péptidos: **(A)** los péptidos marcados con fluoresceína (10 μ M) de INr-1, INr-2, INS o IN-3 (péptido control no permeable) de penetración en células HeLa como visualizado mediante un microscopio confocal. **(B)** Falta de toxicidad celular de los péptidos a las células HeLa TZM-bl; **(C)** Falta de toxicidad celular de los péptidos a los linfocitos H9.

Figura 5A-5D representan el efecto de los péptidos INS y INrs sobre la infección por VIH-1 en comparación con el azidotimidina inhibidor (AZT). Los péptidos (12,5 μ M), o AZT (2 μ M), se incubaron con células H9 **(A)** y **(C)** y las células de linfocitos Sup-T1 **(B)** y **(D)** que fueron infectadas con VIH-1. Se determinó la cantidad de P24 viral **(A)** y **(B)** y el título de virus **(C)** y **(D)**.

Figura 6A-6B estimulación de los eventos de integración del ADN viral por los péptidos del INS y INrs en células H9 T-linfoideas **(A)** diferentes concentraciones del péptido INS y AZT (2 μ M); **(B)** INr-1, INr-2 y la combinación de estos péptidos (12,5 μ M) o AZT (2 μ M).

Figura 7 representa la supervivencia del VIH-1 en las células HeLa infectadas después del tratamiento con el péptido de INS. Las células fueron infectadas con WT del VIH-1 a MOI de 0,01 y se añadieron 12,5 μ M de INS.

Figura 8 - inducción de la lisis de las células infectadas por el VIH-1 por los péptidos del INS y INrs. Las células se trataron con péptidos INS o INrs o una mezcla de los tres péptidos y después infectados con MOI 10 de Δ ENV/VSV-G VIH-1 que promueve un solo ciclo de infección. Lisis porcentual se midió por MTT 48 h

pos infección.

Figura 9 - erradicación del VIH-1 de células H9 después del tratamiento con una combinación de los péptidos INRS y del INS y el inhibidor de proteasa Ro 31-8959. Las células fueron tratadas con péptidos en 100 µM cada uno, AZT a 2 µM y/o Ro31-8959 a 1µM ("cóctel" representa una mezcla de INS, INrs y Ro31-8959), e infectados con MOI de 0,1 en peso de VIH-1. Cada 2 días se determinó la cantidad de partículas infecciosas de virus (A) y eventos de integración por célula (B).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

10 **[0030]** En la actualidad se ha demostrado por primera vez que el efecto inhibitor sobre la actividad de integrasa VIH-1, ejercida por los péptidos Rev 13-23 y Rev 53-67, puede ser abrogada por varios péptidos IN-derivados debido al desplazamiento de las moléculas inhibitoras.

15 **[0031]** La presente invención se basa en el hallazgo de que tres péptidos, designados INr-1 (SEQ ID NO: 4), INr-2 (SEQ ID NO: 2), y el INS (SEQ ID NO: 3), derivadas de la integrasa de proteína del VIH-1 (IN), se encontraron para estimular la integración del ADNc viral en el ADN cromosómico del huésped y matar selectivamente las células infectadas por VIH. Estos péptidos se derivan de diferentes regiones de la proteína IN. Los péptidos INR-1 y INR-2 anulan el efecto inhibitor de Rev mientras que el péptido designado INS estimuló significativamente la actividad enzimática de la HIV-1 IN, incluso en ausencia del péptido Rev inhibitor. Sin desear estar ligado a ninguna teoría de mecanismo de acción, los resultados indican, sobre la base de los experimentos de un ciclo de infección por virus (Fig 8) que es la muerte celular debido a la estimulación de la integración del ADN viral. Péptidos INS e INr-1 y 2, que se han encontrado para ser permeable a las células, estimulan la integración del VIH-1 de ADNc en el ADN cromosómico del huésped. Basándose en los resultados obtenidos en los sistemas de ensayo in-vitro, y sin desear estar ligado a ninguna teoría, es concebible que los efectos observados en células también el resultado de la disociación de un complejo putativo IN-Rev por estos péptidos. Además, debido probablemente a su capacidad para estimular la integración, los péptidos INS e INR-1 e INR-2 causan la muerte eventual selectiva únicamente de las células infectadas por VIH-1. Concentraciones de péptidos que promueven la muerte celular no son tóxicas para las células no infectadas.

30 **[0032]** El INS y péptidos INr-1 y 2 matan selectivamente a células cultivadas VIH-1 infectadas, mientras que son seguras para las células no infectadas, y por lo tanto se puede utilizar para eliminar específicamente y selectivamente a las células infectadas por el virus. Una combinación de estos péptidos junto con un inhibidor de la proteasa VIH-específica Ro 31-8959 causó erradicaciones completas de VIH-1 (medidas por la falta de secuencias de virus integradas y no la producción de virus) después de 12 días de la administración. Además, el INS y los péptidos INrs se pueden utilizar como péptidos de plomo para obtener pequeñas moléculas que específicamente y selectivamente eliminan las células infectadas por VIH-1 y por lo tanto pueden servir como drogas anti-VIH-1.

40 **[0033]** Además, vectores de retrovirus, incluyendo los que llevan la integrasa del VIH están siendo utilizados en la transferencia de genes y la terapia génica. Dado que el INS y péptidos INr-1 y el INr-2 estimulan la actividad de la integrasa enzimática VIH-1 y, en consecuencia estimulan la integración del ADN viral, que se pueden usar para mejorar la transferencia de genes y la terapia génica cuando los vectores retrovirus, especialmente vectores VIH-1 derivados se utilizan.

45 **[0034]** El término "*inhibidor de VIH-1*", según los inventores se refiere preferentemente a cualquier droga que disminuye la infectividad del VIH por el mecanismo de integración posterior (es decir, después de la entrada, la transcripción inversa y la integración). Una lista no limitativa de inhibidores de la proteasa incluye: danuravir, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir. Un ejemplo específico es Ro 31-8959 (saquinavir).

50 **[0035]** El método para matar el VIH-1 en las células infectadas pueden estar en el cuerpo de un individuo y en ese caso el "contactar" es la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz como se describe anteriormente.

55 **[0036]** Hay que señalar que el método descrito en este documento es principalmente activo contra las células que contienen virus activos (infecciosos).

[0037] Las "*células infectadas VIH-1*" se refieren a cualquier tipo de células, incluyendo, pero no limitándose a: linfocitos, macrófagos, células dendríticas HeLa T2M-bl) etc.

60 **[0038]** El término "*un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: WTAVQMAVFIHNFKRK (INS), WTHLEGKILVAVHVA (INr-1) y WGSNFTSTTVKA (INr-2) o un derivado de estas secuencias*" se refiere al hecho de que la molécula puede contener dentro de la secuencia junta con secuencias de aminoácidos adicionales o restos que no son aminoácidos (tales como ácidos grasos). Los restos adicionales o secuencias de aminoácidos pueden añadirse a la secuencia para mejorar una de las siguientes: la penetración (en la célula), disminuir el aclaramiento, disminuir la degradación, mejorar la biodistribución, la disponibilidad biológica y la actividad específica.

5 [0039] El término "**derivado**" se refiere a una secuencia en la que se han suprimido uno o más aminoácidos (de regiones terminales o no terminales), sustituido (aminoácidos de origen natural, de origen no natural, en las configuraciones D o L, en sustituciones conservadoras o no conservadoras), modificado químicamente, añadir (a regiones no terminales), o a la secuencia en la que los enlaces de aminoácidos han sido modificados o sustituidos químicamente.

[0040] Típicamente "al menos uno" o "uno o más" se referirán a uno a 6, más preferiblemente de uno a cinco, uno a cuatro, uno a tres, uno o dos o uno (deleción, adición, sustitución o modificación química).

10 [0041] De acuerdo con los principios de la presente invención, los compuestos y composiciones de la invención son útiles en indicaciones en las que la destrucción selectiva de células infectadas por virus son beneficiosas.

15 [0042] Como resultado de los grandes avances en la química orgánica y en la biología molecular, muchos péptidos bioactivos pueden ahora prepararse en cantidades suficientes para uso farmacológico y clínico. Así, en los últimos años se han establecido nuevos métodos para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades en las que se han implicado péptidos. Sin embargo, el uso de péptidos como agentes terapéuticos y de diagnóstico está limitada por los siguientes factores: a) la penetración del tejido; b) baja estabilidad metabólica hacia la proteólisis en el tracto gastrointestinal y en el suero; c) la mala absorción después de la ingestión oral, en particular, debido a su alto peso molecular o la falta de sistemas de transporte específicos o ambas cosas; d) la excreción rápida a través del hígado y los riñones; y e) los efectos secundarios no deseados en los sistemas de órganos no objetivos, ya que los receptores de péptidos puede ser ampliamente distribuidos en el organismo. La presente invención proporciona péptidos bioactivos que superen las desventajas de péptidos como entidades terapéuticas por tener penetración en el tejido mejorado y orientar especificidad.

25 [0043] Los péptidos de la presente invención se sintetizan preferiblemente usando técnicas convencionales de síntesis conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante técnicas de síntesis química, incluyendo metodologías peptidomiméticas. Estos métodos incluyen la síntesis exclusiva en fase sólida, métodos parciales síntesis en fase sólida, condensación de fragmentos, síntesis en solución clásica. Procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y se describen además por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (2ª Ed., Pierce Chemical Company, 1984). Un artesiano experto puede sintetizar cualquiera de los péptidos de la presente invención mediante el uso de un sintetizador de péptidos automatizados usando química estándar como, por ejemplo, t-Boc o la química Fmoc. Los péptidos sintéticos se pueden purificar por cromatografía preparativa de líquido de alto rendimiento (Creighton T. 1983), y la composición de los cuales puede ser confirmada a través de la secuenciación de aminoácidos. Algunos de los péptidos de la invención, que incluyen sólo los aminoácidos naturales, además se pueden preparar utilizando técnicas de ADN recombinantes conocidas en la técnica. La conjugación de los restos peptídicos y de permeabilidad puede realizarse usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, ya sea por la química en fase sólida o en fase de solución. Algunos de los compuestos preferidos de la presente invención convenientemente se pueden preparar usando métodos de síntesis en fase de solución. Otros métodos conocidos en la técnica para preparar compuestos como los de la presente invención se pueden utilizar y están comprendidas en el alcance de la presente invención. Los péptidos sintéticos se caracterizan por espectrometría de masas, análisis de aminoácidos, secuenciación N-terminal o por cualquier otro método conocido en la técnica.

45 [0044] Versiones cíclicas de los péptidos se describen también en el presente documento. La ciclación de péptidos puede tener lugar por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo a través de grupos de amino libre y carboxílicos presentes en la secuencia del péptido, o a través de aminoácidos o restos adicionales para la ciclación. Los ejemplos no limitantes de tipos de ciclación son: cadena lateral de la ciclación de la cadena lateral, ciclación terminal de C a N, la cadena lateral de la ciclación terminal, y cualquier tipo de ciclación central incorporando al menos un residuo de amino ácido N^ω-sustituido como se describe por ejemplo en el documento WO 95/33765.

50 [0045] El resto de la permeabilidad de mejora de los conjugados puede estar conectado a cualquier posición en el resto peptídico, directamente o a través de un espaciador. La fracción de células de permeabilidad se puede conectar al extremo amino de la fracción de péptido. El espaciador conectivo opcional puede ser de variadas longitudes y conformaciones que comprenden cualquier química adecuada, incluyendo pero no limitándose a amina, amida, carbamato, tioéter, oxietter, enlace sulfonamida y similares. Los ejemplos no limitantes de tales espaciadores incluyen aminoácidos, derivados de sulfona amida, derivados de amino tiol y derivados de alcohol amino.

Definiciones

60 [0046] Por conveniencia y claridad ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos y reclamaciones se describen en este documento.

65 [0047] El término "péptido", tal como se usa aquí, se entiende para abarcar residuos de aminoácidos naturales, no naturales y/o modificados, cada residuo se caracteriza por tener un grupo amino y un extremo carboxi, conectado uno a otro por el péptido o enlaces no peptídicos. Los residuos de aminoácidos se representan a lo largo de la memoria descriptiva y reclamaciones por códigos de uno o de tres letras, como se conoce comúnmente en la

técnica. Los péptidos de la presente invención se utilizan preferiblemente en una forma lineal, aunque se apreciará que en los casos en que la ciclación no interfiere gravemente con las características de péptidos, formas cíclicas del péptido también pueden ser utilizadas.

5 **[0048]** Los aminoácidos utilizados en esta invención son los que están disponibles comercialmente o están disponibles por procedimientos de síntesis de rutina. Ciertos residuos pueden requerir métodos especiales para su incorporación en el péptido, y, enfoques sintéticos secuenciales, divergentes o convergentes a la secuencia de péptidos son útiles en esta invención. Aminoácidos naturales codificados y sus derivados se representan mediante códigos de tres letras de acuerdo con las convenciones de la IUPAC. Cuando no hay ninguna indicación, se pueden utilizar isómeros L o D.

15 **[0049]** Sustitución conservadora de aminoácidos es conocida por los expertos en la técnica. Sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen la sustitución de un aminoácido con otro que tenga el mismo tipo de grupo funcional o de la cadena lateral, por ejemplo, alifáticos, aromáticos, de carga positiva, con carga negativa. Estas sustituciones pueden aumentar la biodisponibilidad oral, de afinidad a la proteína diana, la estabilidad metabólica, la penetración en el sistema nervioso central, la orientación a poblaciones de células específicas y similares. Un experto reconocerá que sustituciones individuales, deleciones o adiciones a un péptido, polipéptido, o secuencia de proteína que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora", donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica.

20 **[0050]** Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras el uno para el otro.

25 **[0051]** También se divulgan sales de los péptidos, análogos y derivados químicos de los péptidos que se divulgan aquí.

30 **[0052]** Como se usa en este documento, el término "sales" se refiere tanto a sales o grupos carboxílicos y a sales de adición ácida de grupos de amino o guanido de la molécula de péptido. Las sales de grupos carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo sodio, calcio, amonio, férricas o de sales de zinc, y similares, y sales con bases orgánicas tales como sales formadas por ejemplo, con aminas tales como trietanolamina, piperidina, procaína, y similares. Sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Las sales describen aquí también componentes iónicos añadidos a la solución de péptido para mejorar la formación y/o mineralización de los minerales de calcio hidrogel.

35 **[0053]** Un "derivado", como se usa aquí se refiere a péptidos que contienen uno o más restos químicos no normalmente parte de la molécula de péptido tal como ésteres y amidas de grupos carboxi libres, derivados de acilo y alquilo de los grupos amino libres, ésteres de fosfato y éteres de los grupos hidroxilo libres. Tales modificaciones pueden introducirse en la molécula haciendo reaccionar los residuos aminoácidos diana del péptido con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. Derivados químicos preferidos incluyen péptidos que han sido fosforilados, C-terminales amidados o acetilado N-terminales. "Derivados" de los péptidos como se utiliza aquí cubren también los derivados que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales en los residuos o el grupos N- o C-terminal, por medios conocidos en la técnica, como el tiempo que permanezcan farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad del péptido y no confieren propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen. Estos derivados pueden, por ejemplo, incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo producidas por reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados por reacción con acilo derivados de restos (por ejemplo, alcanoilo o grupos aroilo carbocíclicos) o o-acilo de grupo hidroxilo libre (por ejemplo el de los residuos serilo o treonilo) formados por reacción con restos acilo.

40 **[0054]** El término "análogo de péptido" indica una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en este documento excepto por uno o más cambios de aminoácidos o una o más modificaciones/sustituciones de un enlace amida. Los análogos peptídicos incluyen sustituciones de aminoácidos y/o adiciones con residuos de aminoácidos naturales o no naturales, y modificaciones químicas que no se producen en la naturaleza. Los análogos peptídicos incluyen miméticos de péptidos. Un péptido mimético o "peptidomimético" significa que un péptido es modificado de tal manera que incluye al menos un residuo no codificado o un enlace no peptídico. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, la alquilación y la metilación más específica de uno o más residuos, inserción de o sustitución de aminoácido natural por aminoácidos no naturales, la sustitución de un enlace amida con otro enlace covalente. Un mimético de peptido puede comprender opcionalmente al menos un enlace que es un enlace amida de reemplazo como enlace de urea, enlace de carbamato, enlace sulfonamida, enlace de hidrazina, o cualquier otro enlace covalente. El diseño de "análogos" apropiadas puede ser asistido por ordenador. Análogos de péptidos adicionales pueden comprender un péptido específico o secuencia de análogo de péptido en un orden inverso, es decir, los aminoácidos se acoplan en la secuencia del péptido en un orden inverso a la orden de amino ácidos que aparece en

la proteína nativa o en un péptido o análogo específico identificado como activo. Ya sea no péptido completamente o parcialmente, los peptidomiméticos pueden proporcionar una disposición espacial de los restos químicos que se parece mucho a la disposición tridimensional de los grupos en el péptido en el que se basa el peptidomimético. Como resultado de esta estructura del sitio activo-similar, el peptidomimético tiene efectos sobre sistemas biológicos, que son similares a la actividad biológica del péptido.

[0055] Un residuo de aminoácido modificado es un resto de aminoácido en el que cualquier grupo o enlace se modificó por delección, adición, o sustitución con un grupo o enlace diferente, siempre y cuando la funcionalidad del resto de aminoácido es conservada o si ha sido funcionalmente cambiada (por ejemplo la sustitución de tirosina con fenilalanina sustituida), siempre que la modificación no altera la actividad del péptido que contiene el residuo modificado.

[0056] "Un conjugado peptídico" denota una molécula que comprende un VIH-1 en secuencia derivada a la que otro resto, ya sea peptídico o no peptídico, se une covalentemente, directamente o mediante un enlazador.

[0057] El término "enlazador" denota un resto químico cuyo propósito es enlazar, covalentemente, un resto de células de permeabilidad y un péptido o peptidomimético. El espaciador puede utilizarse para permitir distancia entre el resto de la permeabilidad de mejora y el péptido, o es un enlace químico de cualquier tipo. Enlazador significa un enlace químico directo o un espaciador.

[0058] "Permeabilidad" se refiere a la capacidad de un agente o sustancia de penetrar, impregnar, o difundirse a través de una barrera, membrana, o una capa de piel. Una "permeabilidad celular" o un resto de "célula-penetración" se refiere a cualquier molécula conocida en la técnica que es capaz de facilitar o mejorar la penetración de las moléculas a través de membranas. Ejemplos no limitativos incluyen: restos hidrófobos tales como lípidos, ácidos grasos, esteroides y compuestos aromáticos o alifáticos voluminosos; restos que pueden tener los receptores o transportadores de la membrana celular, como los esteroides, vitaminas y azúcares, aminoácidos naturales y no naturales, péptidos del transportador, nanopartículas y liposomas.

[0059] El resto hidrófobo puede comprender preferiblemente un resto lipídico o un resto aminoácido. Por ejemplo, el resto hidrófobo se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en: fosfolípidos, esteroides, esfingosinas, ceramidas, octil-glicina, 2-ciclohexilalanina, benzilfenilalanina, propionilo (C₃); butanoilo (C₄); pentanoilo (C₅); caproilo (C₆); heptanoilo (C₇); capriloilo (C₈); nonanoilo (C₉); caprilo (C₁₀); undecanoilo (C₁₁); lauroilo (C₁₂); tridecanoilo (C₁₃); miristoilo (C₁₄); pentadecanoilo (C₁₅); palmitoilo (C₁₆); ftanoilo ((CH₃)₄); heptadecanoilo (C₁₇); estearoilo (C₁₈); nonadecanoilo (C₁₉); araquidoilo (C₂₀); heneicosanoilo (C₂₁); behenoilo (C₂₂); trucisanoilo (C₂₃); y lignoceroilo (C₂₄); en el que dicho resto hidrófobo está unido a dicho polipéptido quimérico con enlaces amida, sulfhidrilos, aminas, alcoholes, grupos fenólicos, o enlaces carbono-carbono.

[0060] Otros ejemplos de fracciones lipídicas que pueden usarse: lipofectamina, transfectace, transfectam, citofectina, DMRIE, DLRIE, GAP-DLRIE, DOTAP, DOPE, DMEAP, DODMP, DOPC, DDAB, DOSPA, EDLPC, EDMPC, DPH, TMADPH, CTAB, lisil-PE, DC-Cho, colesterol alanil; DCGS, DPPES, DCPE, DMAP, DMPE, DOGS, DOHME, DPEPC, Pluronic, Tween, BRIJ, plasmalógeno, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, glicerol-3-etilfosfatidilcolina, propano-dimetil-amonio, propano trimetil amonio, propano dietilamonio, propano trietilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio, un esfingolípido, esfingomielina, un lisolípido, un glicolípido, un sulfátido, un glicoesfingolípido, colesterol, ésteres de colesterol, sal colesterol, aceite, N-succinildioleoilfosfatidiletanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicerol, 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol, 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerol, licerofosfatidiletanolamina 1-hexadecil-2-palmitoilglicerofosfatidiletanolamina, palmitoilhomocistina, N,N'-Bis (dodeciaminocarbonilmetileno)-N,N"-bis ((-N,N,N- trimetilamonio etilaminocarbonilmetileno) tetrayoduro de etilendiamina; N, N 'bis (metileno hexadecilaminocarbonilo) -N,N',N"tetra((-N,N,N-trimetilamonio-etilaminocarbonilmetileno)-N'- dietileno triamina hexaiodida amina; N , N'-Bis (dodecilaminocarbonilmetileno) -N,N"-bis ((-N,N, N-trimetilamonio etilaminocarbonilmetileno) citetrayoduro clohexileno-1,4-diamina; 1,7,7-tetra - ((-N,N,N,N-tetrametilamonioetilamino-carbonilmetileno) -3-heptaoidida hexadecilaminocarbonilmetileno-1,3,7-triaazaheptana; N,N,N',N'-tetra ((N,N,N-etilaminocarbonilmetileno trimetilamonio) -N'(carbonilmetileno 1,2-dioleoilglicero-3-fosfoetanolamino) dietilenetriamina tetrayoduro; dioleoilfosfatidiletanolamina, un ácido graso, un lisolípido, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, un esfingolípido, un glicolípido, un glucolípido, una sulfatida, un glicoesfingolípido, ácido fosfatídico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido oleico, un lípido que lleva un polímero, un lípido que lleva un sacárido sulfonado, colesterol, hemisuccinato tocoferol, un lípido con un ácido graso unido a éter, un lípido con un ácido graso unido a éster, un lípido polimerizado, fosfato de diacetilo, estearilamina, cardioplipina, un fosfolípido con un ácido graso de 6-8 átomos de carbono de longitud, con un fosfolípido de cadenas de acilo asimétricas, 6-(5-colesten-3b-iloxi)-1-tio-b-D-galactopiranosido, digalactosildiglicérido, 6-(5-colesten-3b-iloxi)hexil-6-amino-6-desoxi-1-tio-α-D-manopiranosido, 12-(((7'-dietil-amino-cumarina-3-il)carbonil)metilamino)ácido-octadecanoic; N-[12-(((7'-dietilaminocumarina-3-il)carbonil)metil-amino)octadecanoilo]-2-ácido aminopalmítico; colesteril)4'-trimetil-amonio) butanoato de metilo; N-succinildioleoil-fosfato fatidiletanolamina; 1,2-dioleoil-sn-glicerol; 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinil-glicerol; 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol, 1-hexadecil-2-palmitoilglicero-fosfoetanolamina, y palmitoilhomocisteína.

5 **[0061]** El término "vehículo fisiológicamente aceptable" o "diluyente" o "excipiente" se refiere a un fluido acuoso o no acuoso que es muy adecuado para preparaciones farmacéuticas. Además, el término "un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a al menos un vehículo o excipiente e incluye mezclas de portadores o excipientes. El término "terapéutico" se refiere a cualquier fármaco, fármaco o agente profiláctico que se puede usar en el tratamiento (incluyendo la prevención, diagnóstico, alivio o curación) de una enfermedad, aflicción, enfermedad o lesión en un paciente.

Farmacología

10 **[0062]** Aparte de otras consideraciones, el hecho de que los nuevos ingredientes activos de la invención son péptidos, análogos de péptidos o peptidomiméticos, dicta que la formulación sea adecuada para el suministro de estos tipos de compuestos. Aunque en péptidos generales son menos adecuados para la administración oral debido a la susceptibilidad a la digestión por los ácidos gástricos o las enzimas intestinales se están utilizando nuevos métodos, con el fin de diseñar y proporcionar análogos de peptidomiméticos biodisponibles metabólicamente estables y orales.

20 **[0063]** La composición farmacéutica de esta invención se puede administrar por cualquier medio adecuado, tal como por vía oral, por vía tópica, por vía intranasal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraarticular, intralesional o parenteral. Ordinariamente, se preferirá intravenoso (i.v.), intraarticular, tópico o parenteral.

[0064] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, trituración, pulverización, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización .

25 **[0065]** Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

30 **[0066]** Las composiciones farmacéuticas, que pueden usarse por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes.

40 **[0067]** Para la inyección, los compuestos de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosal, los penetrantes apropiados a la barrera a permear se utilizan en la formulación. Tales penetrantes, por ejemplo polietilenglicol, son generalmente conocidos en la técnica.

45 **[0068]** Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, las soluciones de azúcar concentradas pueden usarse, que pueden contener opcionalmente goma árabe, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Colorantes o pigmentos pueden añadirse a los comprimidos o recubrimientos de las grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

50 **[0069]** Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

55 **[0070]** Para la administración por inhalación, las variantes para uso de acuerdo con la presente invención se presentan convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano , dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del péptido y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

60 **[0071]** Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los ingredientes activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Portadores naturales o sintéticos adecuados son bien conocidos en la técnica (Pillai et al., 2001). Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos, para permitir la preparación de soluciones muy concentradas. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[0072] Los compuestos de la presente invención también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

5 [0073] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el objetivo pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de un compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad del sujeto que está siendo tratado. Determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

10 [0074] La toxicidad y la eficacia terapéutica de los péptidos descritos en la presente memoria se puede determinar mediante procedimientos estándar farmacéuticos en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, mediante la determinación de la IC50 (la concentración que proporciona una inhibición del 50%) y la LD50 (dosis letal que causa la muerte en 50% de los animales ensayados) para un compuesto sujeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y dosificación pueden ser escogidas por el médico individual en vista de la condición del paciente.

15 [0075] Las dosis preferidas para la administración de tales composiciones farmacéuticas varían de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso. Preferiblemente, la cantidad del ingrediente activo está en el intervalo de aproximadamente 10 a 5000 mg/kg.

20 [0076] Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser también una administración única de una composición de liberación lenta, con el curso de tratamiento que dure desde varios días a varias semanas o hasta que la curación se efectúe o se alcance la disminución de la enfermedad. La cantidad de una composición a administrar, por supuesto, dependerá del sujeto a tratar, de la gravedad de la afección, la manera de administración, el juicio del médico que prescribe, y todos los otros factores relevantes.

EJEMPLOS

25 [0077] Los siguientes ejemplos demuestran la actividad de los péptidos de la presente invención en la estimulación de la actividad IN y la matanza selectiva de VIH-1 de las células infectadas.

Expresión y purificación de proteínas

30 [0078] Expresión y purificación de histidina de etiquetado Rev-GFP se realizaron como se ha descrito previamente (Fineberg et al., 2003, Biochemistry 42, 2625-2633). El vector de expresión marcado con histidina ha sido un generoso regalo del Dr. A. Engelman (Departamento de Inmunología del cáncer y el SIDA, Dana-Farber Cancer Institute, División de SIDA, la Escuela de Medicina de Harvard, Boston, Massachusetts, Estados Unidos de América) y su expresión y purificación se realizaron esencialmente como se describe en Jenkins et al. (1996, J Biol Chem 271, 7712-7718).

Células cultivadas de mamíferos

35 [0079] Las células en monocapa adherente HeLa, HEK293T, y células HeLa MAGI (Derdeyn et al., 2000, J Virol 74, 8358-8367), que expresa el gen β -galactosidasa bajo la regulación del elemento de respuesta de transactivación (Kimpton 1992, J Virol 66, 2232-2239) fueron cultivadas en la Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Las líneas celulares de linfocitos T Sup-T1 y H9 se cultivaron en medio RPMI 1640. Las células fueron proporcionadas por el Programa de reactivos NIH, División de SIDA, NIAID, NIH, EE.UU., y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Todos los medios se complementaron con 10% (v/v) de suero fetal de ternera, 0,3 g/l de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina (Biological Industries, Beit Haemek, Israel).

Síntesis de péptidos, etiquetado y purificación

40 [0080] Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (ABI) 433A. Para los estudios de absorción celular, los péptidos se marcaron con fluoresceína en su extremo N-terminal (Hayouka et al., 2007, Proc Natl Acad Sci U S A 104, 8316-8321). Los péptidos también se marcaron con Trp en su extremo N-terminal para la espectroscopia UV. La purificación del péptido se realizó en un Gilson HPLC usando una columna semi-preparativa C8 de fase inversa (ACE, tecnologías de cromatografía avanzada, EE.UU.) con un gradiente de 5% a 60% de acetonitrilo en agua (ambos conteniendo 0,001% v/v de ácido trifluoroacético). Concentraciones de péptido se determinaron usando un espectrofotómetro UV (Shimadzu Kyoto, Japón) como se describe anteriormente (Kohler, 1989, Plant Mol Biol 12, 189-199).

Los virus

[0081] De tipo salvaje VIH-1 fue generado mediante transfección (Cullen BR, 1987, Methods Enzymol 152, 684-704) de las células HEK293T con plásmido pSVC21 que contiene el ADN viral de VIH-1_{HXB2} de longitud completa (Ratner et al., 1985, Nature 313, 277-284). Virus de tipo salvaje y Δ env/vSV-G (Gummuluru et al., 2000, J Virol 74, 10882-10891) se cosecharon a partir de células HEK293T 48 y 72 h después de la transfección con pSVC21 Δ env. Los virus se almacenaron a -75°C.

Ensayos de unión basados en ELISA

[0082] La unión proteína-péptido se estimó usando un ensayo de unión basado en ELISA tal como se describe anteriormente (Rosenbluh et al., 2006, Anal Biochem 352, 157-168). Brevemente, placas Maxisorp (Nunc) se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h con 200 ml de 10 mg de péptido sintético / ml en tampón carbonato. Después de la incubación, se eliminó la solución, se lavaron las placas tres veces con PBS, y 200 ml de 10% de BSA en PBS (w/v) se añadió durante 2 h a temperatura ambiente. Después del segundo lavado con PBS, Rev-GFP, GFP solo o conjugado con biotina-BSA-péptido (disuelto en PBS que contiene 10% de BSA para dar las concentraciones apropiadas), se añadieron de una incubación adicional durante 1 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS, la concentración de moléculas de biotinilado unido se estimó después de la adición de peroxidasa de estreptavidina de rábano picante (HRP) conjugada (Sigma), como se describe anteriormente (Melchior et al., 1993, J Cell Biol 123, 1649-1659). La concentración de moléculas de proteína unida se calcula después de la adición de anticuerpo de ratón anti-GFP (Santa Cruz) que después se interactuó con anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con HRP. La actividad enzimática de HRP se estimó mediante el control de la densidad óptica del producto (OD) a 490 nm usando un lector de placas de ELISA (Tecan Sunrise). Cada medición se realizó al menos por duplicado.

Determinación de la actividad de integrasa

[0083] El ensayo de actividad enzimática IN se realizó usando un sistema de ensayo descrito anteriormente (Craigie et al., 1991, Nucleic Acids Res 19, 2729-2734, Hwang et al., 2000, Nucleic Acids Res 28, 4884 hasta 4892). Brevemente, el sustrato de oligonucleótido consistía en un oligo (5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACACTGACTAAAAGGGTC-3') marcado con biotina en el extremo 3' y el otro oligo (5'-GACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3') marcado con digoxigenina en el extremo 5'. Cuando se estudió la inhibición, la IN se preincubó con el péptido o proteína para 15 min antes de la adición del sustrato de ADN. La reacción entera se siguió mediante ensayo de inmunoabsorción sobre placas recubiertas con avidina como se describió previamente (Rosenbluh et al., 2007, J Biol Chem 282, 15743 a 15753).

Experimentos de penetración de células

[0084] Los péptidos marcados con fluoresceína a una concentración final de 10 μ M en PBS se incubaron con células HeLa durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados en PBS, las células se visualizaron mediante una microscopía confocal como se describe previamente (Rosenbluh et al., 2007, J Biol Chem 282, 15743 a 15753).

Efecto de los péptidos sobre la viabilidad celular utilizando el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio)

[0085] Después de la incubación de las células con los péptidos indicados, se retiró el medio y las células se incubaron adicionalmente en solución de Earl que contenía 0,3 mg/ml de MTT durante 1 h. Posteriormente, la solución se retiró y las células se disolvieron en 100 μ l de DMSO durante 10 min a temperatura ambiente. Las células con DMSO solubilizado se transfirieron a una placa de 96 pocillos ELISA y los valores de OD se controlaron a una longitud de onda de 570 nm.

Titulación VIH-1 por activación multinuclear de un ensayo de indicador de galactosidasa (MAGI)

[0086] Valoración cuantitativa del VIH-1 se llevó a cabo utilizando el ensayo de MAGI, como se describe por Kimpton y Emerman (J Virol 1992, 66, 2232-2239). Brevemente, se cultivaron células TZM-bl en placas de 96 pocillos a 1 x 10⁴ células por pocillo y después de 12 h de incubación a 37°C, se añadieron péptidos; después de 2 h adicionales de incubación, las células se infectaron con 50 μ l de virus diluido en serie (VIH-1 Δ env/vSV-G o de tipo salvaje del VIH-1 que se obtuvo de linfocitos infectados cada 2 días) como se describe (Kimpton 1992, J Virol 66, 2232-2239). Dos días después de la infección (PI), las células cultivadas se fijaron y se estimó β -galactosidasa como se describe anteriormente. Células azules fueron contadas bajo un microscopio óptico con un aumento de 200X.

Infeción de células de linfocitos cultivados con VIH-1

[0087] Linfocitos cultivados (1 x 10⁵) se centrifugaron durante 5 min a 2000 rpm y después de la eliminación del sobrenadante, las células se resuspendieron en 0,2 a 0,5 ml de medio RPMI 1640 que contiene el virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01, 0,1 y 5. Después de la absorción durante 2 horas a 37°C, las células se

lavarón para eliminar el virus no unido y después se incubaron a la misma temperatura durante un período adicional de 1 a 8 días.

Estimación cuantitativa de la infección por VIH-1 mediante la determinación de p24 extracelular

[0088] Las células linfoides se incubaron con los péptidos indicados durante 2 h y después de la infección con VIH-1 de tipo silvestre a una MOI de 0,01 (como se describió anteriormente), las células se incubaron durante 8 días, o 48 h a una MOI de 1. La cantidad de proteína p24 se estimó en el medio de células cada 2 días exactamente como se describe anteriormente.

Análisis de PCR de los genes virales tempranos

[0089] Las células Sup-T1 fueron incubadas con 12,5 μ M de péptidos o con azidotimidina 2 μ M (AZT) durante 2 h y después se infectaron con VIH-1 virus Δ env/VSV-G a una MOI de 2 y se incubaron adicionalmente durante 6 h. El Gag viral o secuencias de ADN Nef fueron amplificadas utilizando cebadores específicos: cebadores Gag-específicos, 5'-AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATG-3' y 5'-TGCTATGTCAGTCCCTTGGTTCTC-3', y los cebadores Nef-específicos, 5'-CCTGGCTAGAAGCACAAGAG-3' y 5'-CTTGTAGCAAGCTCGATGTC-3'. Los fragmentos se amplificaron a partir de 10 ng de ADN total de células en una mezcla de reacción de 25 μ l que contiene tampón 1X PCR, 3,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, cebadores 300 nM, y 0,025 unidades/ μ l de polimerasa Taq. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una etapa de activación desnaturalización del ADN y la polimerasa de 5 min a 95°C y luego 29 ciclos de amplificación (95°C durante 45 s, 60°C durante 30 s, 72°C durante 45 s).

El análisis cuantitativo de los números de copias de VIH-1 ADN integrado en el genoma celular

[0090] La reacción de integración se estimó esencialmente como se describe anteriormente (Rosenbluh et al., 2007, J Biol Chem 282, 15.743-15.753). En pocas palabras, después de la incubación de los péptidos indicados con células H9 o Sup-T1 para 2 h, las células fueron infectadas con un virus VIH-1 Δ env/vSV-G a una MOI de 5 (como se describe anteriormente) durante 24 h o con VIH-1 de tipo silvestre a una MOI de 0,01 durante 8 días. Secuencias integradas de VIH-1 fueron amplificadas por dos pasos de replicación de PCR utilizando el VIH-1 de cebador LTR-específico (LTR-TAG-F 5'-ATGCCACGTAAGCGAACTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTG-3') y los cebadores de orientación Alu (primero-Alu-F 5'-AGCCTCCCGAGTAGCTGGGA-3' y primero-Alu-R 5'-TTACAGGCATGAGCCACCG-3') (Yamamoto et al., 2006, Virus Genes 32, 105-113). Fragmentos Alu-LTR se amplificaron a partir de 10 ng de ADN total de células en una mezcla de reacción de 25 μ l que contiene tampón de PCR 1X, 3,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, cebadores 300 nM, y 0,025 unidades/ml de polimerasa Taq. La primera ronda de las condiciones del ciclo de PCR fueron como sigue: una etapa de activación de desnaturalización del ADN y la polimerasa de 10 min a 95°C y luego 12 ciclos de amplificación (95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s, 72°C durante 5 minutos).

[0091] Durante la PCR de segunda ronda, el producto de primera ronda de PCR se podría amplificar específicamente utilizando el cebador específico tag (tag-F-5'-ATGCCACGTAAGCGAACTC-3') y el cebador LTR (LTR-R 5'-AGGCAAGCTTTATTGAGGCTTAAG-3') diseñado por PrimerExpress (Applied Biosystems) utilizando la configuración predeterminada. La PCR de la segunda ronda se realizó en 1/25a del producto de primera ronda de PCR en una mezcla que contiene 300 nM de cada cebador, 12,5 μ l de 2X SYBR mezcla master Green (Applied Biosystems) en un volumen final de 25 μ l, se ejecutan en un ABI PRIZM 7700 (Applied Biosystems). Los ciclos de PCR de la segunda ronda se inició con la desnaturalización del ADN y una etapa de activación de la polimerasa (95°C durante 10 min), seguido de 40 ciclos de amplificación (95°C durante 15 s, 60°C durante 60 s).

[0092] Para la generación de una curva de calibración estándar, el plásmido SVC21 que contiene el ADN viral de VIH-1_{HXB2} de longitud completa se usó como plantilla. En la primera ronda de PCR se utilizaron los cebadores LTR-TAG-F y LTR-R de PCR y de la segunda ronda se llevó a cabo utilizando los cebadores tag-F y LTR-R. La curva lineal estándar estaba en el intervalo de 5 ng a 0,25 fg (R = 0,99). Las muestras de ADN se analizaron con cuadrúpedos de cada muestra. Los equivalentes de células en el ADN de la muestra se calcularon sobre la base de la amplificación del gen 18S por PCR en tiempo real como se describe en (Field et al, 2002, Biochem J 368, 855-864).

[0093] Todos los resultados descritos en los ejemplos son los promedios de al menos tres determinaciones, donde la desviación estándar nunca excedió \pm 20%.

Ejemplo 1: Selección de péptidos derivados-IN

[0094] La selección de secuencias de péptidos que interactúan con la proteína Rev, péptidos derivados de Rev, y el mismo fue hecho por el cribado de una biblioteca de péptidos IN (Investigación NIH SIDA y Programa de Reactivos de Referencia, División de SIDA, NIAID, NIH: VIH-1 Consenso B Pol (15-mer) péptidos - Juego completo de DAIDS, NIAID), utilizando un sistema de ensayo basado en ELISA. Tres péptidos derivados IN (INS, INr-1, INr-2), fueron identificados que específicamente interactuaron con la proteína Rev etiquetada con la proteína fluorescente verde

(Rev-GFP). Uno de los péptidos identificados (INS) se encontró también para interactuar con la proteína IN sí misma. La secuencia de aminoácidos y los patrones de unión de los péptidos identificados se muestran en la Tabla 1 y en la Fig 1A. Los resultados en la Fig 1B muestran que la adición de péptidos INS o INrs para el complejo formado entre IN y Rev-GFP induce la liberación de la cota Rev-GFP. Esta observación confirmó además que la secuencia de los péptidos de INS y INrs dentro de la proteína en mediar la interacción con la proteína Rev. El péptido de INS interactuado con péptidos Rev 13-23 y 53-67 Rev, mientras INr-1 y el INr-2 interactuaron con los péptidos Rev 53-67 y 13-23 Rev respectivamente (Fig 1D y Tabla 1). Como se muestra en la figura 1D, INr-1 interactuaba con el péptido Rev 53-67, pero no con el péptido 13-23 Rev, mientras INr-2 interactuó con Rev 13-23, pero no con Rev 53-67, lo que indica la especificidad de la interacción. Esto se dedujo a partir de experimentos que muestran que biotinilado-BSA-Rev 13-23 o 53-67 Rev conjugados eran capaces de interactuar con placas revestidas con péptidos del INS o INr (Fig 1C y 1D). No se observó unión con el control de biotina-BSA sola (Fig 1C y 1D), lo que indica la unión específica al péptido de INS.

[0095] Figura 1: 1A - Rev-GFP o GFP sola se incubaron en placas de ELISA recubiertas con cualquiera INr-1 (◆, ◇, respectivamente), INr-2 (□, □, respectivamente) o INS (▲, ▲, respectivamente) y se determinó como se ha descrito anteriormente. **1B** - la proteína IN estaba obligado primero a la placa de ELISA y después se incubó con Rev-GFP para obtener un complejo Rev-IN. A continuación, el complejo se incubó con uno de los péptidos o el péptido INR INS en el designado Rev-GFP: relación de péptido. A continuación, los pocillos se lavaron y la cantidad de límite Rev-GFP se determinó por ratón de anticuerpo anti-GFP y el anticuerpo conjugado con HRP anti-ratón de conejo secundario. **1C** - Rev 13-23 y Rev 53-67 (conjugado con biotina-BSA) (▲, ▲, respectivamente) se incubaron en placas de ELISA recubiertas con el INS y la unión se calculó como se describe en Materiales y Métodos. **1D** - Rev 13-23 y Rev 53-67 (conjugado con biotina-BSA) se incubaron en placas de ELISA recubiertas con cualquiera de INr-1 (◇, ◆, respectivamente) o INr-2 (□, □, respectivamente) y la unión se estimó como se describe anteriormente. Todas las demás condiciones experimentales fueron como se describe previamente (Armon-Omer et al., 2008, J Mol Biol 376, 971-982) y por encima.

Tabla 1:

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.	Residuos IN	Enlace
INS	WTAVQMAVFIHNFKRK	6	W (174-188)	IN Rev-GFP Rev 13-23 Rev 53-67
INr-1	WTHLEGKIILVAVHVA	7	W (66-80)	Rev-GFP Rev 53-67
INr-2	WGSNFTSTTVKA	5	W (118-128)	Rev-GFP Rev 13-23

Ejemplo 2: Abrogación específica del efecto inhibitor de la proteína Rev y péptidos derivados Rev en la actividad enzimática IN, por los péptidos del INS y INrs

[0096] Los resultados representados en la figura 2A muestran claramente que la actividad enzimática IN es inhibida por Rev-GFP (GFP designa la proteína fluorescente verde usada para marcar la proteína/péptido) debido a la interacción específica con la proteína Rev en sí y no con el GFP (Fig 2A). En una relación Rev-GFP:IN (mol/mol) de aproximadamente 100, ya se observó aproximadamente una inhibición del 30%, llegando a la inhibición de 70% en una proporción de 400 (Fig 2A). Curiosamente, los péptidos del INS y INrs abrogaron las actividades inhibitoras de Rev-GFP (Figura 2B y C). Los resultados en la figura 3 confirman los resultados previamente descritos (Rosenbluh et al., 2007, J Biol Chem 282, 15743-15753) que muestran que los péptidos derivados de Rev (Rev 13-23 y Rev 53-67) bloquearon la actividad enzimática, alcanzando inhibición de 60 a 70% en una relación péptido:IN (mol/mol) de alrededor de 150 (Fig 3) es también evidente que los péptidos de INS y INrs fueron capaces de anular el efecto inhibitor de los péptidos Rev derivados sobre la actividad de la integrasa. La actividad de integrasa fue completamente restaurado en presencia del péptido de INS en una relación molar de Rev: INS péptido de 1:5 e incluso estimular la actividad IN en una relación molar de 1:10 (Fig 3A). Como se esperaba de su especificidad de interacción (véase la Tabla 1) INr-1 abrogó el efecto inhibitorio del péptido Rev 53-67 mientras INr-2 ejerció por el péptido Rev 13-23 y restauró completamente la actividad de la integrasa en una relación molar de 1:10 (Fig 3B y C). Esto parece ser debido a la capacidad del INS para interactuar específicamente con Rev-GFP y los péptidos

derivados de Rev, puesto que la incubación con un péptido codificado no restauró la actividad de la integrasa (Fig. 2B y C).

5 **[0097] Figura 2 (A)** Rev-GFP (verde oscuro) o GFP (turquesa) se incubaron en diferentes relaciones molares con IN (390 nM) y la actividad enzimática fue determinada como se describe anteriormente. **(B)** Rev-GFP se preincubó con el péptido INS indicado en una relación molar de 5:1 (péptido: Rev-GFP) y se añadió la mezcla resultante a una solución que contiene IN para dar una relación molar de 1:200 y 1:400 (IN:Rev-GFP). Después de un período de incubación, la actividad IN se estimó como se describe anteriormente. **(C)** Igual que **(B)**, pero con los péptidos INrs.

10 **[0098] Figura 3 A-C** IN (390 nM) se incubó con 50 mM de los péptidos derivados de Rev (1:300 IN:péptido derivado de Rev, Rev13-23 o Rev 53-67) y después se añadió el péptido de INS en diferentes relaciones molares que van desde 10:1 a 1:10 (péptido Rev:péptido INS) **(A)** IN (390 nM) se incubó con 50 μ M de los péptidos derivados de Rev (1:300 IN:péptido derivado de Rev), (Rev 13-23 **(B)** y Rev 53-67 **(C)**) y después se añadieron los péptidos INr en diferentes relaciones molares que van desde 10:1 a 1:10 (péptido Rev: péptido INr).

15 **Ejemplo 3: Péptidos INS y INRS son permeables a las células y estimulan la producción de virus y la integración del genoma del VIH-1 en células cultivadas.**

20 **[0099]** Es evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 4A que los péptidos del INS y INrs son péptidos permeables a las células. Los resultados demuestran además que otro péptido que tiene la secuencia de RCWLQMWQESFDLVAMLGDT (SEQ ID NO:8), designado IN-3 (Armon-Omer et al, 2008, J. Mol Biol 376, 971-982.), de aproximadamente el mismo tamaño, fallaron a la hora de penetrar en las células HeLa cultivadas indican claramente la integridad de las membranas plasmáticas de las células, así como su viabilidad (véase también la figura 4B y C). No se observó ningún efecto tóxico cuando se incubaron estos tres péptidos, hasta aproximadamente 25 62μ M, ya sea con células HeLa TZM-bl (Fig 4B) o linfocitos de células T H9 (Fig 4C).

30 **[0100]** La estimulación de integración de virus por los péptidos INS y INrs se observó cuando se ensayó por la aparición del antígeno p24 viral en células cultivadas H9 y Sup-T1 (Fig 5A y B). La misma estimulación también se observó cuando la eficiencia de la infección se determinó mediante la aparición de partículas virales infecciosas (Figs 5C y D).

35 **[0101]** Se observó estimulación del proceso de integración por los péptidos del INS y INrs cuando se estimó la inserción del ADN viral en el huésped ADN directamente 24 horas después de la infección (PI). Como puede verse en la Fig 6, se obtuvo una estimulación de integración por célula de ca. 2 a 5 veces después de un solo ciclo de infección viral con el INS (Fig 6A) y con INrs (Fig 6B).

40 **[0102] Figura 4 (A)** Péptidos marcados con fluoresceína (10 μ M) de INr-1, INr-2, INS o IN-3, péptido no permeable se incubaron durante 2 horas a 37°C con células HeLa. Después, las células se lavaron tres veces con PBS y se visualizaron mediante un microscopio confocal. **(B)** Toxicidad celular como se determinó mediante el ensayo de MTT, se encontró que los péptidos INS y INrs no eran tóxicos en las concentraciones medidas en células TZM-bl HeLa. **(C)** igual a **(B)**, pero en linfocitos H9.

45 **[0103] Figura 5 A-D** La INRS o INS (12,5 μ M) se incubaron con células H9 **(A y C)** y las células de linfocitos Sup-T1 **(B y D)** que fueron infectadas con VIH-1 como se describe anteriormente. La cantidad de P24 viral **(A y B)** y el título de virus **(C y D)** se determinaron cada 2 días por ensayo de ELISA y MAGI (Kimpton 1992, J Virol 66, 2232-2239), respectivamente. La concentración de la azidotimidina (AZT) usada fue de 2 μ M.

50 **[0104] Figura 6 (A)** Células H9 T-linfoides se incubaron con el péptido de INS en las concentraciones designadas o AZT (2 μ M) y después de la infección por VIH-1, el ADN/célula viral integrada se evaluó mediante PCR en tiempo real después de un solo ciclo de infección a una MOI de 0,5 a 5 de Δ env/VSV-G HIV-1. **(B)** Células H9 T-linfoides se incubaron con los péptidos indicados (12,5 μ M) o AZT (2 μ M) y después de la infección por VIH-1, el ADN/célula viral integrada se evaluó mediante PCR a tiempo real después de un solo ciclo de infección a una MOI de 5 de Δ env/vSV-G HIV-1.

55 **Ejemplo 4: Promoción de la muerte celular selectiva por los péptidos del INS y INrs en las células infectadas por virus, pero no en las células de control no infectadas**

60 **[0105]** Los resultados en la Fig 7 muestran que el péptido de INS induce la lisis, es decir, la muerte celular, de células infectadas por virus pero no de las células no infectadas de control. Como puede verse, sólo alrededor del 20-30% y aproximadamente el 100% de células Hela infectadas y no infectadas viables intactas respectivamente quedaron después de la incubación con 12,5 μ M del péptido INS. Es más, al determinar la cantidad de muerte celular después de un ciclo de infección claramente se ve que el INS y/o INrs 62,5 a 150 μ M inducen la muerte solamente de las células de linfocitos infectados. Este efecto se incrementa cuando una mezcla de los péptidos se añadió a las células como se muestra en la Fig 8. Puesto que se utilizó un ciclo de infección no hay producción de nuevos virus, por lo tanto, la muerte de las células es debida a la integración múltiple inducida por la INS y los péptidos INRS. Estos resultados muestran claramente que el INS y los péptidos INRS causan la muerte selectiva de

65

las células infectadas por el virus por lo tanto puede servir como un péptido líder para obtener moléculas pequeñas que eliminarán selectivamente las células infectadas por virus y por lo tanto funcionan como medicamento contra el VIH.

5 **[0106] Figura 7** Porcentaje de células HeLa infectadas y no infectadas viables normalizadas cada dos días al número de células en la muestra de células no tratadas no infectadas. Las células fueron infectadas con WT VIH-1 a una MOI de 0,01 y se añadieron las células tratadas 12,5 μ M de INS.

10 **[0107] Figura 8** Células fueron tratadas con péptidos INS o INrs o una mezcla de los tres péptidos en la concentración designada a continuación, las células se infectaron con MOI 10 de Δ ENV/VSV-G de VIH-1 que promueve un solo ciclo de infección. La prueba MTT se llevó a cabo después de la infección 48 h, y los valores se normalizaron a células no tratadas no infectadas.

15 **Ejemplo 5: Una combinación de péptidos INrs +INS y el inhibidor de proteasa de VIH-1 específica Ro 31-8959 erradica el VIH -1**

20 **[0108]** Los resultados en la Fig 9 muestran que cuando los linfocitos H9 fueron tratados con una combinación de INr-1, INr-2 y el INS y el inhibidor de proteasa de VIH-1 Ro 31 a 8.959, no se detectó ningún rastro de integración de virus o producción de virus después de 12 días. Parece que esta combinación da lugar a una completa erradicación del virus.

25 **[0109] Figura 9** células H9 fueron tratadas por el compuesto indicado (péptidos a 100 μ M cada uno, el AZT a 2 μ M o Ro31-8959 a 1 μ M. Cóctel representa una mezcla o INS, INrs y Ro31-8959) e infectada con MOI de 0,1 en peso de VIH-1. Se estimaron cada 2 días la cantidad de partículas de virus infecciosas (A) y la cantidad de eventos de integración por célula (B) como se describe anteriormente.

30

35

40

45

50

55

60

65

LISTADO DE SECUENCIA

5 <110> Yissum Research Development Company, de la Universidad
Hebrea de Jerusalén

<120> PÉPTIDOS Y COMPOSICIONES DERIVADOS DE VIH-1 INTEGRASA

10 <130> YISSUM/071 PCT

<150> US PROV 61/103036
<151> 2008-10-06

15 <160> 8

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 1

30 His Leu Lys Thr Ala Val Gln Met Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys
1 5 10 15

Arg

35 <210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético

45 <400> 2

Gly Ser Asn Phe Thr Ser Thr Thr Val Lys Ala
1 5 10

50 <210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 3

60 Thr Ala Val Gln Met Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg Lys
1 5 10 15

65 <210> 4

5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

10
 <400> 4
 Thr His Leu Glu Gly Lys Ile Ile Leu Val Ala Val His Val Ala
 1 5 10 15

15
 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Péptido sintético

25
 <400> 5
 Trp Gly Ser Asn Phe Thr Ser Thr Thr Val Lys Ala
 1 5 10

30
 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Péptido sintético

40
 <400> 6
 Trp Thr Ala Val Gln Met Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg Lys
 1 5 10 15

45
 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Péptido sintético

55
 <400> 7
 Trp Thr His Leu Glu Gly Lys Ile Ile Leu Val Ala Val His Val Ala
 1 5 10 15

60
 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65
 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 8

5

Arg Cys Trp Leu Gln Met Trp Gln Glu Ser Phe Asp Leu Val Ala Met
1 5 10 15

10

Leu Gly Asp Thr
20

15

20

25

30

35

40

45

50

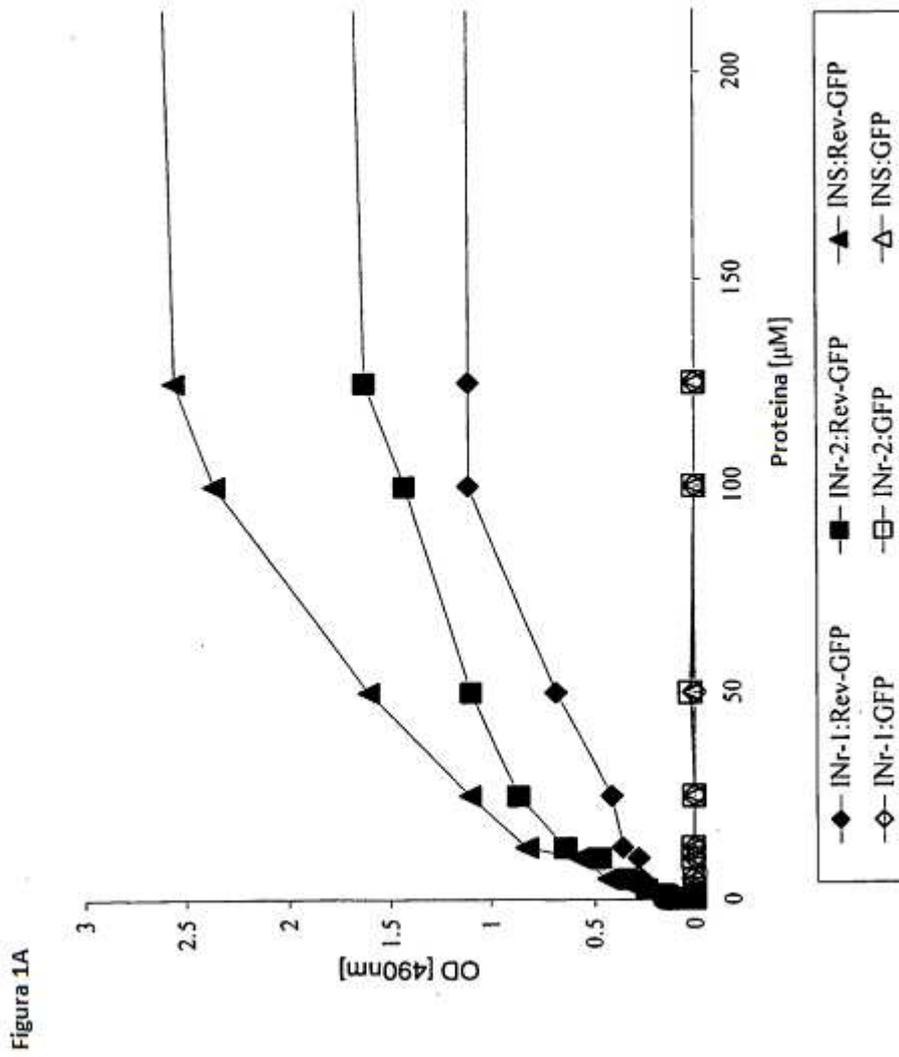
55

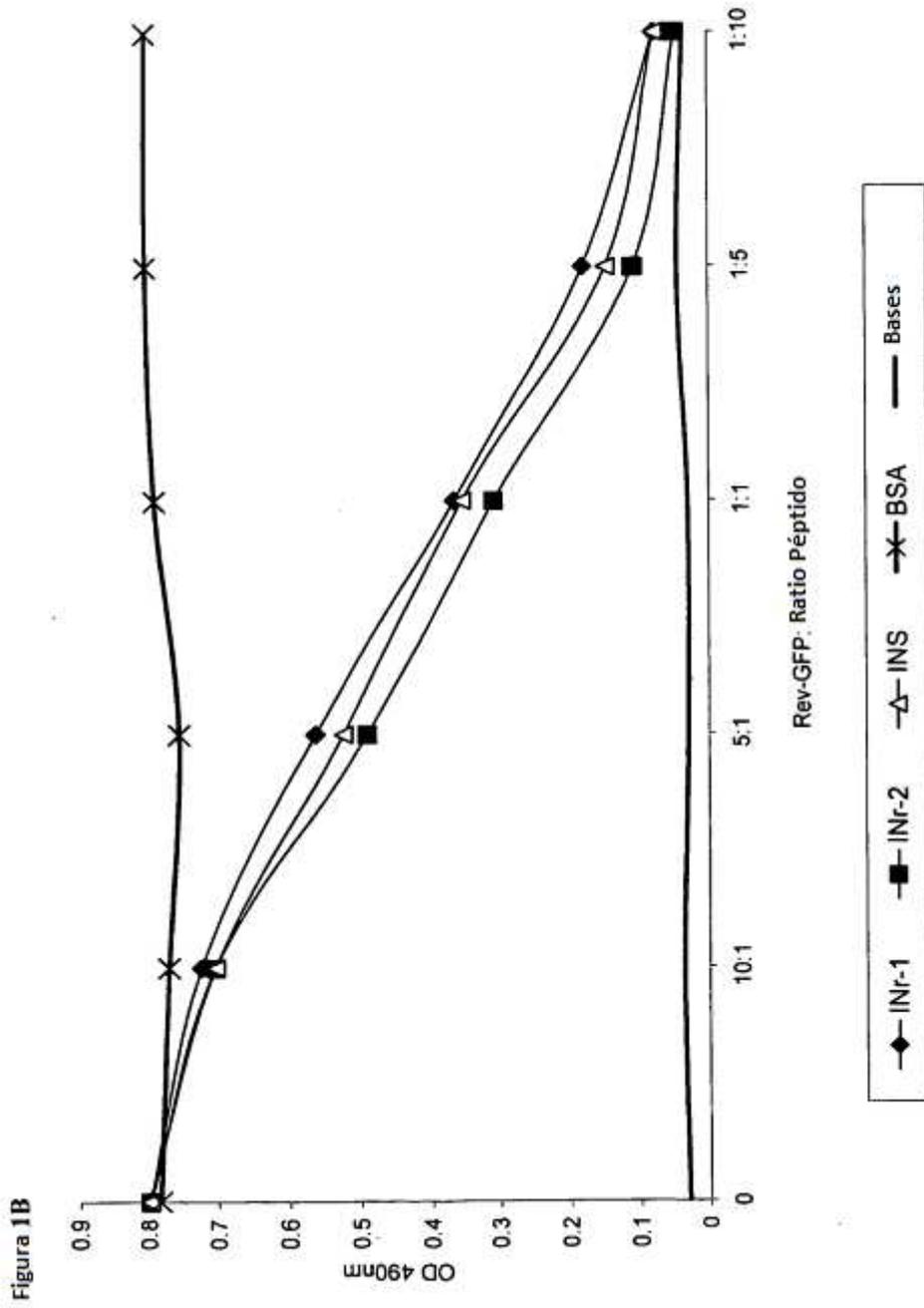
60

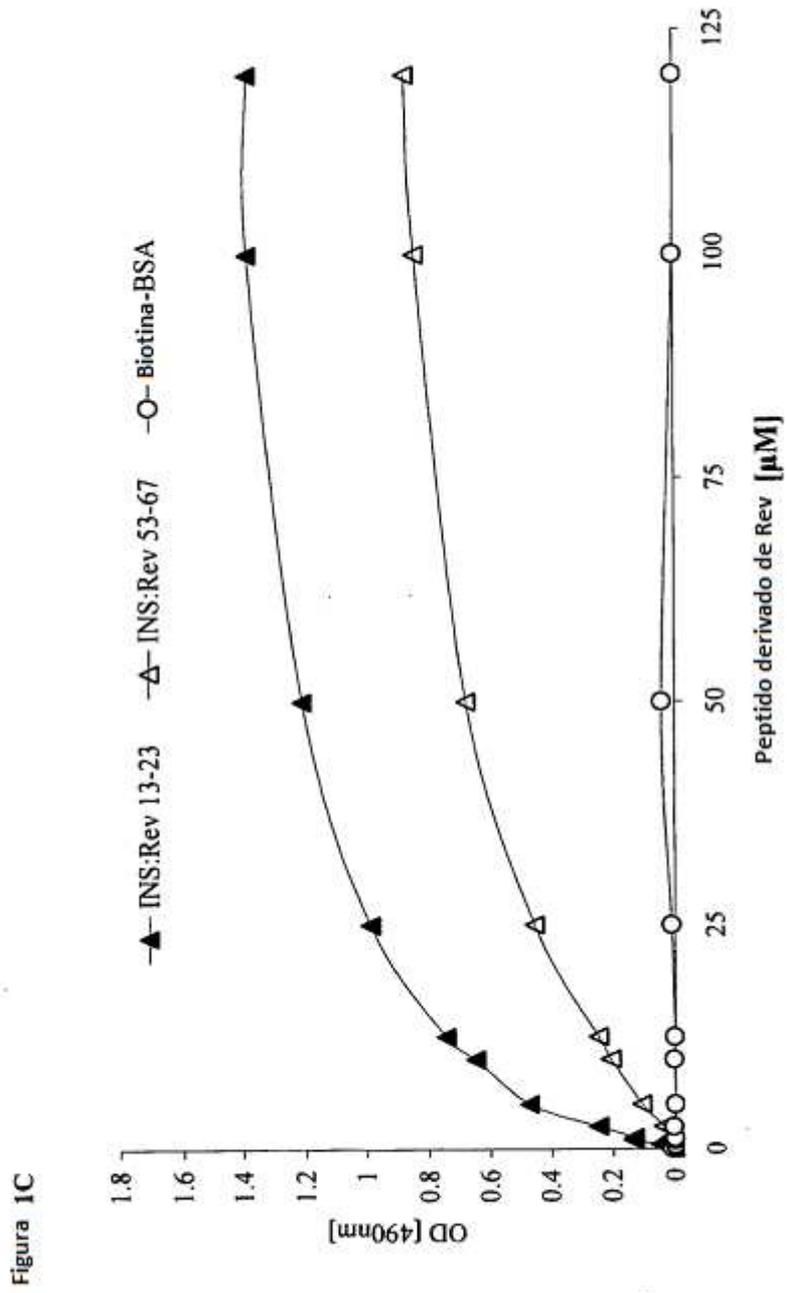
65

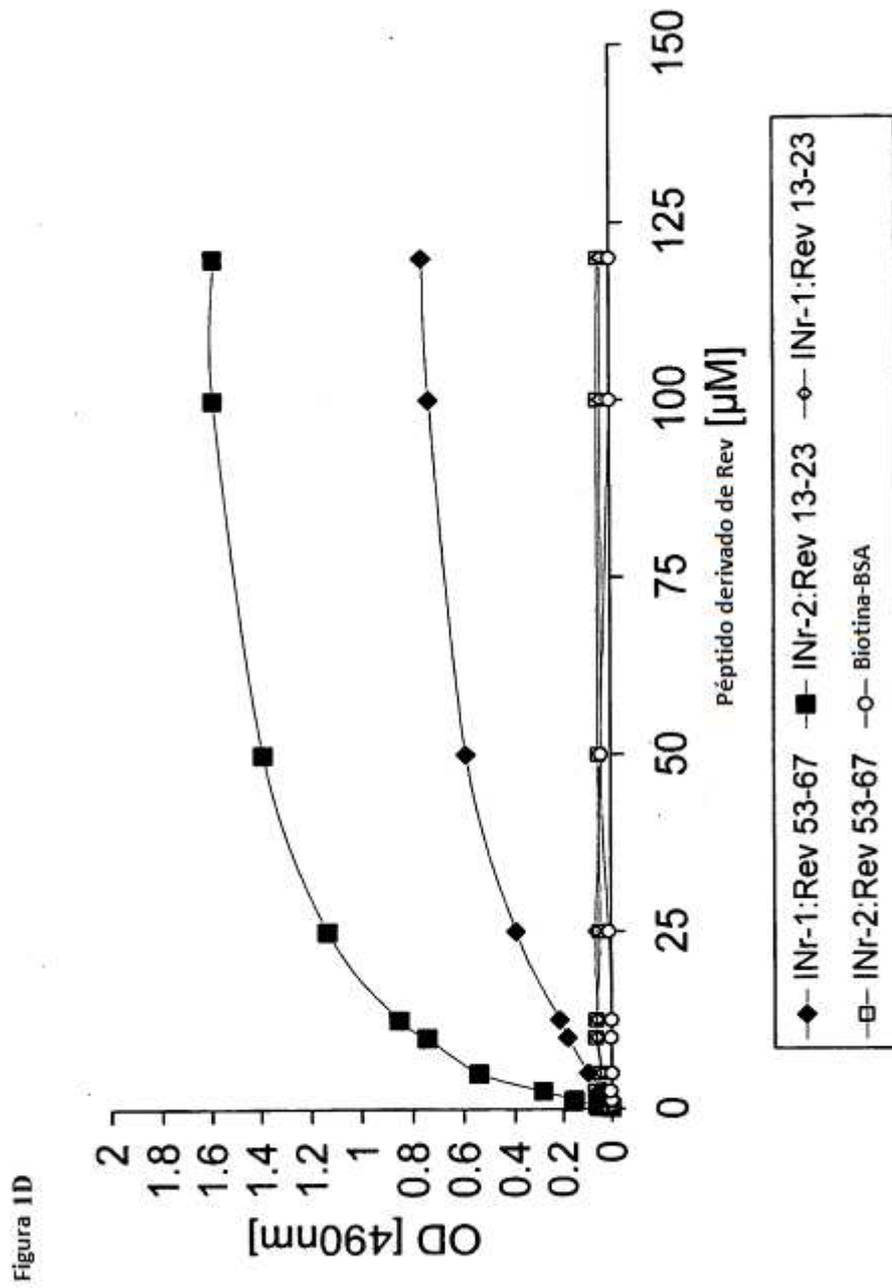
Reivindicaciones

- 5 1. Un péptido constituido por la secuencia WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5), WTAVQMAVFIHNFKRK (SEQ ID NO: 6), o WTHLEGKILVAVHVA (SEQ ID NO: 7).
2. El péptido de acuerdo con la reclamación 1 que consiste en la secuencia de WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5).
3. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de la reclamación 1.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende los tres péptidos que consisten en la secuencias de WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5), WTAVQMAVFIHNFKRK (SEQ ID NO: 6), y WTHLEGKILVAVHVA (SEQ ID NO: 7).
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos que consisten en la secuencias de WGSNFTSTTVKA (SEQ ID NO: 5), WTAVQMAVFIHNFKRK (SEQ ID NO: 6), y WTHLEGKILVAVHVA (SEQ ID NO: 7) para utilizar en el tratamiento de una infección por VIH-1.
- 20 6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reclamación 5 que comprende los tres péptidos como se define en la reclamación 5.
7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reclamaciones 5 ó 6, que comprende además un agente anti VIH-1.
- 25 8. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reclamación 7, en el que el anticuerpo anti VIH-1 agente es un inhibidor de la proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa (RT).
- 30 9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reclamación 7, en el que el agente anti VIH-1 se selecciona del grupo que consiste en: atazanavir (ATV), amprenavir, fosamprenavir (APV), tipranavir (TPV), indinavir, Ro 31-8959 (Saquinavir), lopinavir / ritonavir, prezista, nelfinavir (NFV), y azidotimidina (AZT).
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60









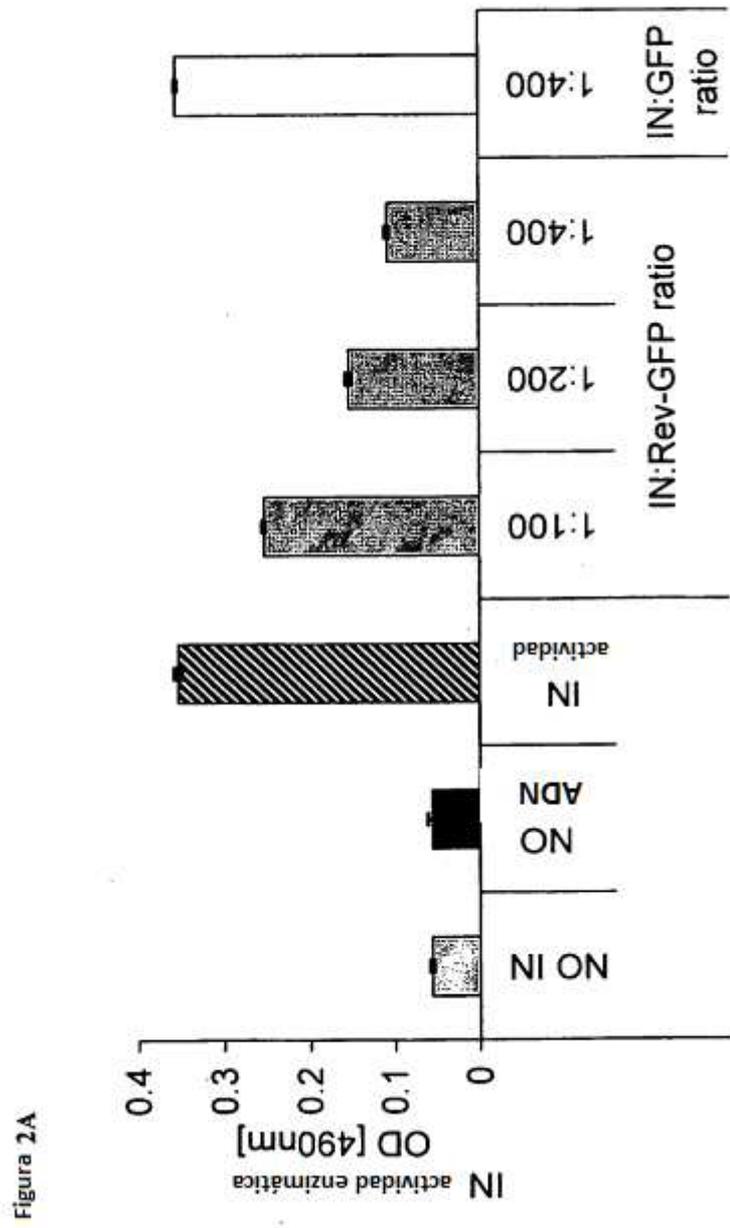


Figura 2B

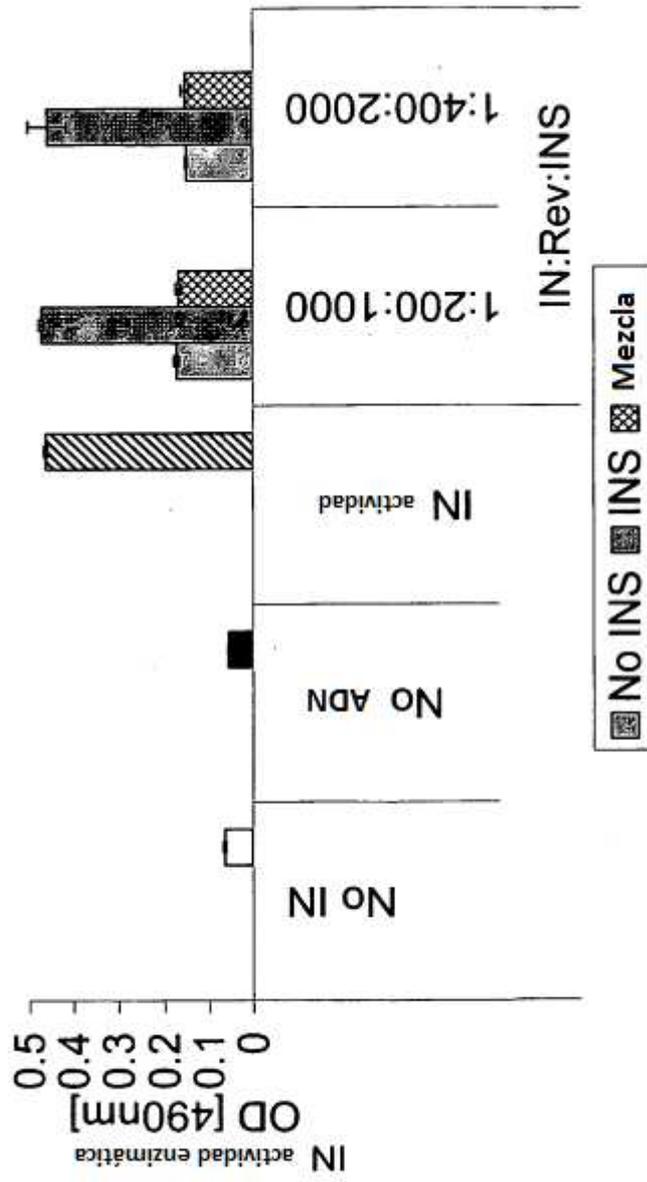


Figura 2C

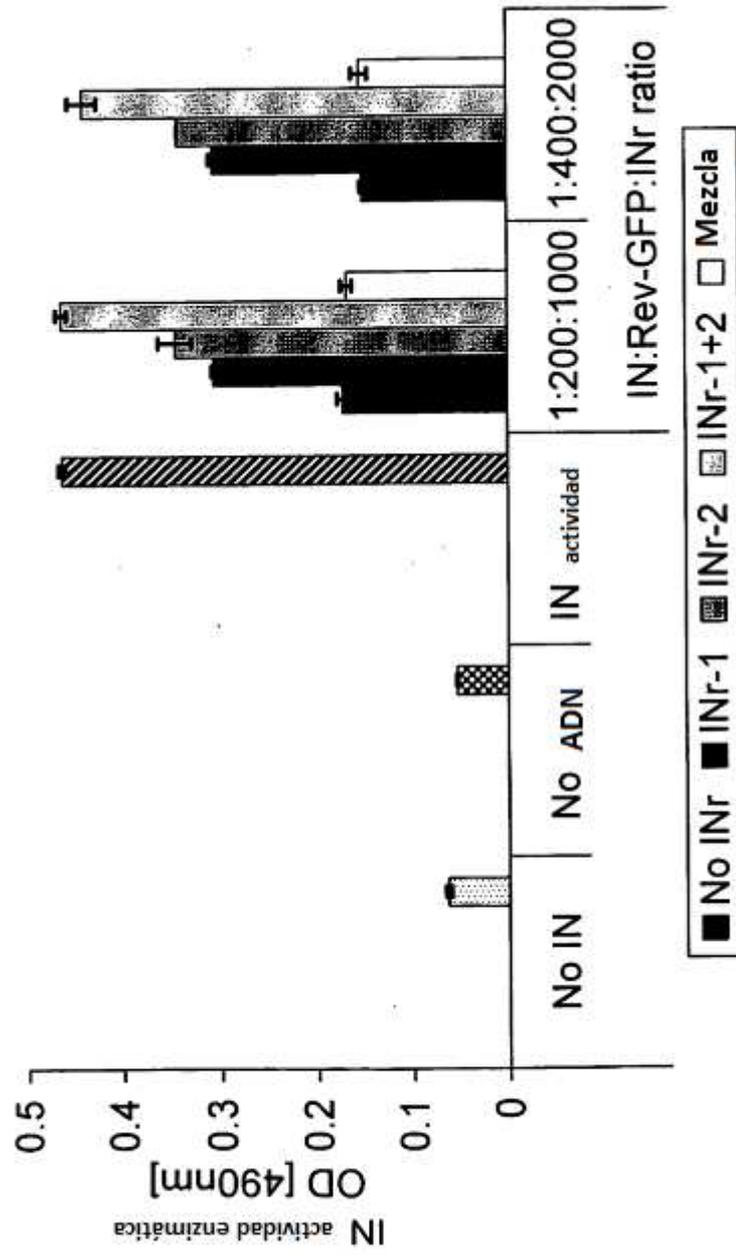


Figura 3A

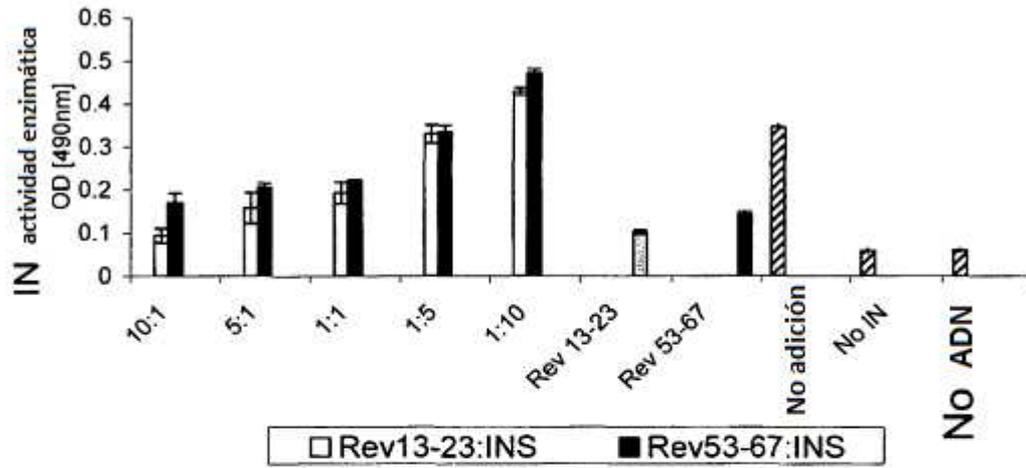


Figura 3B

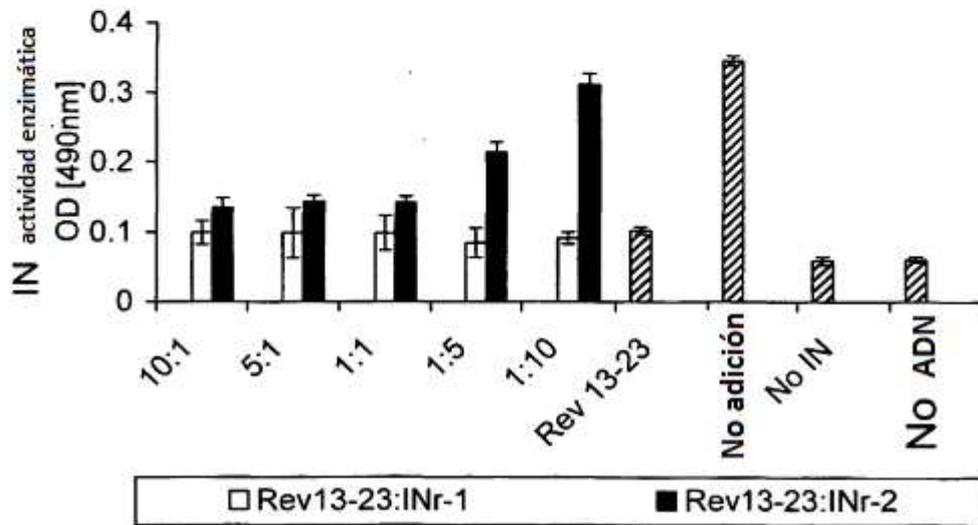
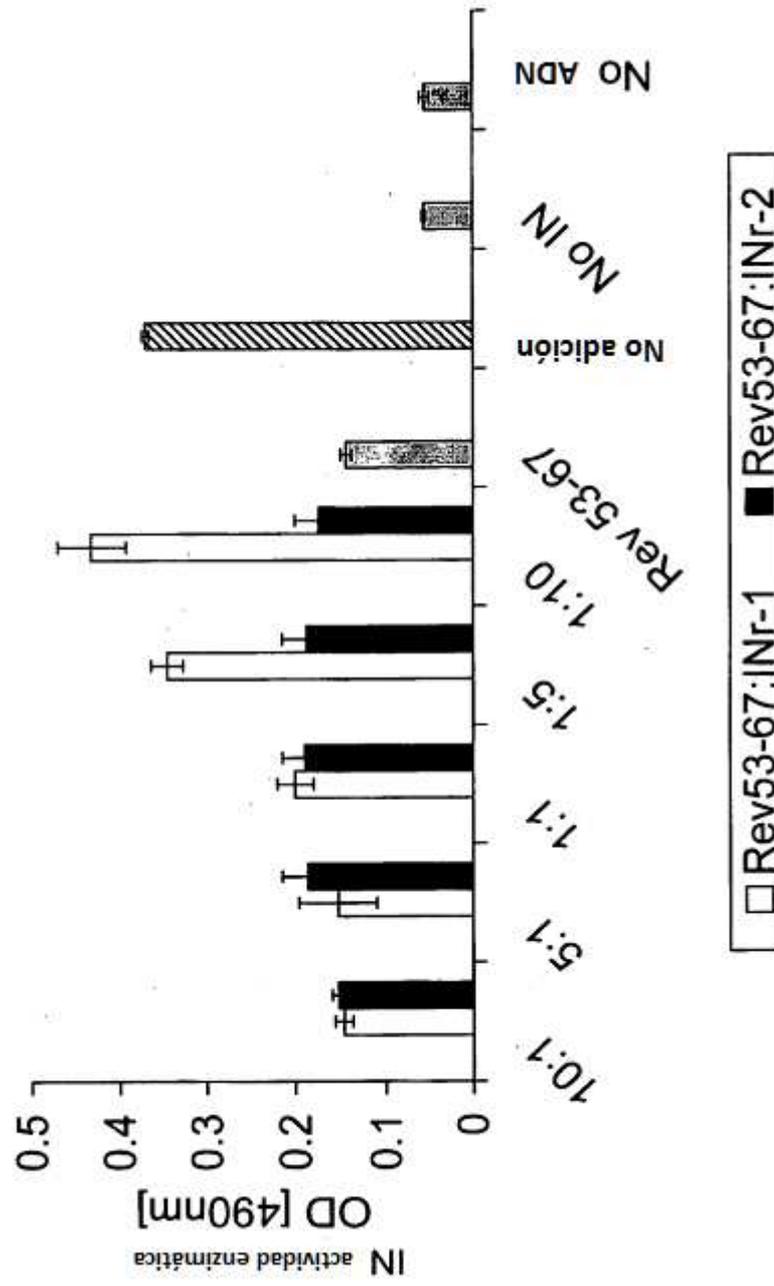


Figura 3C



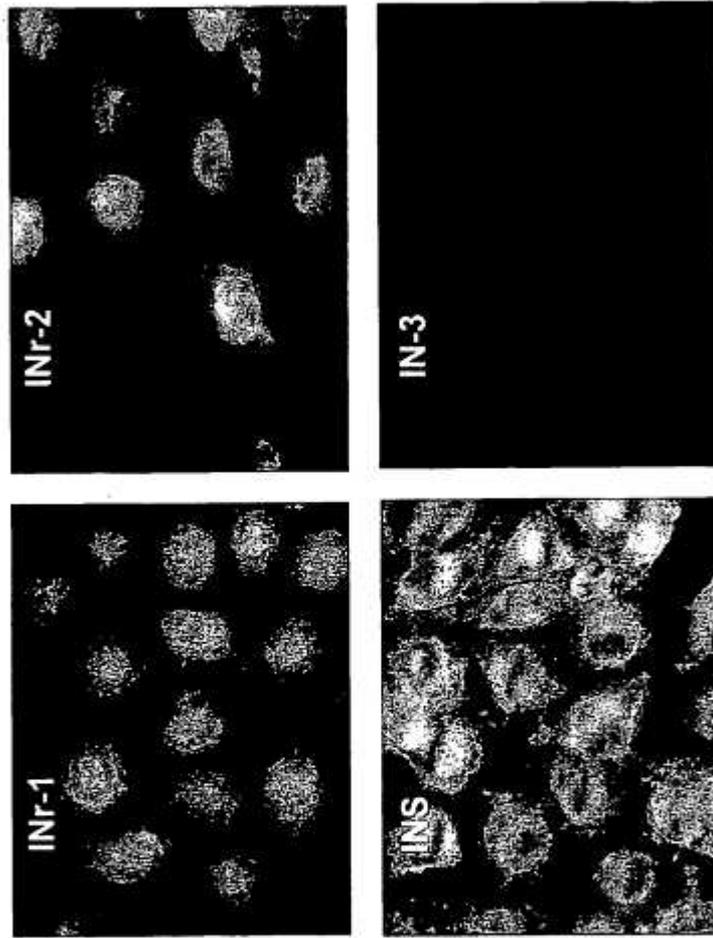


Figura 4A

Figura 4B

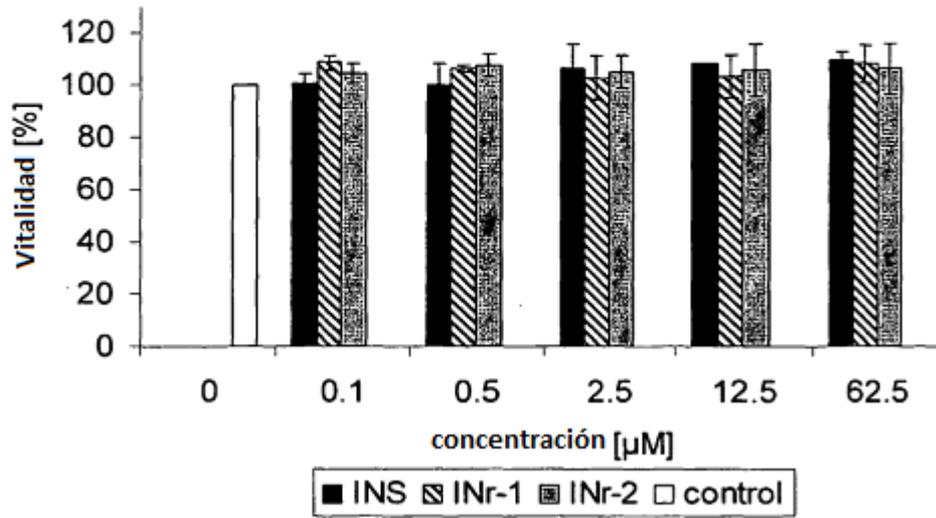


Figura 4C

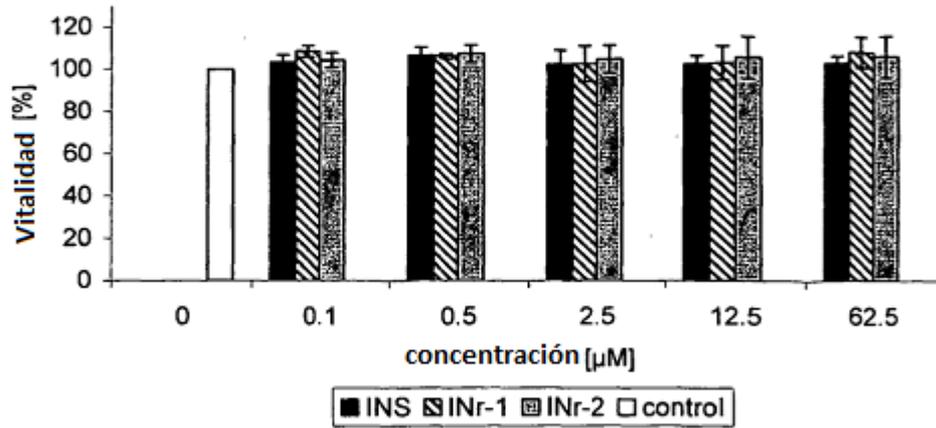


Figura 5A

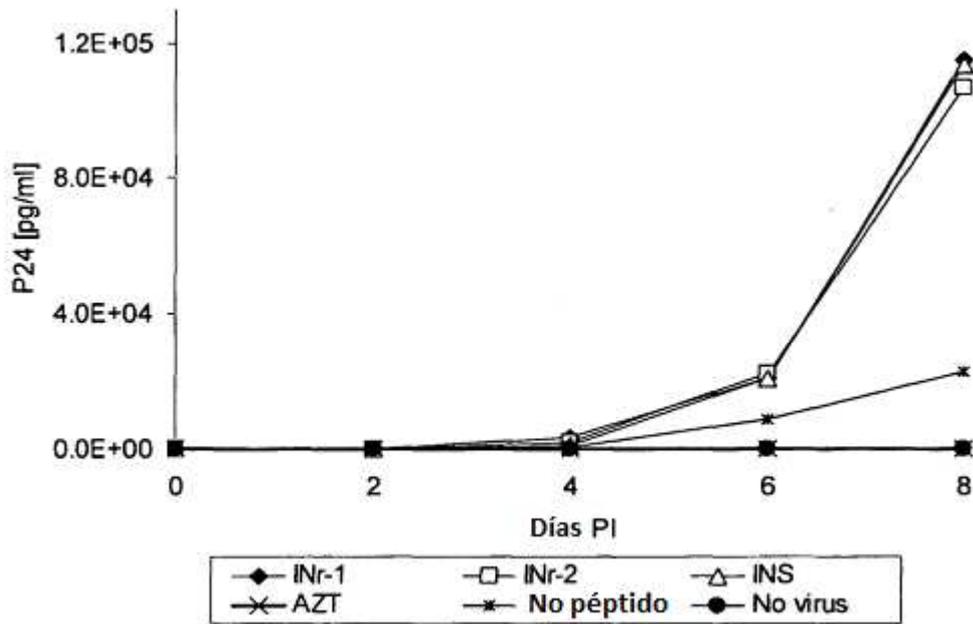


Figura 5B

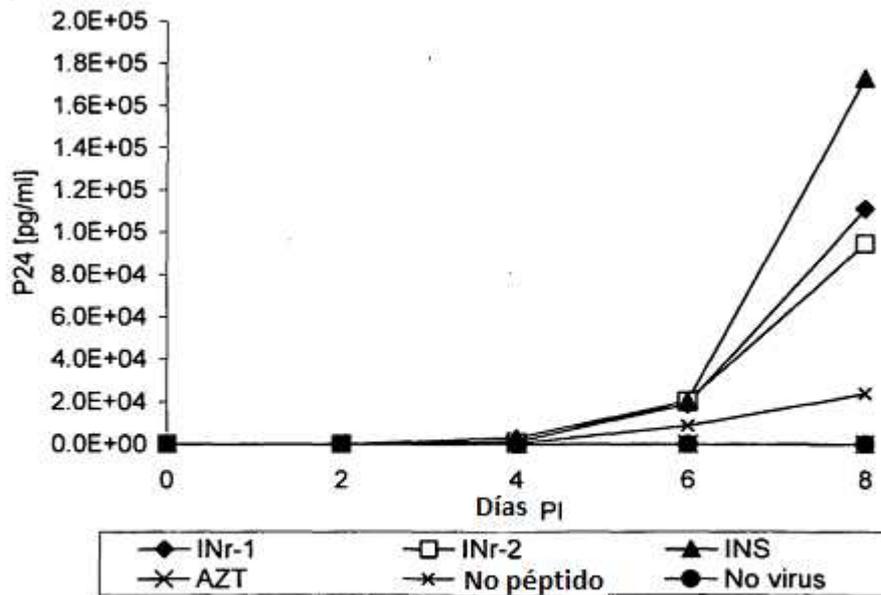


Figura 5C

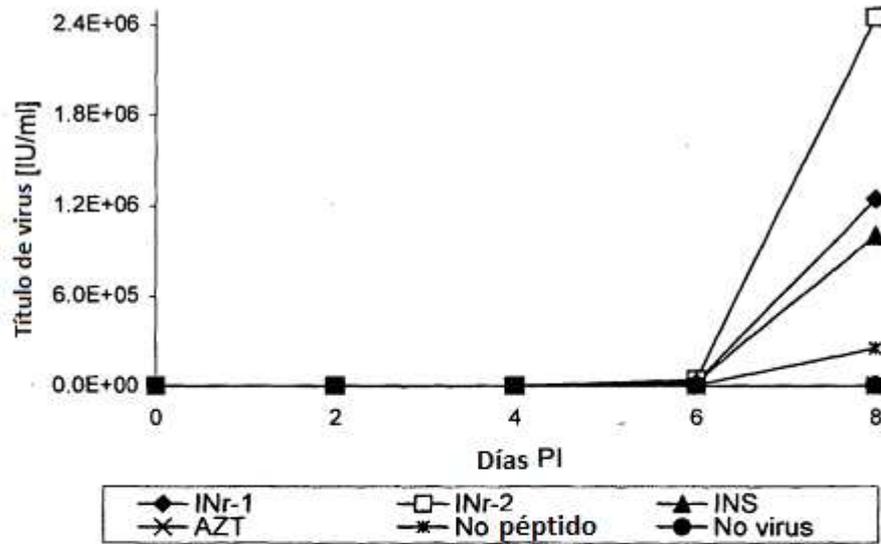


Figura 5D

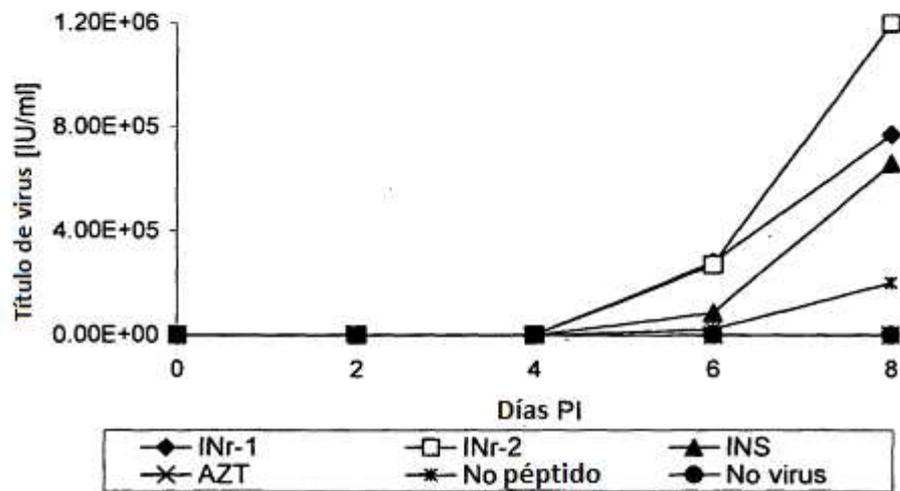


Figura 6A

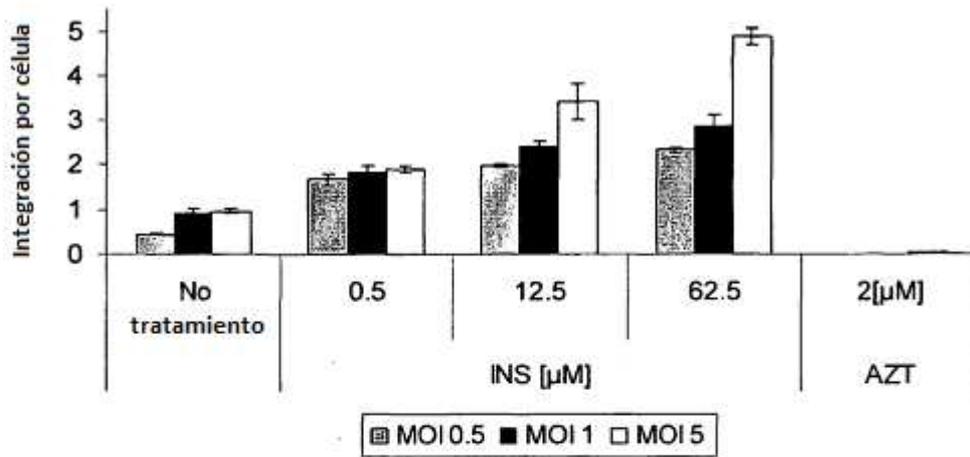
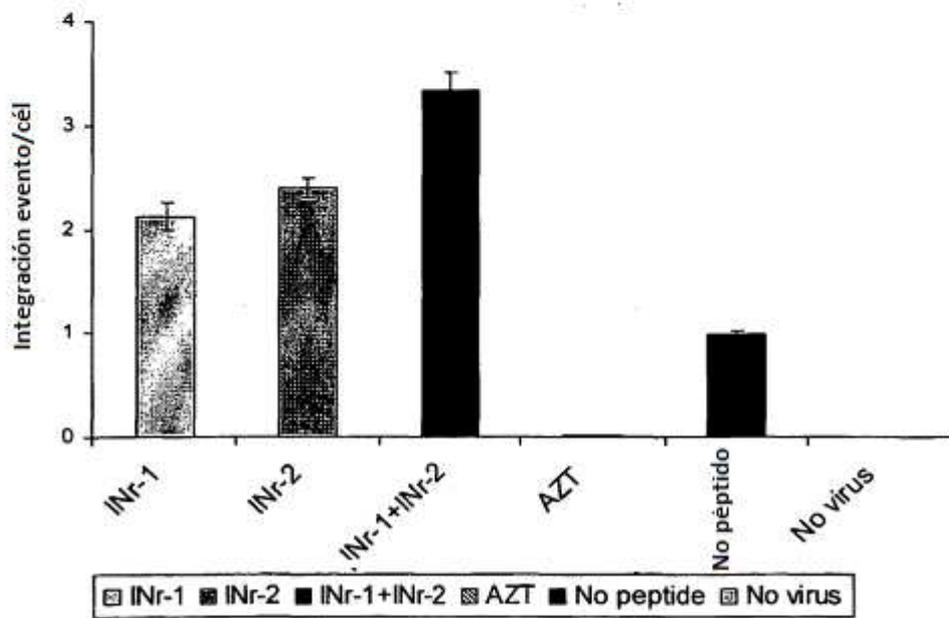


Figura 6B



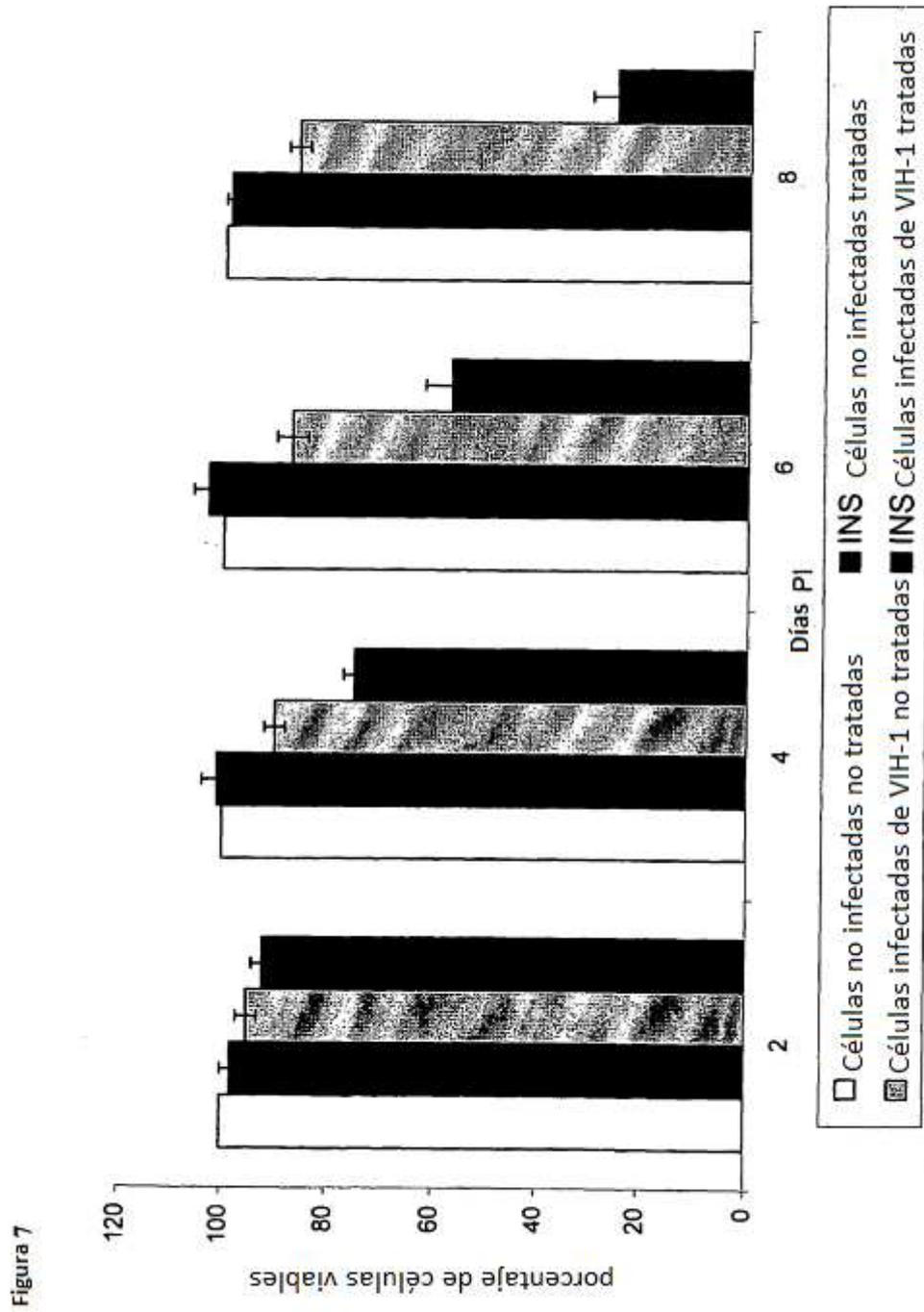
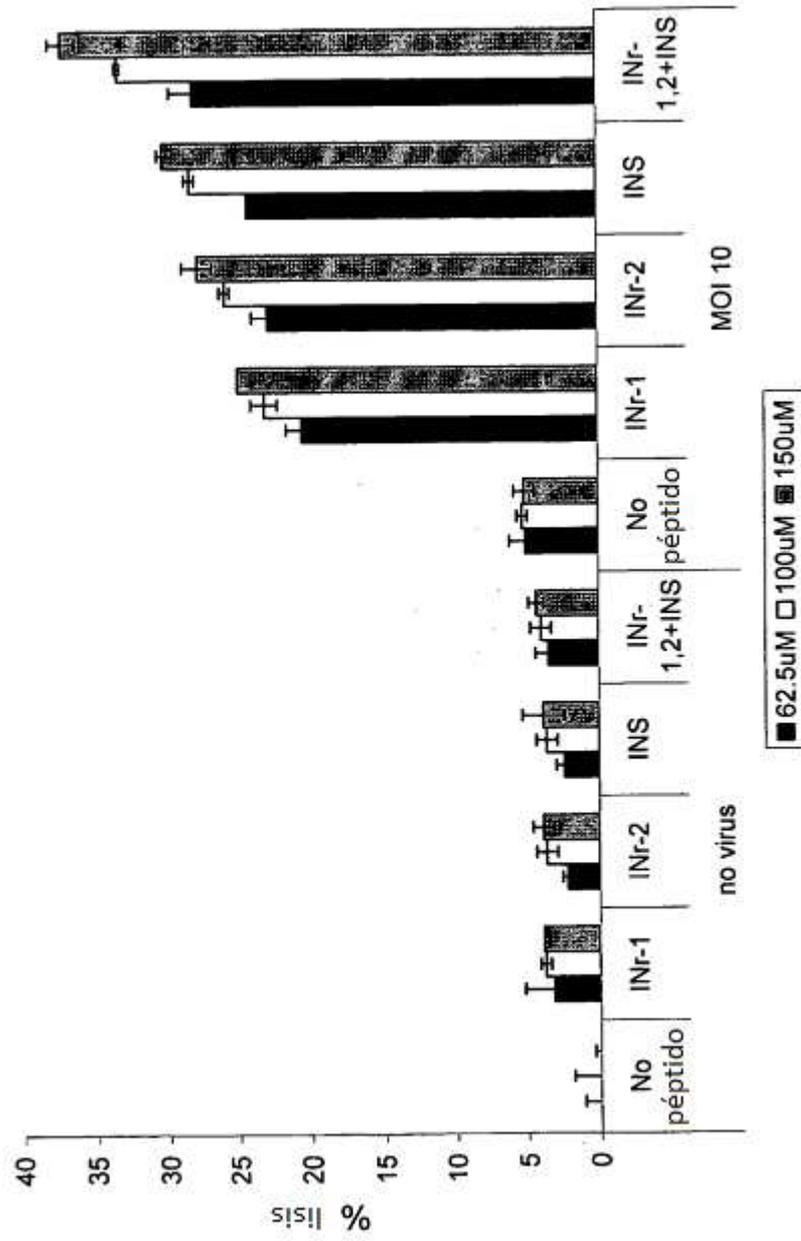


Figura 8



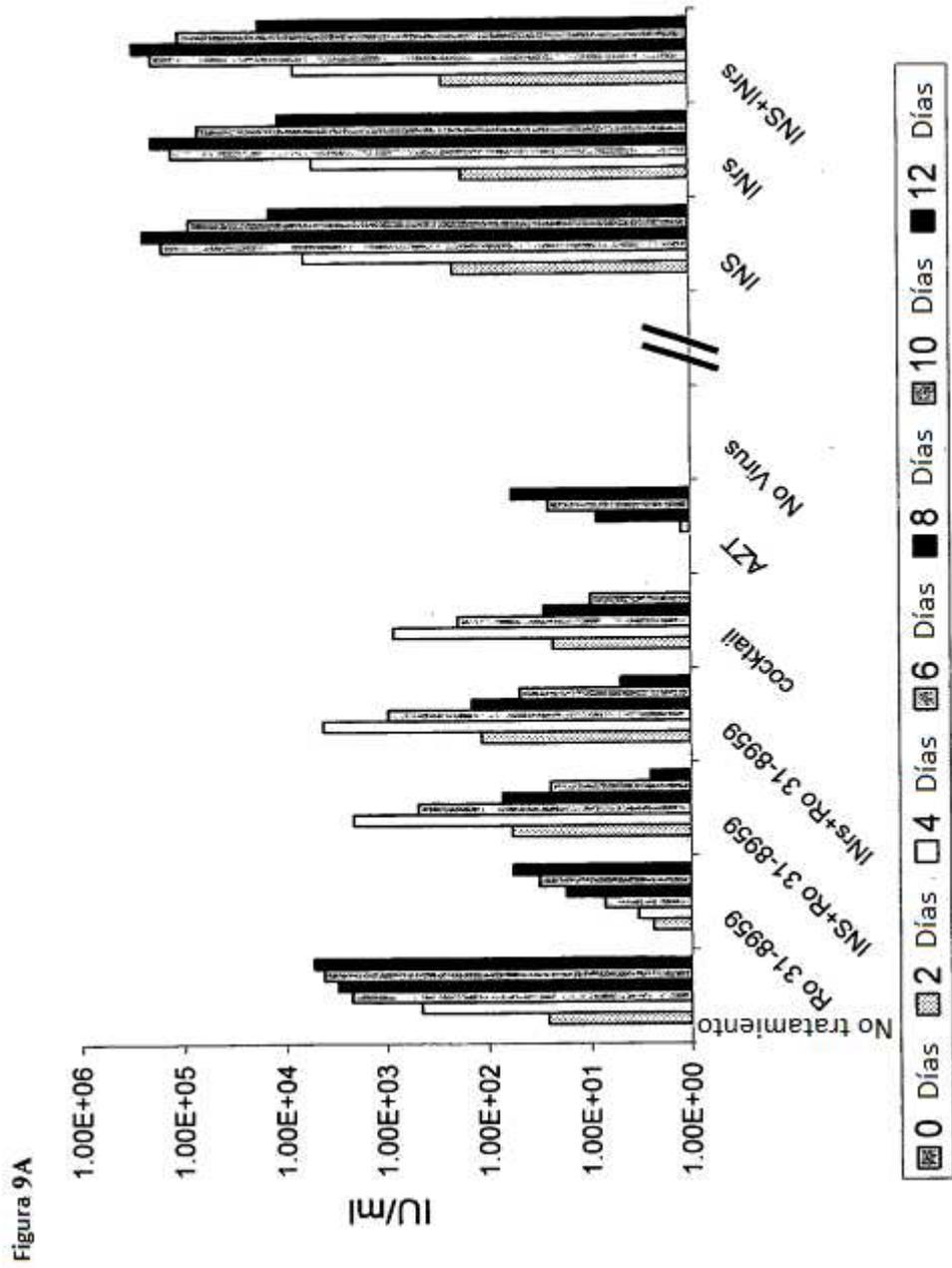


Figura 9B

