



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900375578
Data Deposito	22/06/1994
Data Pubblicazione	22/12/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	D		

Titolo

"COMPOSTI INIBITORI DELLO SVILUPPO DI VIRUS HIV, LORO PREPARAZIONE E USI".

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto di invenzione dal titolo:

"Composti inibitori dello sviluppo di virus HIV, loro preparazione e usi"

a nome: DEVELOPMENT BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES

s.n.c. di Rossi Valentina

inventori: De Rosa Alfredo, Rossi Armando

La presente invenzione ha per oggetto composti inibitori dello sviluppo di virus appartenenti alla famiglia dei virus della immunodeficienza umana (HIV), la loro preparazione e usi.

Più in particolare l'invenzione concerne peptidi ciclici che inibiscono lo sviluppo dei virus HIV-1, HIV-2 e di varianti naturali o ricombinanti di essi, la loro preparazione ed uso per applicazioni terapeutiche e profilattiche nella terapia dell'AIDS.

L'infezione da HIV porta allo sviluppo della Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS) [F. Barré-Sinoussi et al., Science, 220, 868-870, 1983; F. Clavel et al., Science, 223, 343-346, 1986]. Numerosi composti capaci di interferire con la replicazione del virus sono stati sviluppati per il trattamento dell'AIDS. Tra questi sono di un certo interesse sostanze antivirali capaci di inibire la trascrizione del virus ed il suo assemblaggio [G. Skowron, Hosp. Pract., 27, Suppl. 2, 5-13, 1992; S. Scharpe et al., Biochimie, 73, 121-126, 1992; M. A. Fischl et al., N. Engl. J. Med., 317, 185-191, 1987], vaccini che aumentano la risposta

*Ing. Barré-Sinoussi
Roma spa*

immunitaria anti-HIV [D. Birx and R. R. Redfield, *Int. J. Immunopharmacol.*, 13, Suppl 1, 9-18, 1991; R. Taylor, *J. Natl. Inst. Health Res.*, 4, 89-93, 1992; R. R. Redfield et al., *N. Eng. J. Med.*, 324, 1677-1684, 1991] oltre a sostanze dirette contro il virus [D. H. Smith et al., *Science*, 238, 1704-1707, 1987; A. Trauneker et al., *Nature*, 331, 84-86, 1988; K. C. Deen et al., *Nature*, 331, 82-84, 1988; R. E. Hussey et al., *Nature*, 331, 78-81, 1988; R.A. Fisher et al., *Nature*, 331, 76-78, 1988; G. G. Jackson et al., *Lancet* 9, 647-652, 1988; A. M. Prince et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 85, 6944-6948, 1988; W. A. Marasco et al., *J. Clin. Invest.* 90, 1467-1478, 1992; V. K. Chaudhary et al., *Nature*, 335, 369-372, 1988; V. Ghetie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 88, 5690-5693, 1991; M. A. Till et al., *Science*, 242, 1166-1168, 1988; S. H. Pincus et al., *J. Immunol.*, 142, 3070-3075, 1989; R. W. Finberg et al., *Science*, 252, 1703-1705, 1991; J. M. Zarling et al., *Nature*, 347, 92-95, 1990] ed a combinazioni di sostanze differenti capaci di inibire sia cellule quiescenti che attivate [K.D. Bell et al., *Proc. Natl Acad. Sci.*; 90, 1411-1415, 1993]. Al momento solo l'azidotimidina è largamente adoperata per il trattamento dell'AIDS. Essa presenta comunque numerosi inconvenienti, tra cui l'elevata tossicità e lo sviluppo di virus mutanti resistenti all'azidotimidina [E. Dournon et al., *Lancet* ii, 1297-1302, 1988; N. Mir and C. Costello, *Lancet* ii, 1195-1196, 1988; B. Larder and S.D. Kemp, *Science*, 246, 1155-1158, 1989].

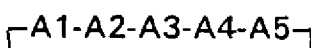
Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.

Nuove molecole sono state proposte come alternativa per il controllo dello sviluppo del virus HIV. Queste molecole, analoghe della ciclosporina [Domanda di Brevetto PCT WO 93/14780] sono in generale dotate di elevata tossicità, ma soprattutto presentano un'attività immunosoppressiva, controindicata nei pazienti affetti da AIDS; inoltre la loro efficacia non è stata ancora accertata.

Da qui la necessità di sviluppare nuove molecole che possano essere adoperate per la preparazione di composizioni farmaceutiche adatte alla profilassi e terapia dell'AIDS e che non presentino gli inconvenienti delle molecole fino ad ora sviluppate.

Gli autori della presente invenzione hanno sviluppato nuove molecole non note dai documenti di tecnica anteriore con un'attività antivirale, in particolare per il virus HIV. Le abbreviazioni, quando non specificate, si riferiscono ai venti amminoacidi naturali.

I composti ciclici della presente invenzione hanno formula generale:



(I)

in cui: A1 e A2 rappresentano qualsiasi imminoacido e possono essere uguali o diversi tra loro; A3 e A4 rappresentano qualsiasi amminoacido idrofobico e possono essere uguali o diversi tra loro; A5 rappresenta un braccio spaziatore di lunghezza compresa tra circa 12 Å e 21 Å, legato covalentemente alle estremità N-terminale di A1 e C-terminale di A4.

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Forme preferite di attuazione dell'invenzione comprendono composti ciclici in cui A1 e A2 rappresentano un qualsiasi imminoacido idrofobico N-sostituito con un gruppo alchilico contenente da 1 a 4 atomi di carbonio. Preferibilmente A1 e A2 sono compresi nel gruppo di: acido azetidinico (Azt), prolina (Pro), acido pipercolico (Pip), sarcosina (Sar); A3 e A4 sono compresi nel gruppo di: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptofano (Trp), β -1-naftilalanina (1-Nal), β -2-naftilalanina (2-Nal), cicloesilalanina (Cha), cicloesilglicina (Chg); A5 è un braccio spaziatore comprendente un peptide contenente da 3 a 5 residui amminoacidici a carattere prevalentemente idrofobico. Sono preferiti bracci spaziatori peptidici compresi nel gruppo: Aib-Aib-Val di lunghezza di circa 12 Å, in cui Aib rappresenta l'acido α -amminoisobutirrico; Pro-Pro-Phe-Phe, di lunghezza di circa 16.5 Å, Leu-Ile-Ile-Leu-Val; Aib-Aib-Ile-D-Ala-Val, di lunghezza di circa 21 Å; Cys(α OMe)-SSCys(α Boc)-Val, di lunghezza di circa 15.3 Å, in cui OMe rappresenta il metilestere e Boc il tert-butilossicarbonile.

Secondo una forma preferita di attuazione dell'invenzione A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Tyr, A4 rappresenta Phe, A5 rappresenta Leu-Ile-Ile-Leu-Val di lunghezza calcolata di circa 21 Å.

Secondo una forma alternativa preferita di attuazione dell'invenzione A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Phe, A4 rappresenta Phe, A5 rappresenta Aib-Aib-Ile-D-Ala-Val di lunghezza calcolata di circa 21 Å.

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Secondo una forma alternativa preferita di attuazione dell'invenzione A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Phe, A4 rappresenta Phe, A5 rappresenta Cys(aOMe)-SSCys(aBoc)-Val- di lunghezza calcolata di circa 15.3 Å.

Secondo una forma alternativa preferita di attuazione dell'invenzione A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Phe, A4 rappresenta Phe, A5 rappresenta Pro-Pro-Phe-Phe di lunghezza calcolata di circa 16.5 Å.

Secondo una forma alternativa preferita di attuazione dell'invenzione A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Phe, A4 rappresenta Phe, A5 rappresenta Aib-Aib-Val di lunghezza calcolata di circa 12 Å.

Costituisce ulteriore oggetto dell'invenzione l'uso dei composti dell'invenzione per la preparazione di un medicamento farmaceuticamente accettabile per la terapia di infezioni da HIV.

Gli autori hanno trovato che il segmento A1-A2-A3-A4 rappresenta la parte attiva della molecola, quando opportunamente strutturata attraverso la struttura ciclica ottenuta con il braccio spaziatore A5.

Il termine "qualsiasi imminoacido" qui adoperato si riferisce agli isomeri L e D sia di imminoacidi naturali sia di quelli "non proteici", comunemente adoperati nella chimica dei peptidi per la preparazione di analoghi sintetici di peptidi naturali. Esempi di imminoacidi "non proteici" sono tioprolina, deidroprolina, idrossiprolina, acido pipercolico, acido azetidico, sarcosina.

Ing. Bassano G. Zanardo
Roma s.p.a.

Il termine "qualsiasi amminoacido idrofobico" qui adoperato si riferisce agli isomeri L e D sia di amminoacidi naturali sia di quelli "non proteici" comunemente adoperati nella chimica dei peptidi per la preparazione di analoghi sintetici di peptidi naturali. Gli amminoacidi idrofobici naturali sono glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, prolina, istidina, asparagina, glutammina. Esempi di amminoacidi idrofobici "non proteici" sono norleucina, norvalina, alloisoleucina, omofenilalanina, acido α -amminobutirrico, acido α -amminocaproico, acido α -amminovalerico, cicloesilglicina, cicloesilalanina, acido amminofenilbutirrico, fenilalanine mono- e di- sostituite nelle posizioni *orto*, *meta* e *para* dell'anello aromatico con uno o più alogeni, β -2- e 3-tienilalanina, β -2- e 3-furanilalanina, β -2-, 3- e 4-piridilalanina, β -(1- o 2-naftil)alanina, derivati O-alchilati della serina, omoserina, treonina, allotreonina e tirosina, cisteina S-alchilata, omocisteina S-alchilata, lisina ϵ -alchilata, ornitina δ -alchilata.

Il termine "braccio spaziatore" qui adoperato si riferisce a quella parte di una struttura chimica che definisce il più piccolo numero di legami chimici consecutivi che possono essere tracciati da una estremità all'altra di detta struttura chimica. I componenti atomici del braccio spaziatore corrispondono a qualsiasi tipo di atomo capace di formare almeno due legami chimici.

Il termine "lunghezza" si riferisce alla misura predittiva ottenuta sommando le lunghezze di legame tra gli atomi compresi nel braccio spaziatore. Le lunghezze di legame tra due atomi è ben

Ing. Barzani & C. Zanardi
Roma s.p.a.

nota dalla letteratura [CRC Handbook of Chemistry and Physics, 65 edizione, R.C. Weist, CRC press, Inc. Boca Raton, Florida USA pp. F-166-170 (1984)].

Il braccio spaziatore così definito gioca un ruolo importante nel determinare la struttura tridimensionale e quindi la potenza biologica della porzione responsabile dell'attività inibitoria dello sviluppo del virus HIV e dei retrovirus relativi, oltre che a determinarne la rigidità conformazionale idonea per una maggiore resistenza alle proteasi plasmatiche.

Le molecole oggetto della presente invenzione possono essere egualmente sintetizzate con le varie tecniche riportate nella letteratura; si veda per esempio Schroeder et al. "The Peptides" vol 1, Academic Press, 1965; Bodanszky et al. "Peptide Synthesis" Interscience Publisher, 1966; Barany & Merrifield, "The peptides; Analysis, Synthesis, Biology", 2, Capitolo 1, Academic Press, 1980. Queste tecniche includono sintesi peptidica in fase solida, sintesi peptidica in soluzione, metodiche sintetiche di chimica organica, oppure una qualunque combinazione di esse. Lo schema di sintesi prescelto dipenderà dalla composizione della particolare molecola. Di preferenza, essendo le molecole rivendicate interamente su base peptidica, sono utilizzate metodiche sintetiche basate su appropriate combinazioni di tecniche in fase solida e di metodi classici in soluzione, che comportano bassi costi produttivi, in particolare su scala industriale. Nel dettaglio tali metodiche consistono nella:

Ing. Baranò & Baranò
Roma s.p.a.

i) Sintesi in soluzione di frammenti della catena peptidica attraverso l'accoppiamento successivo di amminoacidi N-protetti, opportunamente attivati, ad un amminoacido o ad una catena peptidica C-protetta, con isolamento degli intermedi, successiva deprotezione selettiva delle estremità N- e C-terminali di detti frammenti ed accoppiamento di essi fino all'ottenimento del peptide desiderato. Infine si esegue la deprotezione selettiva dei gruppi coinvolti nella ciclizzazione, come ad esempio delle estremità N e C terminali e si procede quindi alla loro condensazione. Infine, ove necessario, si deproteggono le catene laterali.

ii) Sintesi in fase solida della catena peptidica dall'estremità C-terminale verso quella N-terminale su di un supporto polimerico insolubile. Il peptide viene rimosso dalla resina per idrolisi con acido fluoridrico anidro o con acido trifluoroacetico in presenza degli opportuni scavengers.

Nel caso dei peptidi in cui la ciclizzazione è ottenuta attraverso formazione del ponte disolfuro tra due residui cisteinici, protetti permanentemente alle funzioni N- e C-terminali, la reazione di ossidazione può essere condotta con metodi convenzionali sia in soluzione che in fase solida dopo rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali dei residui cisteinici.

Per le molecole oggetto della presente invenzione in cui la struttura ciclica è realizzata attraverso la formazione di legami peptidici, la ciclizzazione può sia essere effettuata in soluzione diluita delle estremità N- e C-terminali, preventivamente liberate dei

*Ing. Barrano & Ranardo
Roma s.p.a.*

gruppi protettori, oppure direttamente in fase solida mediante l'uso delle metodiche ben note della sintesi peptidica in fase solida.

L'efficacia delle molecole della presente invenzione di inibire lo sviluppo del virus HIV-1 è stata valutata in vitro in due gruppi di esperimenti. Il primo riguarda il rilascio della proteina virale p55gag da parte di cellule di insetto infettate con Baculovirus ricombinante [D. Gheysen et al., Cell, vol.59, 103-112, 1989; A. Gallina et al., Proc. Biotech, 94, AIDS, pag. 89; T. Fitzon et al., Ibid.; Gederblom et al., Micron. Microsc., 19, 41-60, 1988; Katsumoto et al., Intervirology, 27, 148-153, 1987]; il secondo riguarda l'effetto in coltura dei composti oggetto della presente invenzione nella produzione dell'HIV-1 su linfociti T [Karpas et al. Lancet, 697-699, 1985; Karpas et al., Proc. Acad. Natl. Sci., 89, 8351-8355, 1992].

Le molecole oggetto della presente invenzione, a differenza delle molecole note dallo stato della tecnica, non presentano attività immunosoppressiva, come accertato in vitro sulla proliferazione di linfociti umani di sangue periferico e sono strutturalmente molto diverse da composti proposti per la terapia e profilassi dell'AIDS come la ciclosporina o l'FK506.

La dose di un peptide di questa invenzione può variare da 0.05 mg/Kg a 250 mg/Kg di peso corporeo del paziente per giorno, in funzione del paziente, della gravità dell'infezione virale e del peptide scelto. La dose opportuna, che può essere facilmente determinata, dovrebbe prevedere fino ad un massimo di 4 dosi giornaliere variabili da 1 a 100 mg di composto attivo per dose. Le

Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.

dosi possono essere utilizzate in combinazione con composizioni e metodi per il trattamento dell'AIDS. I composti oggetto della presente invenzione sono adatti alla somministrazione a fini terapeutici all'uomo attraverso la via parenterale, subcutanea, topica o nasale, raggiungendo effetti farmacologici in accordo con le proprietà sopra descritte. Per la via orale si possono preparare soluzioni o sospensioni acquose o oleose, emulsioni, sciroppi, elisir o liofilizzati. Applicazioni topiche possono essere effettuate mediante preparazioni sotto forma di gel acquoso, sospensione oleosa o emulsione. Le dosi di principio attivo nelle composizioni suddette possono essere comprese tra 0.1 e 10 mg/kg di peso corporeo. I composti dell'invenzione possono essere somministrati anche nella forma di un "depot injection" o "implant preparation", che possono essere formulati in maniera tale da permettere un rilascio sostanziale di ingrediente attivo. L'ingrediente attivo può essere compresso in pasticche o piccoli cilindri e impiantato subcutaneamente o intramuscolo come "depot injections" o impianti. Gli impianti possono impiegare materiali inerti come polimeri biodegradabili o siliconi sintetici.

I seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione e non devono essere interpretati in maniera limitativa dell'ambito di protezione della presente domanda di brevetto.

ESEMPIO 1 Preparazione del composto di struttura ciclo(Pro-Pro-Tyr-Phe-Leu-Ile-Ile-Leu-Val)

Ing. Bassano G. Ranardo
Roma sp. a. 1984

Per la sintesi si utilizza un sintetizzatore di peptidi automatico partendo da 0.714 g di Boc-Tyr(OBz)-OCH₂-PAM resina (0.70 meq/g) pari a 0.5 mmoli di gruppi amminici. Sono quindi fatti reagire nell'ordine i seguenti amminoacidi: Boc-Pro-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Val-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Phe-OH. La resina secca viene posta in un reattore di teflon con 1 ml di anisolo; la miscela viene portata a -50°C e vi vengono distillati 10 ml di acido fluoridrico, quindi viene mantenuta sotto agitazione per 1 h in un bagno di ghiaccio. L'acido fluoridrico viene rimosso con corrente di azoto, il prodotto viene essiccato sotto vuoto per 2 ore, lavato con etere etilico (2 x 15 ml) ed estratto con acido acetico al 50% (3 x 15 ml), filtrato su un imbuto con setto poroso per allontanare la resina esaurita. La soluzione risultante è diluita con acqua e liofilizzata. Il peptide è infine purificato per cromatografia in fase inversa e caratterizzato mediante HPLC analitica con colonna Vydac C18 0.46 x 25 cm con un gradiente lineare in acetonitrile contenente lo 0.1% (v/v) di acido trifluoroacetico (fase B) contro acido trifluoroacetico acquoso 0.1% (v/v) (Fase A), dal 5 al 70% in B in 35 min ad un flusso di 1 ml/min, con rivelazione UV a 210 nm. Tempo di ritenzione (Rt) = 24.0 min; purezza cromatografica >99%. La ciclizzazione viene effettuata in soluzione diluita (circa 1mM) di N,N-dimetilacetammide utilizzando benzotriazolo-1-il-oxi-Tris-pirrolidino-fosfonio-esafuorofosfato (pyBop) come agente attivante. Dopo circa 24 h il

Ing. Bassano & C. s.p.a.
Roma

prodotto viene purificato ed analizzato come descritto precedentemente. Tempo di ritenzione $R_t = 26.0$ min.

ESEMPIO 2 Preparazione del composto di struttura ciclo(Pro-Pro-Phe-Phe-Aib-Aib-Ile-D-Ala-Val)

Per la sintesi si utilizza un sintetizzatore di peptidi automatico partendo da 0.714 g di Boc-Phe-OCH₂-PAM resina (0.70 meq/g) pari a 0.5 mmoli di gruppi amminici. Sono quindi fatti reagire nell'ordine i seguenti amminoacidi: Boc-Pro-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Val-OH, Boc-D-Ala-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Phe-OH. Dopo distacco dalla resina e successiva purificazione, la ciclizzazione viene effettuata come riportato nell'esempio 1. $R_t = 28.5$ min.

ESEMPIO 3 Preparazione del composto di struttura ciclo(Boc-Cys-Val-Pro-Pro-Phe-Phe-Cys-OMe)

Per la sintesi si adopera la stessa procedura descritta in letteratura [G. Zanotti et al. Biopolymers, 33, 1083-1091, 1993]

ESEMPIO 4 Preparazione del composto di struttura ciclo(Pro-Pro-Phe-Phe)₂

Per la sintesi si utilizza la stessa procedura descritta nell'esempio 1 partendo da 0.714 g di Boc-Phe-OCH₂-PAM resina (0.70 meq/g) pari a 0.5 mmoli di gruppi amminici. Sono quindi fatti reagire nell'ordine i seguenti amminoacidi: Boc-Pro-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Phe-OH.

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

Dopo distacco dalla resina e successiva purificazione, la ciclizzazione viene effettuata come riportato nell'esempio 1. Rt = 27.5 min.

ESEMPIO 5 Preparazione del composto di struttura ciclo(Pro-Pro-Phe-Phe-Aib-Aib-Val)

Per la sintesi si utilizza la stessa procedura descritta nell'esempio 1 partendo da 0.714 g di Boc-Phe-OCH₂-PAM resina (0.70 meq/g) pari a 0.5 mmoli di gruppi amminici. Vengono quindi fatti reagire nell'ordine i seguenti amminoacidi: Boc-Pro-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Val-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Phe-OH.

Dopo distacco dalla resina e successiva purificazione, la ciclizzazione viene effettuata come riportato nell'esempio 1. Rt = 27.0 min.

ESEMPIO 6 Valutazione dell'attività anti-HIV

a. Impiego di cellule di insetto Sf9 infettate con Baculovirus ricombinante.

Si procede preliminarmente al clonaggio del gene gag di HIV-1 in Baculovirus e selezione del Baculovirus ricombinante. Il plasmide pHXB2 contenente l'intero genoma di HIV-1 è stato digerito con SacI ed HincII ed il frammento 1852 coppie di basi, corrispondente all'intero gene gag, è stato clonato nel vettore pBS (+/-). Il plasmide risultante è stato quindi ritagliato con EcoRI e BamHI ed il frammento estratto ligato al vettore pVL1392, (pVL1392-GAG) in cui il gene gag si trova ad essere inserito a valle del promotore del gene della poliedrina.

Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

Per ottenere il virus ricombinante è stato utilizzato un protocollo standard come descritto da Summers & Smith (Manual of methods for Baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Text. Agricultural experimental station, Bullettin, 1555). 3 mg di plasmide pVL1392-gag sono stati mescolati a 100 ng di DNA di Autographa californica (AcRP23 lacZ) in presenza di lipofectina ed aggiunti alle cellule Sf9 per 6 ore a 28°C. Il supernatante viene quindi eliminato e sostituito con terreno fresco. Il virus ricombinante viene quindi isolato attraverso un esperimento di "plaque assay". Le cellule Sf9 vengono piastrate in sei pozzetti ad una densità di 1.5×10^6 e quindi infettate con diverse diluizioni del supernatante ottenuto dalla cotransfezione. Dopo una incubazione di 2 ore il supernatante viene eliminato e le cellule ricoperte con una soluzione contenente il terreno ed agarosio. Le placche ricombinanti riconosciute con microscopio ottico vengono quindi isolate e ripropagate nelle cellule Sf9 e purificate attraverso due ulteriori cicli di "plaque assay".

La presenza del gene eterologo nel virus ricombinante viene saggiata con PCR. Dopo tale verifica viene preparato uno stock virale ad alto titolo per valutare l'effetto dei peptidi di cui agli esempi 1-5 sulla produzione di Virus-Like Particles (VLPS) [D. Gheysen et al., Cell, 59, 103-112, 1989; A. Gallina et al., Proc. Biotech 94, AIDS, pag. 89; T. Fitzon et al., ibid.]. Fiasche di formato T25 con 4 mL di terreno senza siero con cellule ad una concentrazione di 2×10^6 vengono infettate con lo stock virale ad

Ing. Barzani G. Barzani
Roma 2001

una molteplicità di infezione di 10-20; dopo due ore viene rimosso il supernatante e sostituito con terreno con siero. Trascorse 20 ore dall'infezione si aggiungono in cinque esperimenti paralleli i peptidi di cui agli esempi 1-5 a due diverse concentrazioni (1 e 10 mg/mL). Dopo 72 ore si raccolgono i supernatanti, si concentrano 10 volte e si caricano su un gradiente preformato di saccarosio (dal 20 al 60%). Il gradiente viene ultracentrifugato con rotore SW per 18 ore a 35Krpm a 20°C. A fine corsa si suddivide il gradiente in frazioni, che vengono esaminate in Western blot. Le cellule infettate in assenza del peptide producono le particelle che sedimentano tra il 40 e 45% di saccarosio, mentre la presenza del peptide inibisce per tutti i composti saggiati la formazione di VLPS ad una concentrazione di 1 mg/mL.

E' stata successivamente verificata l'inibizione mediata dai cinque peptidi (esempi 1-5) con citofluorimetro (FACscan, Becton Dickinson, San Josè, CA). Cellule Sf9 infettate con virus selvatico, con virus p55 o con virus p55 in presenza del peptide vengono incubate per 30 min a 4°C con un anticorpo anti p24 6BW (Sorin Biomedica, Saluggia, Italy) coniugato con FITC, a varie concentrazioni. Circa il 50% delle cellule infettate con p55 appaiono fluorescenti, mentre l'aggiunta del peptide porta, in tutti i cinque esperimenti, la fluorescenza a livello del controllo con le cellule Sf9 selvatiche.

b. Impiego di linfociti periferici (PBL) infettati con HIV-1.

Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

PBL sono stati preparati a partire da donatori sani attraverso gradiente Ficoll/Hypaque. Le cellule sono state seminate in una fiasca contenente terreno RPMI-1640 contenente siero fetale bovino e 10% IL-2. Al quarto giorno le cellule sono state raccolte, lavate ed esposte ad un supernatante contenente un isolato clinico di HIV-1 per 4-5 ore, lavate nuovamente, suddivise e coltivate in piastra a 24 pozzetti ad una densità di 1×10^6 per mL. In cinque esperimenti paralleli, le cellule sono state esposte a varie concentrazioni (1-10 mg) di peptide di cui agli esempi 1-5, operando in duplicato. La produzione dei precursori gag è stata esaminata in immunofluorescenza al citofluorimetro, come in precedenza descritto. Inoltre i diversi supernatanti sono stati esaminati per la capacità di produrre l'antigene p24, utilizzando un test preparato internamente.

Il test al citofluorimetro ha dimostrato che i peptidi descritti negli esempi 1-5 determinano, come visto per le cellule di insetto infettate con Baculovirus gag ricombinante, un'aumento della fluorescenza sulla membrana ed una parallela diminuzione dei valori di p24 nel supernatante di coltura. Analogamente si è osservato lo stesso fenomeno utilizzando il farmaco ciclosporina.

Inoltre, allo scopo di determinare se i peptidi descritti negli esempi 1-5 determinano un abbassamento della capacità infettiva di HIV-1, sono state utilizzate cellule MOLT-4 con alta espressione del recettore cellulare CD4 per condurre il saggio della formazione dei sincizi. Le cellule MOLT-4 sono state infettate con un ceppo

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

fortemente citotossico di HIV-1 denominato NDK. Quando le cellule infettate con NDK vengono coltivate con cellule MOLT-4 non infettate con un rapporto 1:100 si formano cellule giganti entro le 24 ore. Il saggio di inibizione mediato dal farmaco è stato condotto come descritto precedentemente [Karpas et al. Lancet, 697-699, 1985]; le cellule bersaglio vengono preincubate a varie concentrazioni prima dell'infezione con le cellule MOLT-4 recanti HIV-1.

I risultati di questo esperimento hanno dimostrato che l'aggiunta di uno qualsiasi dei peptidi descritti negli esempi 1-5 ad una concentrazione di 20 mg/mL vi era un ridottissimo numero di cellule giganti (<1%) rispetto alle cellule non trattate.

ESEMPIO 7 Valutazione dell'attività immunosoppressiva

Cellule mononucleari da sangue venoso eparinizzato sono state preparate mediante centrifugazione su Ficoll-Hypaque e coltivate come 2×10^5 cellule/piastra in 0.1 mL di RPMI contenente 10% siero fetale bovino, 100 U/mL penicillina e 100 mg/mL streptomicina.

1-10 mg di peptidi disciolti in DMSO oppure in Tween 80 in etanolo, diluiti nel mezzo di coltura con 0.05 mL di fitoemoagglutinina (2µg/piastra) sono stati aggiunti a ciascuna piastra contenente 2×10^5 cellule in 0.1 mL di mezzo di coltura. Come controllo è stata adoperata una appropriata concentrazione di solvente e di soluzioni di ciclosporina a varie concentrazioni. Le cellule sono state coltivate per 72 h a 37°C in atmosfera umida e

Ing. Barxano & Barxano
Roma spa

dopo 48 h è stato aggiunto 1 μCi [$6\text{-}^3\text{H}$]timidina in 0.05 mL. Nessuna variazione significativa nell'incorporazione di timidina è osservata in presenza dei peptidi descritti negli esempi 1-5.

La presente invenzione è stata descritta, a titolo illustrativo ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, ma è da intendersi che variazioni e/o modifiche potranno essere apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliercio
(N° d'iscr. 171)

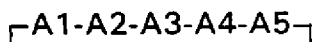
Taliercio

Ing. Barzani & Tanardi
Roma spa.



RIVENDICAZIONI

1. Composto ciclico avente formula generale:



(I)

in cui: A1 e A2 rappresentano qualsiasi imminoacido e possono essere uguali o diversi tra loro; A3 e A4 rappresentano qualsiasi amminoacido idrofobico e possono essere uguali o diversi tra loro; A5 rappresenta un braccio spaziatore di lunghezza compresa tra circa 12 e 21 Å, legato covalentemente alle estremità N- terminale di A1 e C-terminale di A4.

2. Composto ciclico secondo la rivendicazione 1 in cui A1 e A2 rappresentano un qualsiasi imminoacido idrofobico N-sostituito con un gruppo alchilico contenente da 1 a 4 atomi di carbonio.

3. Composto ciclico secondo la rivendicazione 2 in cui A1 e A2 sono compresi nel gruppo di: Azt, Pro, Pip, Sar; A3 e A4 sono compresi nel gruppo di: Phe, Tyr, Trp, 1-Nal, 2-Nal, Cha, Chg; A5 è un braccio spaziatore comprendente un peptide contenente da 3 a 5 residui amminoacidici a carattere prevalentemente idrofobico.

4. Composto ciclico secondo la rivendicazione 3 in cui detti bracci spaziatori peptidi sono compresi nel seguente gruppo: Aib-Aib-Val di lunghezza di circa 12 Å, Pro-Pro-Phe-Phe, di lunghezza di circa 16.5 Å, Leu-Ile-Ile-Leu-Val; Aib-Aib-Ile-D-Ala-Val, di lunghezza di circa 21 Å; Cys(α OMe)-SSCys(α Boc)-Val, di lunghezza di circa 15Å.

5. Composto ciclico secondo la rivendicazione 4 in cui A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Tyr, A4

Ing. Barrano & Nanardo
Roma s.p.a.

rappresenta Phe, A5 rappresenta Leu-Ile-Ile-Leu-Val di lunghezza calcolata di circa 21 Å.

6. Composto ciclico secondo la rivendicazione 4 in cui A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Phe, A4 rappresenta Phe, A5 rappresenta Aib-Aib-Ile-D-Ala-Val di lunghezza calcolata di circa 21 Å.

7. Composto ciclico secondo la rivendicazione 4 in cui A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Phe, A4 rappresenta Phe, A5 rappresenta Cys(α OMe)-SSCys(α Boc)-Val di lunghezza calcolata di circa 15.3 Å.

8. Composto ciclico secondo la rivendicazione 4 in cui A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Phe, A4 rappresenta Phe, A5 rappresenta Pro-Pro-Phe-Phe di lunghezza calcolata di circa 16.5 Å.

9. Composto ciclico secondo la rivendicazione 4 in cui A1 rappresenta Pro, A2 rappresenta Pro, A3 rappresenta Phe, A4 rappresenta Phe, A5 rappresenta Aib-Aib-Val di lunghezza calcolata di circa 12 Å.

10. Uso dei composti secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti per la preparazione di un medicamento farmaceuticamente accettabile per la terapia di infezioni da HIV.

Roma, 22 GIU. 1994

p.p.: Development Biotechnological Processes s.n.c. di Rossi
Valentina

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A

UN MANDATARIO OC
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N° d'iscr. 171)

Talierno



*Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.*