



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 277 173**

51 Int. Cl.:
C07K 14/16 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04015696 .0**
86 Fecha de presentación : **31.05.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1479691**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Inhibidores peptídicos de fusión de larga vida contra infecciones por VIH.**

30 Prioridad: **31.05.2001 US 294241 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73 Titular/es: **ConjuChem Biotechnologies Inc.**
Suite 3950, Third Floor
225 President Kennedy Avenue
Montreal, QC H2X 3Y8, CA
John Erickson

72 Inventor/es: **Erickson, John;**
Bridon, Dominique, P.;
Robitaille, Martin;
Krafft, Grant A.;
Xie, Dong;
Afonina, Elena;
Liang, Jun y
De Meyer, Sandra

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 277 173 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 peptídicos de fusión de larga vida contra infecciones por VIH.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a derivados del péptido C34 que son inhibidores de infecciones virales y/o muestran propiedades antifusogénicas. En particular, esta invención se refiere a derivados de C34 que presentan una actividad inhibidora contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus respiratorio sincitial (VRS), el virus de parainfluenza humana (VPH), el virus del sarampión (MV), y el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS) cuya acción es de larga duración para el tratamiento de las respectivas infecciones virales.

Antecedentes de la invención

15 Los eventos de fusión de membrana, aunque tienen lugar normalmente en los procesos biológicos celulares, también están implicados en diversos estados de enfermedad, incluyendo, por ejemplo, la entrada de virus envueltos al interior de las células. Se conocen péptidos que inhiben o, de otra manera, interrumpen los eventos asociados a la fusión de membrana, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la transmisión retroviral a las células no infectadas.

20 El VIH pertenece a la familia lentivirus de los retrovirus y prevalecen dos tipos de VIH, el VIH-1 y el VIH-2, habiendo sido identificadas varias cepas de cada uno de ellos. El VIH tiene como objetivo las células CD-4+, y la entrada viral depende de la unión de la proteína gp120 del VIH a la glicoproteína CD4 y de un receptor quimioquina en la superficie celular. Se sabe que el C34 presenta actividad antiviral contra el VIH, incluyendo la inhibición de la infección de células CD-4+ por un virus libre y/o la inhibición de la formación del virus sincitial inducido por VIH entre células CD-4+ infectadas y no infectadas. Se piensa que la inhibición tiene lugar por la unión del C34 a la primera región de repetición heptavalente en gp41 y, por ello, impide que la primera y segunda regiones de repetición heptavalentes formen la estructura fusigénica en horquilla.

30 Se sabe el C34 posee actividad antifusogénica, es decir tiene la capacidad de inhibir o reducir el nivel de eventos de fusión de membrana entre dos o más entidades, por ejemplo virus-célula o célula-célula, si se compara con el nivel de fusiones de membrana que se producen en ausencia del péptido. De forma más específica, en WO 00/06599 se describe la utilización de C34 para inactivar gp41, impidiendo o reduciendo así la entrada del VIH-1 al interior de las células.

35 De igual forma, en WO 99/59615 se describen las secuencias intensificadoras del péptido originalmente derivadas a partir de varias secuencias de proteínas retrovirales envueltas (gp41) que mejoran las propiedades farmacocinéticas de cualquier polipéptido núcleo al cual están enlazadas. La WO 99/59615 se refiere además a los métodos para intensificar las propiedades farmacocinéticas de cualquier polipéptido núcleo mediante enlace de las secuencias del péptido intensificador al polipéptido núcleo.

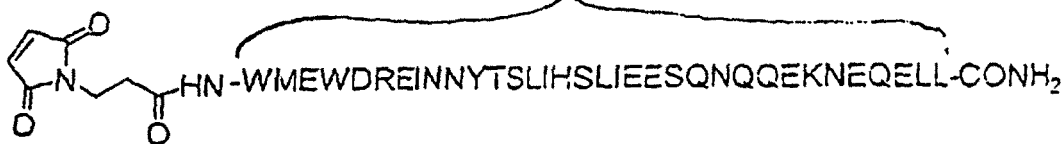
40 Aunque muchos péptidos antivirales o antifusogénicos descritos en la técnica muestran una actividad antiviral y/o antifusogénica potente, el C34, al igual que tales péptidos, tiene una corta vida media *in vivo*, principalmente debido a su rápida eliminación del suero y a la actividad de peptidasas y proteasas. Esto, a su vez, reduce mucho su actividad antiviral efectiva.

45 Por tanto, existe la necesidad de un método para prolongar la vida media de péptidos como el C34 *in vivo* sin que esto afecte sustancialmente a la actividad antifusogénica.

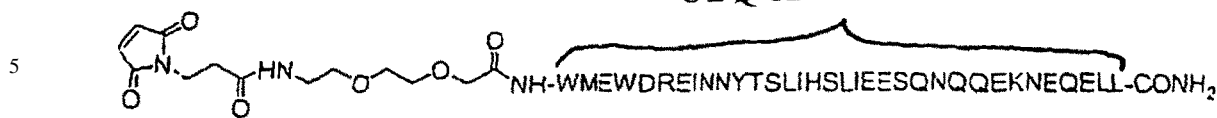
Sumario de la invención

50 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan ahora derivados del péptido C34 que tienen una vida media *in vivo* ampliada si se compara con la de la secuencia correspondiente del péptido C34 no modificado. De forma más específica, la presente invención se refiere a los compuestos de fórmulas I y II mostradas a continuación, que son capaces de reaccionar con los grupos tiol de un componente sanguíneo, bien sea *in vivo* o *ex vivo*, para formar un enlace covalente estable.

SEQ ID. NO. 1



SEQ ID. NO. 1



II

10

Los componentes sanguíneos preferentes comprenden proteínas tales como inmunoglobulinas, incluidas IgG e IgM, seroalbúmina, ferritina, proteínas de enlace a esteroides, transferrina, proteína de enlace a tiroxina, α -2-macroglobulina, etc., especialmente seroalbúmina e IgG, y en particular seroalbúmina.

15

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende los derivados de fórmulas I y II en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables. Tal composición es útil para inhibir la actividad de VIH, VRS, VPH, MV o VIS.

20

En otra realización de la presente invención, se proporciona un método para inhibir la actividad de VIH, VRS, VPH, MV o VIS. El método comprende la administración a un sujeto, preferentemente a un mamífero, una cantidad efectiva de los compuestos de fórmulas I y II o un conjugado de los mismos, bien solo o en combinación con un vehículo farmacéutico.

25

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un conjugado que comprende los compuestos de fórmulas I y II enlazados de forma covalente a un componente sanguíneo.

30

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para prolongar la vida media *in vivo* del péptido C34 en un sujeto, comprendiendo el método la unión covalente de los compuestos de fórmulas I y II a un componente sanguíneo.

Descripción detallada de la invención

35

La presente invención cumple con estas y otras necesidades y se dirige a los derivados de los péptidos C34 de fórmulas I y II que tienen actividad antiviral y/o antifusogénica. Estos derivados del péptido C34 presentan una mayor estabilidad *in vivo* y una menor sensibilidad a la degradación por peptidasas o proteasas. Como resultado, los compuestos de fórmulas I y II minimizan la necesidad de administrar los péptidos de forma frecuente o incluso continua. Los presentes derivados de C34 pueden utilizarse, por ejemplo, como profilácticos contra y/o en el tratamiento de infecciones producidas por diversos virus, incluidos el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus sincitial respiratorio humano (VSR), el virus de parainfluenza humano (VPH), el virus del sarampión (MV) y el virus de inmunodeficiencia del simio (VIS).

40

45

La modificación realizada a la secuencia del péptido natural C34 le permite reaccionar con los grupos tiol disponibles de los componentes sanguíneos para formar enlaces covalentes estables. En una realización de la invención, el componente sanguíneo comprende una proteína sanguínea, incluida una proteína sanguínea móvil tal como la albúmina, que es la más preferente.

50

Los compuestos de fórmulas I y II inhiben la infección viral de las células; por ejemplo, inhibiendo la fusión célula-célula o la infección por el virus libre. La vía de infección puede implicar la fusión de membrana, como ocurre en el caso de los virus envueltos o encapsulados, o algún otro evento de fusión que implique estructuras virales y celulares.

55

Los componentes sanguíneos a los que se enlazan de forma covalente los presentes derivados antivirales de C34 pueden ser fijos o móviles. Los componentes sanguíneos fijos son componentes de la sangre no-móviles e incluyen tejidos, receptores de membrana, proteínas intersticiales, proteínas de fibrina, colágenos, plaquetas, células endoteliales, células epiteliales y sus receptores asociados de membrana y membranosos, células somáticas del cuerpo, células de los músculos esqueléticos y lisos, componentes neuronales, osteocitos y osteoclastos y todos los tejidos del cuerpo, especialmente aquellos asociados a los sistemas circulatorio y linfático. Los componentes sanguíneos móviles son los componentes sanguíneos que no poseen un sitio fijo durante un periodo de tiempo prolongado, generalmente que no excede los 5 minutos, normalmente un minuto. Estos componentes sanguíneos no están asociados a una membrana y están presentes en la sangre durante periodos de tiempo prolongados en una concentración mínima de al menos 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Los componentes sanguíneos móviles incluyen seroalbúmina, transferrina, ferritina e inmunoglobulinas tales como la IgM e IgG. La vida media de los componentes sanguíneos móviles es de al menos 12 horas aproximadamente.

60

65

Durante el proceso de síntesis del derivado de C34 se pueden necesitar grupos protectores. Estos grupos protectores son convencionales en el campo de la síntesis de péptidos, y en general se pueden describir como partes químicas capaces de proteger al derivado del péptido frente a reacciones con otros grupos funcionales. Existen diversos grupos protectores disponibles en el mercado, y ejemplos de ellos pueden encontrarse en US 5.493.007 que se incorpora aquí como referencia. Ejemplos de grupos protectores típicos adecuados incluyen grupos acetilo, fluorenilmetiloxicarbonilo

(FMOC), t-butiloxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ), etc. Además, la Tabla 1 proporciona las abreviaturas tanto de tres letras como de una de los aminoácidos.

TABLA 1

AMINOÁCIDOS NATURALES 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
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Los presentes derivados de C34 pueden administrarse *in vivo* de modo que la conjugación con otros componentes sanguíneos ocurra *in vivo*, o pueden conjugarse primero con componentes sanguíneos *in vitro* y el derivado conjugado resultante ser administrado *in vivo*.

La presente invención se aprovecha de las propiedades de los péptidos antivirales y antifusogénicos existentes. Los virus que pueden ser inhibidos por los péptidos incluyen, sin limitarse a, todas las cepas de virus enumeradas, por ejemplo, en US 6.013.263 y US 6.017.536 en las Tablas V-VII y IX-XIV. Estos virus incluyen, por ejemplo, retrovirus humanos, incluidos VIH-1, VIH-2 y virus del linfocito-T humano (HTLV-1 y HTLV-II), y retrovirus no humanos, incluidos el virus de la leucosis bovina, el virus del sarcoma felino, el virus de la leucemia felina, el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), el virus del sarcoma del simio, la leucemia del simio y el virus de la neumonía progresiva de la oveja. Los virus no retrovirales también pueden ser inhibidos por los presentes derivados de C34, incluidos el virus sincitial respiratorio humano (VSR), el virus del moquillo canino, el virus de la Enfermedad de Newcastle, el virus de parainfluenza humana (VPIH), los virus de la gripe, los virus del sarampión (MV), los virus de Epstein-Barr, los virus de la hepatitis B y los virus de Mason-Pfizer del simio. Los virus no envueltos también pueden ser inhibidos por los presentes derivados de C34 e incluyen, sin limitarse a, picornavirus como los virus del pollo, el virus de la hepatitis A, enterovirus, ecovirus, virus Cocksackie, papovavirus como el virus del papiloma, parvovirus, adenovirus y reovirus.

El objetivo de la presente invención consiste en modificar la secuencia del péptido C34 para conferirle una biodisponibilidad mejorada, una mayor vida media y una mejor distribución mediante la conjugación selectiva del péptido sobre un vehículo proteínico y sin básicamente modificar las propiedades antivirales del péptido. El vehículo preferente (sin limitarse a éste) para esta invención sería la albúmina conjugada a través de su tiol libre.

Los presentes derivados de C34 están concebidos para reaccionar de forma específica con los grupos tiol de proteínas sanguíneas móviles. Tal reacción se establece mediante un enlace covalente del péptido modificado con un enlace maleimida a un grupo tiol de una proteína sanguínea móvil tal como una seroalbúmina o una IgG.

5 Al ser los grupos tiol menos abundantes *in vivo* que, por ejemplo, los grupos amino, el péptido C34 modificado con maleimida de la presente invención se enlazará de forma covalente a unas pocas proteínas. Por ejemplo, en la albúmina (la proteína más abundante en la sangre) existe solamente un único grupo tiol. Por tanto, un conjugado C34-maleimida-albúmina tenderá a comprender aproximadamente una relación molar 1:1 del péptido C34 con respecto a la albúmina. Además de la albúmina, las moléculas de IgG (clase II) poseen también tioles libres. Como las moléculas de IgG y la seroalbúmina constituyen la mayoría de las proteínas solubles en sangre, constituyen también la mayoría de los grupos tiol libres disponibles en la sangre para enlazarse de forma covalente al derivado del péptido C34.

Además, incluso entre las proteínas sanguíneas que contienen tioles libre, incluidas las IgGs, el marcaje específico con una maleimida conduce a la formación preferente de un conjugado C34-maleimida-albúmina 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 residuo aminoácido 34 (Cys³⁴). Se ha demostrado recientemente que el Cys³⁴ de la albúmina ha incrementado la reactividad relativa frente a tioles libres en otras proteínas que contienen tioles libres. Esto se debe, en parte, al muy bajo pK de 5,5 para el Cys³⁴ de la albúmina. Éste es mucho más bajo que los valores pK típicos para los residuos de cisteína en general, que oscilan típicamente alrededor de 8. Debido a este bajo pK, en condiciones fisiológicas normales el Cys³⁴ de la albúmina se encuentra predominantemente en forma ionizada, lo que incrementa dramáticamente su reactividad. Además del bajo valor pK del Cys³⁴, otro factor que aumenta la reactividad del Cys³⁴ es su emplazamiento, en un bolsillo hidrofóbico cerca de la superficie de un bucle de la región V de la albúmina. Este emplazamiento hace que el Cys³⁴ esté disponible para los ligantes de todo tipo y es un factor importante en el papel biológico del Cys³⁴ como captador de radicales libres y eliminador de tioles libres. Estas propiedades convierten el Cys³⁴ en muy reactivo frente a la maleimida-C34, y la aceleración de la velocidad de reacción puede multiplicarse por 1.000 con respecto a las velocidades de reacción de la maleimida-C34 con otras proteínas que contienen tioles libres.

Otra ventaja de los conjugados C34-maleimida-albúmina consiste en la reproducibilidad asociada a la carga al 1:1 del C34 con respecto a la albúmina, en particular en el Cys³⁴. Otras técnicas, como la del glutaraldehído, DCC, EDC y demás activaciones químicas, por ejemplo de aminos libres, carecen de esta selectividad. Por ejemplo, la albúmina contiene 52 residuos de lisina de los cuales 25-30 se encuentran en la superficie de la albúmina y por tanto están accesibles para la conjugación. La activación de estos residuos de lisina, o como alternativa la modificación del C34 para asociarse a través de estos residuos de lisina, resulta en una población heterogénea de conjugados. Incluso si se emplean relaciones molares 1:1 de C34 con respecto a la albúmina, el rendimiento se compondrá de múltiples productos de conjugación, conteniendo algunos 0, 1, 2 o más C34 por albúmina, y teniendo cada uno un C34 acoplado al azar a 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 es difícil, y la reproducibilidad lote a lote es casi imposible, convirtiendo estos conjugados en menos deseables en la terapéutica. Además, aunque parezca que la conjugación a través de los residuos de lisina de la albúmina tiene al menos la ventaja de suministrar más agente terapéutico por molécula de albúmina, los estudios han mostrado que es preferente una relación 1:1 de agente terapéutico con respecto a la albúmina. En el artículo de Stehle y col., "The Loading Rate Determines Tumor Targeting properties of Methotrexate-Albumin Conjugates in Rats", *Anti-Cancer Drugs*, Vol. 8, pp. 677-685 (1988), incorporado aquí en su totalidad, los autores informan que una relación 1:1 de metotrexato anticanceroso con respecto a la albúmina conjugados a través de glutaraldehído daban los resultados más alentadores. Estos conjugados fueron recogidos preferentemente por las células tumorales, mientras que los conjugados que llevaban moléculas de metotrexato al 5:1 hasta 20:1 habían alterado los perfiles de HPLC y fueron recogidos rápidamente por el hígado *in vivo*. Se postula que, a estas proporciones más altas, los cambios conformacionales de la albúmina disminuyen su efectividad como vehículo terapéutico.

50 Mediante la administración controlada de los presentes derivados de C34 *in vivo* se puede controlar el marcaje específico de albúmina e IgG *in vivo*. En las administraciones usuales, el 80-90% de los derivados de C34 administrados marcarán albúmina y menos del 5% marcará IgG. También se producirán trazas de marcaje de tioles libres como el glutatión. Se prefiere este marcaje específico para su utilización *in vivo* ya que permite un cálculo exacto de la vida media estimada del C34.

55 Además de proporcionar un marcaje controlado específico *in vivo*, los presentes derivados del C34 pueden proporcionar un marcaje específico de la seroalbúmina e IgG *ex vivo*. Tal marcaje *ex vivo* implica la adición de derivados de C34 a la sangre, al suero o a una solución salina que contenga seroalbúmina y/o IgG. Una vez haya tenido lugar la conjugación *ex vivo* con el derivado de C34, se puede readministrar el suero o la solución salina a la sangre del paciente para un tratamiento *in vivo*, o un liofilizado.

65 Los presentes derivados de C34 pueden sintetizarse mediante métodos estándar de la química de los péptidos en fase sólida bien conocidos por cualquier especialista en la técnica. Por ejemplo, el péptido puede sintetizarse mediante las técnicas químicas en fase sólida siguiendo los procedimientos descritos por Steward y col. en *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Ed., Pierce Chemical Company, Rockford, III., (1984), utilizando un sintetizador Rainin PTI Symphony. De forma similar, los fragmentos de péptidos pueden sintetizarse y posteriormente combinarse o enlazarse conjuntamente para formar la secuencia de péptidos C34 (condensación de segmentos).

Para la síntesis en fase sólida de los péptidos se puede encontrar un resumen 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., *"The Peptides"*, volumen 1, Academic Press (New York). En general, tales métodos comprenden la adición secuencial de uno o más aminoácidos o de unos aminoácidos apropiadamente protegidos a una cadena en crecimiento de péptidos en un polímero. Normalmente, tanto el grupo amino como el carboxilo del primer aminoácido está protegido con un grupo protector adecuado. Entonces el aminoácido protegido y/o derivado se fija a un soporte sólido inerte o se utiliza en solución añadiendo el aminoácido siguiente en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) apropiadamente protegido y en las condiciones adecuadas para la formación del enlace amida. Se elimina entonces el grupo protector de este residuo aminoácido recién añadido y se añade el siguiente aminoácido (adecuadamente protegido), y así sucesivamente.

Después de que todos los aminoácidos deseados hayan sido enlazados en la secuencia apropiada, cualquier grupo protector remanente (y cualquier soporte sólido) se escindirán secuencial o simultáneamente para proporcionar el péptido final. Por simple modificación de este procedimiento general, es posible añadir más de un aminoácido a la vez a una cadena creciente, 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 desprotección, un pentapéptido.

Un método particularmente preferente para preparar los presentes derivados de C34 implica la síntesis en fase sólida de los péptidos donde el aminoácido α -N-terminal está protegido por un grupo ácido o básico sensible. Estos grupos protectores deberían tener la propiedad de ser estables en las condiciones de formación de enlaces de péptidos al mismo tiempo que han de ser fácilmente eliminables sin destruir la cadena en crecimiento de péptidos o sin racemizar cualquiera de los centros quirales contenidos en ellos. Ejemplos de grupos N-protectores y grupos protectores carboxilo se describen en Green, *"Protective Groups in Organic Synthesis"*, (John Wiley & Sons, New York pp. 152-186 (1981)), incorporado aquí como referencia. Ejemplos de grupos N-protectores comprenden, sin limitación, grupos alcanoilo inferiores 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 como bencenosulfonilo, *p*-toluensulfonilo, *o*-nitrofenilsulfonilo, 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (pmc), y similares; grupos formadores de carbamato 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*-bifenililo)-1-metiletoxicarbonilo, α,α -dimetilo-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, bencilhidroxiloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo (boc), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, fenoxicarbonilo, 4-nitrofenoxicarbonilo, fluorenil-9-metoxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo y similares; grupos arilalquilo como bencilo, bifenilisopropiloxicarbonilo, trifenilmetilo, benciloximetilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y similares y grupos sililo como trimetilsililo y similares. Los grupos α -N-protectores preferentes son *o*-nitrofenilsulfonilo; 9-fluorenilmetiloxicarbonilo; t-butiloxicarbonilo (boc), isoborniloxicarbonilo; 3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo; t-amiloxicarbonilo; 2-ciano-t-butiloxicarbonilo y similares, siendo el 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) aún más preferente; mientras que los grupos N-protectores de cadena lateral comprenden el 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (pmc), nitro, *p*-toluensulfonilo, 4-metoxibencenosulfonilo, Cbz, Boc y adamantiloxicarbonilo para los grupos amino de cadena lateral como en lisina y arginina; bencilo, *o*-bromobenciloxicarbonilo, 2,6-diclorobencilo, isopropilo, t-butilo (t-Bu), ciclohexilo, ciclopentilo y acetilo (Ac) para tirosina; t-butilo, bencilo y tetrahidropirano para serina; tritilo, bencilo, Cbz, *p*-toluensulfonilo y 2,4-dinitrofenilo para histidina; formilo para triptófano; bencilo y t-butilo para ácido aspártico y ácido glutámico; y trifenilmetilo (tritilo) para cisteína.

El grupo protector carboxilo se refiere convencionalmente a un éster protector de ácido carboxílico o grupo amida. Estos grupos protectores carboxilo son bien conocidos por los especialistas en la técnica, habiéndose utilizado ampliamente en la protección de grupos carboxilo en referencia a las penicilinas y cefalosporinas tal como se describe en US-3.840.556 y US-3.719.667, cuyos descubrimientos se incorporan aquí como referencia. Grupos protectores carboxilo representativos comprenden, sin limitación, alquilos inferiores de 1 a 8 carbonos; arilalquilo como fenetilo o bencilo y sus derivados sustituidos como grupos alcoxibencilo o nitrobencilo; arilalqueno como feniletano; arilo y sus derivados sustituidos tales como 5-indanilo; dialquilaminoalquilo como dimetilaminoetilo; grupos alcanoiloxialquilo como acetoximetilo, butiriloximetilo, valeriloximetilo, isobutiriloximetilo, isovaleriloximetilo, 1-(propioniloxi)-1-etilo, 1-(pivaloiloxi)-1-etilo, 1-metil-1-(propioniloxi)-1-etilo, pivaloiloximetilo, propioniloximetilo; grupos cicloalcanoiloxialquilo como ciclopropilcarboniloximetilo, ciclobutilcarboniloximetilo, ciclopentilcarboniloximetilo, ciclohexilcarboniloximetilo; aroiloxialquilo como benzoiloximetilo, benzoiloxietilo; arilalquilcarboniloxialquilo tal como bencilcarboniloximetilo, 2-bencilcarboniloxietilo; alcoxicarbonilalquilo o cicloalquiloxicarbonilalquilo tal como metoxicarbonilmetilo, ciclohexiloxicarbonilmetilo, 1-metoxicarbonil-1-etilo; alcoxicarboniloxialquilo o cicloalquiloxicarboniloxialquilo tal como metoxicarboniloximetilo, t-butiloxicarboniloximetilo, 1-etoxicarboniloxi-1-etilo, 1-ciclohexiloxicarboniloxi-1-etilo; ariloxicarboniloxialquilo tal como 2-(fenoxicarboniloxi)etilo, 2-(5-indaniloxicarboniloxi)etilo; alcoxicarboniloxialquilo tal como 2-(1-metoxi-2-metilpropan-2-iloxi)etilo; arilalquiloxicarboniloxialquilo tal como 2-(benciloxicarboniloxi)etilo; arilalquiloxicarboniloxialquilo tal como 2-(3-fenilpropen-2-iloxicarboniloxi)etilo; alcoxicarbonilaminoalquilo tal como t-butiloxicarbonilaminometilo; alquilaminocarbonilaminoalquilo tal como metilaminocarbonilaminometilo; alcanoilaminoalquilo tal como acetilaminometilo; carboniloxialquilo hetero-

ES 2 277 173 T3

cíclico tal como 4-metilpiperacilcarboniloximetilo; 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, sin limitación, grupos aminocarbonilo y alquilamino-
5 carbonilo inferiores. De los grupos protectores carboxilo anteriores, son preferentes alquil inferior, cicloalquil o arilalquil ésteres, por ejemplo, metil éster, etil éster, propil éster, isopropil éster, butil éster, sec-butil éster, isobutil éster, amil éster, isoamil éster, octil éster, ciclohexil éster, feniletal éster y similares o un alcanoilalquil, cicloalcanoilalquil, aroilalquil o arilalquilcarboniloxialquilo éster. Los grupos protectores carboxiamida preferentes son los grupos alquilaminocarbonilo inferiores.

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

15 Al final de la síntesis en fase sólida, el péptido es retirado de la resina y desprotegido, bien en operaciones sucesivas o en una única operación. La retirada del péptido y su desprotección pueden realizarse convencionalmente en una única operación mediante tratamiento del polipéptido ligado a la resina con un reactivo de disociación que comprende tioanisol, trisopropilsilano, fenol y ácido trifluoroacético. En los casos en los cuales el α -C-terminal del péptido es una alquilamida, la resina se disocia por aminólisis con una alquilamina. Como alternativa, el péptido puede retirarse por transesterificación, por ejemplo con metanol, seguido de aminólisis o mediante transamidación directa. El péptido protegido puede purificarse en este punto o llevarse directamente al paso siguiente. La eliminación de los grupos protectores de cadena lateral se lleva a cabo utilizando la mezcla de disociación descrita anteriormente. El péptido totalmente desprotegido puede ser purificado en una secuencia de pasos cromatográficos empleando todos o cualquiera de los siguientes tipos: intercambio iónico en una resina ligeramente básica (forma de acetato); cromatografía de adsorción hidrofóbica sobre poliestireno-divinilbenceno no-derivatizado (tal como Amberlite XADTM); cromatografía de adsorción en gel de sílice; cromatografía de intercambio iónico sobre carboximetilcelulosa; cromatografía de partición, por ejemplo sobre Sephadex G-25TM, LH-20TM o distribución en contracorriente; cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), especialmente HPLC de fase inversa sobre relleno de columna de fase enlazada sílice-octilo- o fenilo/hexilsililo. Cualquier experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente cuáles serían los pasos cromatográficos preferentes o las secuencias necesarias para obtener una purificación aceptable del péptido C34.

35 Los pesos moleculares de estos péptidos se determinan mediante espectroscopía de masas con electropulverización.

Los presentes derivados de C34 pueden utilizarse bien solos o en combinación para optimizar sus efectos terapéuticos. Pueden administrarse en un medio fisiológicamente aceptable, por ejemplo agua desionizada, una solución de amortiguación fosfato (PBS), solución salina, etanol acuoso u otro alcohol acuoso, plasma, soluciones proteicas, manitol, glucosa acuosa, alcohol, aceite vegetal, o similares. Otros aditivos que se pueden incluir comprenden los amortiguadores, donde los medios son generalmente amortiguados a un pH en el rango de aproximadamente 5 a 10, donde la concentración de amortiguador oscilará generalmente entre aproximadamente 50 y 250 mM, sales, donde la concentración de sal oscilará generalmente entre aproximadamente 5 y 500 mM, estabilizadores fisiológicamente aceptables y similares. Las composiciones pueden ser liofilizadas para su conveniente almacenamiento y transporte.

Los derivados de C34 pueden ser administrados por vía parenteral, por ejemplo intravascular (IV), intraarterial (IA), intramuscular (IM), subcutánea (SC), o similares. La administración puede realizarse, si es lo 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 su transferencia al sistema vascular. Normalmente se empleará una sola inyección aunque se pueda utilizar más de una, si se desea. El derivado de péptido puede administrarse por cualquier medio conveniente, incluyendo jeringuillas, trocar, catéter o similares. La forma particular de administración variará según la cantidad que se deba administrar, si se trata de un único bolo o de una administración continua, o similares. Preferentemente, la administración será intravascular, el lugar de introducción no es crítico para esta invención, preferentemente en un punto donde el flujo sanguíneo sea rápido, por ejemplo, intravenosamente, por vena periférica o central. Otras vías pueden emplearse si la administración está asociada con técnicas de liberación retardada o a una matriz protectora. La intención es que el derivado de C34 se distribuya eficazmente en la sangre, de modo que pueda reaccionar con los componentes de la misma. La concentración del conjugado variará ampliamente y oscilará generalmente entre aproximadamente 1 pg/ml y 50 mg/ml. La totalidad administrada intravascularmente se encontrará generalmente en el rango de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de forma más habitual entre aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.

Al unirse a los componentes de larga vida en la sangre, como inmunoglobulina, seroalbúmina, glóbulos rojos y plaquetas, surgen cantidad de ventajas. La actividad de los derivados de C34 se prolonga de días a semanas. Durante este período de tiempo sólo se necesita una única administración. Se puede lograr una mayor especificidad, ya que el compuesto activo estará enlazado principalmente a moléculas grandes, donde es menos probable que sea recogido intracelularmente para interferir en otros procesos fisiológicos.

ES 2 277 173 T3

La formación del enlace covalente con el componente sanguíneo puede ocurrir *in vivo* o *ex vivo*. Para la formación del enlace covalente *ex vivo*, el derivado de C34 se añade al suero sanguíneo o a una solución salina que contiene componentes sanguíneos purificados como seroalbúmina humana o IgG, para permitir la formación del enlace covalente entre el derivado y el componente de la sangre. Según una forma preferente, el derivado de C34 se somete a reacción con seroalbúmina humana en una solución salina. Después de la formación del conjugado, éste último puede ser administrado al sujeto o ser liofilizado.

Se puede comprobar la actividad del péptido C34 y/o la presencia de derivados de C34 en la sangre del huésped mamífero. Si se toma una muestra de sangre del huésped en distintos momentos, se puede determinar si el péptido C34 se ha enlazado a los componentes sanguíneos de larga duración en una cantidad suficiente para ser terapéuticamente activo y, a continuación, se puede determinar el nivel de C34 en sangre. Si se desea, también puede determinarse a cual de los componentes sanguíneos se ha enlazado de forma covalente el C34. La comprobación puede realizarse también utilizando ensayos de actividad de C34, HPLC-MS o anticuerpos dirigidos al C34.

Los ejemplos siguientes ilustran las realizaciones preferentes de la invención y no se interpretarán de ninguna manera como limitativos del alcance de la misma.

Los presentes derivados de C34 pueden administrarse a pacientes de acuerdo con los métodos descritos a continuación y demás métodos conocidos en la técnica. Las dosificaciones terapéuticas efectivas de los presentes derivados de C34 pueden determinarse mediante procedimientos bien conocidos por los especialistas y éstos tendrán en cuenta cualquier en relación a la posible toxicidad del C34.

El presente derivado de C34 puede ser administrado también profilácticamente a individuos anteriormente no infectados. Esto puede resultar ventajoso en aquellos casos donde un individuo ha sido sometido a un gran riesgo de exposición a un virus, como puede ocurrir cuando el individuo ha estado en contacto con un individuo infectado con gran riesgo de transmisión viral. Esto puede resultar especialmente ventajoso cuando existe una cura conocida para el virus, como el virus VIH. Como ejemplo, la administración profiláctica de un derivado de C34 sería ventajosa en una situación en la cual un trabajador sanitario ha estado expuesto a sangre procedente de un individuo infectado por VIH, o en otras situaciones en las cuales un individuo dedicado a actividades de alto riesgo hace que éste esté potencialmente expuesto al virus VIH.

Al haber sido totalmente descrita, la invención además puede ser valorada y entendida con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

35 General

Salvo que se indique de otra manera, la síntesis de cada derivado de C34 ha sido realizada 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 enlazante amida Ramage protegida por Fmoc, utilizando aminoácidos protegidos por Fmoc. El acoplamiento se realizó 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 mediante un 20% de piperidina/DMF. Cuando resultó necesario, se utilizó un aminoácido protegido por Boc en N-terminal con el fin de generar el N_α-terminal libre después de que el péptido se hubiera disociado de la resina. Todos los aminoácidos utilizados durante la síntesis poseen la estereoquímica L. Durante la síntesis, se utilizaron recipientes de reacción de vidrio.

A continuación, la presente invención se describirá más detalladamente en base a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen sólo propósitos ilustrativos y no deben ser entendidos como limitativos.

50 Ejemplo 1

Compuesto A

Paso 1: El ejemplo describe la síntesis del péptido en fase sólida del compuesto a una escala de 100 μ mol. Se añadieron 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-Ser(tBu)-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-Ser(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-Met-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, de acuerdo con la secuencia, se activaron con hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se realizó mediante una solución al 20% (v/v) de piperidina en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (paso 1). El grupo amino del aminoácido final fue acetilado con ácido acético activado mediante hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA).

Paso 2: La síntesis se continuó entonces con la adición de ácido 3-maleimidopropiónico (Paso 2). Entre cada acoplamiento, la resina se lavó 3 veces con N,N-dimetilformamida (DMF) y 3 veces con isopropanol (iPr-OH).

ES 2 277 173 T3

Paso 3: El péptido se disoció de la resina mediante TFA 85%/5% (TIS)/5% tioanisol y 5% fenol, seguido de precipitación por Et₂O helado en frío seco (Paso 3).

Ejemplo 2

5

Compuesto B

Paso 1: El ejemplo describe la síntesis del péptido en fase sólida del compuesto a una escala de 100 μ mol. Se añadieron 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-Fmoc-Ser(tBu)-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-Ser(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-Met-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. Se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) y, de acuerdo con la secuencia, se activaron con hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación del grupo protector Fmoc se realizó utilizando una solución al 20% (v/v) de piperidina en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos (Paso 1). El grupo amino del aminoácido final fue acetilado con ácido acético activado por hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIEA).

20

Paso 2: La síntesis continuó entonces con la adición de Fmoc-AEEA-OH y ácido 3-maleimidopropiónico (Paso 2). Entre cada acoplamiento, la resina se lavó 3 veces con N,N-dimetilformamida (DMF) y 3 veces con isopropanol (iPrOH).

25

Paso 3: El péptido se disoció de la resina mediante 85% TFA/5% TIS/5% tioanisol y 5% fenol, seguido de precipitación con Et₂O helado en frío seco (Paso 3).

Ensayo celular anti-VIH (ensayo MTT)

30

Se determinó la actividad antiviral tal como se describe en Journal of Virological Methods, 1988, 20, 309-321. Brevemente, se introdujeron varias concentraciones del compuesto de prueba en cada pocillo de una placa de microtitulación de fondo plano. Posteriormente, se añadió una cepa de VIH (VIH-1 IIIB) y células MT-4 a una concentración final de 200 CCID₅₀/pocillo y 30.000 células/pocillo respectivamente. Con el fin de determinar la toxicidad del compuesto de prueba, se incubaron paralelamente a los cultivos infectados por VIH unos cultivos celulares simulados infectados que contenían un rango idéntico de concentración del compuesto. A los 5 días de incubación (37°C, 5% de CO₂), se determinó la viabilidad de las células por colorimetría con tetrazolio MTT. Los resultados de ambos ensayos aparecen en la Tabla 2 siguiente.

35

TABLA 2

40

Compuesto	Comentario	Ensayo antiviral IC50 (μ M)
A	Activado Conjugado HSA	0,3171 0,6602
B	Activado Conjugado HSA	0,0015 0,0175

45

50

55

60

65

ES 2 277 173 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ConjuChem Inc.

5 <120> INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE FUSIÓN DE LARGA VIDA CONTRA INFECCIONES POR VIH

<130> 53124

<140> EP 04015696.0

<141> 2004-07-03

10 <160> 1

<170> Versión 3.1 patentIn

<210> 1

15 <211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<221> PÉPTIDO

20 <222> (1)...(34)

<400> 1

25 **Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His**
1 5 10 15

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

35 **Leu Leu**

40

45

50

55

60

65