



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 439**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02700342 .5**

(86) Fecha de presentación : **21.01.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1368372**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.2003**

(54) Título: **Péptidos que presentan una afinidad por la proteína viral gp120, y uso de estos péptidos.**

(30) Prioridad: **23.01.2001 FR 01 00893**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(73) Titular/es:
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
25, rue Leblanc - Immeuble "Le Ponant D"
75015 Paris, FR

(72) Inventor/es: **Vita, Claudio;**
Martin, Loic;
Roumestand, Christian y
Veas, Francisco

(74) Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

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

Péptidos que presentan una afinidad por la proteína viral gp120, y uso de estos péptidos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una familia de péptidos que presentan una afinidad y una especificidad elevadas por la proteína viral gp120, a procedimientos de fabricación de esos péptidos, y al uso de esos péptidos.

10 La proteína viral gp120 es una glicoproteína de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia. Interviene en la primera etapa del ciclo de replicación del virus, es decir, en la etapa de reconocimiento de la proteína CD4 de la membrana de los linfocitos por la envuelta del virus, y de fusión de las membranas para la internalización de la nucleocápsida. De hecho se trata de la proteína más externa del sitio de reconocimiento de la proteína CD4 por la envuelta del virus.

15 Existen numerosos virus de la inmunodeficiencia que comprenden una proteína de la envuelta análoga a la proteína viral gp120. Entre ellos pueden mencionarse el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), el virus de la inmunodeficiencia ovina (VISNA), el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB) y el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF).

20 Ciertos péptidos de la presente invención pueden fijarse a la proteína viral gp120 de la envuelta viral, inhibir la fijación de la proteína viral gp120 al receptor CD4, con valores de CI_{50} de entre 0,1 y 400 nM en función de su secuencia. Algunas de estas moléculas pueden inhibir la infección de linfocitos T por el virus VIH con, por ejemplo, una DE_{50} (dosis eficaz al 50%) de 100 a 900 nM. Además, la fijación de estas moléculas a la proteína viral gp120 recombinate induce una variación conformacional en la misma que desenmascara nuevos epítomos, con la misma eficacia que la molécula CD4 soluble.

25 Los péptidos de la presente invención pueden encontrar aplicaciones terapéuticas y de vacunas. También permiten diseñar nuevas moléculas útiles, por ejemplo, en la detección pero también en la purificación de la proteína de la envuelta del VIH y en el descubrimiento de nuevos medicamentos anti-SIDA.

Técnica anterior

35 Se llevan a cabo numerosas investigaciones para encontrar tratamientos y medios eficaces de prevención de la infección por el virus de la inmunodeficiencia y especialmente de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las principales dificultades se refieren al desarrollo de vacunas y de tratamientos inmunoterapéuticos eficaces. Esto se debe particularmente a la variabilidad del virus, a la dificultad de comprensión del mecanismo de su entrada en las células diana y de la respuesta inmunitaria necesaria para la protección frente a la infección por el virus.

40 En la descripción siguiente, las referencias entre corchetes se refieren a los documentos de la lista de referencias adjunta.

Tal como demuestra el análisis de la estructura tridimensional del complejo CD4-gp120 [1] (véanse las referencias adjuntas), los elementos estructurales del CD4 críticos para su unión a la glicoproteína viral gp120 incluyen los aminoácidos Gly38, Gln40, Gly41, Ser42, Phe43, Thr45, que están comprendidos en la región 36-47, y la arginina-59 del CD4. La región 36-47 del CD4 se ha asimilado a la región CDR2 de las inmunoglobulinas y presenta una estructura ordenada en forma de horquilla. Esta estructura está formada por una cadena β (C'), que corresponde a la secuencia 36-40, seguida por un codo que corresponde a la secuencia 40-43 que permite que una segunda cadena β (C''), que corresponde a la secuencia 43-47, forme con la primera una estructura β antiparalela. Esta estructura se estabiliza por enlaces de hidrógeno entre el nitrógeno amídico de los residuos Gly38, Gln40, Phe43, Thr45, Gly47 de la primera cadena β y el oxígeno carbonílico de los residuos, respectivamente, Thr45, Phe43, Gln40, Gly38, Ile36 de la segunda cadena β . Esta estructura en horquilla tiene un papel central en la interacción del CD4 con la proteína viral gp120 y cumple una doble función: en primer lugar, permite a los aminoácidos Gly38, Gln40, Gly41, Ser42, Phe43 y Thr45 formar una superficie molecular complementaria a la superficie de interacción de la proteína viral gp120 y, particularmente, permite que la cadena lateral de Phe43 se inserte en la entrada de una cavidad hidrófoba en la superficie molecular de la proteína viral gp120; en segundo lugar, permite una interacción de tipo lámina β entre los esqueletos polipeptídicos de la cadena β C'' del CD4 y la cadena β 15 (residuos 365-368) de la proteína viral gp120. La arginina 59 (Arg59) también tiene un papel crítico en la interacción CD4-gp120, ya que el grupo guanidinio de su cadena lateral forma un doble puente de hidrógeno con la cadena lateral del residuo Asp368 de la proteína viral gp120, que permite la estabilización de la interacción de tipo estructura β entre las cadenas C'' del CD4 y β 15 de la proteína viral gp120. Experimentos de mutagénesis dirigida han demostrado que todos estos residuos del CD4 desempeñan un papel crítico en la interacción con la proteína viral gp120 [2], [3].

65 La reproducción de esta estructura ordenada en horquilla y de la conformación de las cadenas laterales de sus residuos es crítica en una molécula que debe fijarse sobre la proteína viral gp120 en el sitio de interacción del CD4. El hecho de que las construcciones peptídicas sencillas, tales como un péptido lineal que corresponde a la secuencia 37-53 y un péptido cíclico que corresponde a la secuencia 37-46 del CD4, no presenten una afinidad medible por la proteína viral gp120, es una demostración [4].

La infección de las células CD4 por el VIH está mediada por una interacción de alta afinidad entre la envuelta viral y el CD4. Experimentos de mutagénesis y competición con anticuerpos han permitido localizar en el dominio D1 del CD4, la superficie de contacto con la proteína gp120 de la envuelta viral. Recientemente se ha resuelto mediante cristalografía la estructura tridimensional de una forma recombinante funcional de la glicoproteína gp120, pero con delección de los bucles V1-V2-V3 y de las regiones N- y C-terminales, en complejo con los dominios D1D2 del CD4 y con el fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal [1]. En esta estructura, el CD4 interacciona con una depresión grande de la superficie molecular ($800 \text{ \AA}^2$) de la proteína viral gp120, utilizando una superficie molecular grande ($742 \text{ \AA}^2$), que está centrada alrededor de la región que se ha asimilado a la región CDR2 de las inmunoglobulinas. En el centro de la depresión molecular de la proteína viral gp120 se abre una cavidad estrecha y profunda, la "cavidad Phe43", en la que la cadena lateral de la Phe43, en el vértice de la región CDR2 del CD4, ocupa la entrada. La resolución de esta estructura confirma los datos anteriores de la mutagénesis, que indican que el residuo Phe43 y todo el bucle CDR2 son funcionalmente muy importantes, y proponen éste último como posible diana para la inhibición de la unión de los viriones VIH-1 a las células. La interacción gp120-CD4 permite la fijación del virus a la membrana de las células diana y representa la primera interacción proteína-proteína en el mecanismo de la infección. No obstante, son necesarios otros co-receptores para una entrada eficaz del VIH en las células. Se trata del CXCR-4 [5], [6], que está implicado en la entrada de las cepas virales linfotrópicas (X4), y del CCR-5 [7], [8], que está implicado en la entrada de las cepas M-trópicas (R5) y de la mayor parte de los aislados primarios. Varias pruebas indican que la fijación de la proteína viral gp120 sobre el CD4 produciría variaciones conformacionales en la glicoproteína de la envuelta, que expondrían nuevos sitios, detectables por anticuerpos específicos, denominados CD4i, y aumentarían la afinidad de la envuelta por los receptores de las quimiocinas [9], [10], los co-receptores de la entrada. Tras la fijación del CD4 y del co-receptor por la proteína viral gp120, otras variaciones conformacionales conducirían a una reorganización estructural de la gp41, que daría lugar a la exposición de su péptido fusogénico, y después a la fusión de las membranas virales y celulares y finalmente a la entrada de la carga viral en la célula.

La estructura cristalográfica de la proteína viral gp120 complejada al CD4 ha permitido esclarecer uno de los mecanismos que utiliza el VIH para escapar a la respuesta inmunitaria. Ya se sabía que la proteína de la envuelta gp120 presentaba regiones hipervariables y fuertemente glicosiladas. La estructura cristalográfica ha demostrado de hecho que las regiones hipervariables y las regiones altamente glicosiladas forman la superficie molecular expuesta de la proteína viral gp120, que también corresponde a la superficie accesible de los viriones. Sólo se conservan algunas regiones de la superficie molecular de la proteína viral gp120 y pueden ser la diana de los anticuerpos. Normalmente estas regiones no son accesibles y están probablemente protegidas por los bucles hipervariables (V1-V2-V3) que en la proteína cristalizada se han delecionado y por tanto son invisibles. Una de estas regiones es una superficie próxima al sitio de interacción para los receptores de las quimiocinas, y accesible para los anticuerpos CD4i, tras la fijación de la envuelta al CD4. El sitio de unión al CD4 es otra superficie expuesta y conservada; sin embargo, esta superficie está presente en una cavidad de la proteína viral gp120 y por tanto no es accesible para los anticuerpos, pero puede alojar el CD4 que presenta un único dominio de inmunoglobulina a diferencia de los anticuerpos que utilizan dos dominios para el reconocimiento molecular.

Las herramientas actualmente disponibles para el reconocimiento de la proteína de la envuelta (gp120) son limitadas. Se trata de los anticuerpos CD4i [11], [12], [13], que pueden fijar un gran espectro de envueltas primarias; sin embargo, su afinidad por la envuelta viral es débil y únicamente aumenta en presencia de CD4; lo que no hace que su uso resulte fácil ni sencillo. Otros anticuerpos, tales como IgG1b12, F105 o 15e no podrían reconocer todos los aislados primarios. Una molécula de CD4, marcada con biotina, también podría representar una solución. Esta molécula está comercialmente disponible (Intracel). Desgraciadamente, su precio es elevado y sus propiedades funcionales de fijación de la proteína viral gp120 han disminuido fuertemente (en 100 veces) por la reacción de biotilación, lo que limita en gran medida su uso.

La inhibición de la interacción de la proteína viral gp120 con el receptor principal de la entrada, el CD4, por un CD4 recombinante soluble y/o por quimeras de inmunoglobulinas que contienen dominios del CD4, ha sido uno de los primeros enfoques terapéuticos sugeridos y sometidos a experimentos para determinar la inhibición de la infección por VIH-1. Estas moléculas son eficaces *in vitro* para la inhibición de la infección viral únicamente en el caso de cepas adaptadas al laboratorio, pero son ineficaces en el caso de numerosos aislados primarios. Se han propuesto la rápida degradación *in vivo* de estas construcciones derivadas del CD4 y su afinidad más débil por la envuelta viral de los aislados primarios como causas principales de su ineficacia. Sin embargo, estudios han demostrado que la afinidad por el CD4 de las gp120 recombinantes monoméricas de ciertos aislados primarios no es significativamente diferente de la de gp120 procedentes de cepas de laboratorio. La naturaleza oligomérica de la proteína viral gp120 en la superficie del virus, la densidad y la estructura del CD4 en la superficie de las células permisivas y posiblemente la presencia de otras interacciones moleculares aún no esclarecidas claramente o de otras moléculas auxiliares de entrada podrían desempeñar un papel importante en el mecanismo de la entrada y representar otras causas de la ineficacia de las proteínas CD4 solubles como antagonistas de la entrada. El desarrollo de agentes antivirales que seleccionan como diana la proteína viral gp120 presenta un desafío importante, debido a la gran variabilidad genética de la proteína de la envuelta, factor que puede explicar la ineficacia de muchos de los inhibidores de la proteína viral gp120. No obstante, el hecho de que los residuos que contribuyen a formar el núcleo del sitio de unión de la proteína viral gp120 para el CD4 están formados por residuos muy conservados sugiere que los inhibidores de la proteína viral gp120 pueden ser eficaces contra un gran espectro de aislados de VIH-1.

Se han propuesto construcciones peptídicas derivadas del CD4 como inhibidores de la infección viral: se trata de un péptido mimético estructural del bucle CDR2 del CD4 que incorpora un grupo fenilo que imita a la Phe43 [14] y un péptido cíclico que corresponde al bucle CDR3 del CD4 y que incorpora residuos aromáticos adicionales [15]. Sin embargo, estas construcciones presentan una actividad antiviral débil limitada a un aislado de laboratorio y, aunque se concibieron en principio como miméticos estructurales del CD4, no son activas en la etapa de entrada [16].

Actualmente, se ha propuesto un cierto número de inhibidores de la interacción gp120-CD4 y presentan una aplicación clínica. Se trata por ejemplo de una proteína recombinante de gran tamaño, formada por la fusión genética de los dominios DID2 del CD4 con los dominios constantes de una inmunoglobulina IgG2 [17]. Esta construcción PRO542 está en fase clínica I/II. Esta gran proteína recombinante parece tolerarse bien por el organismo humano, pero su eficacia depende de una dosis circulante elevada difícil de lograr. Se han propuesto moléculas de menor tamaño como inhibidores de la interacción CD4-gp120 y están en fase de ensayo clínico. Se trata: de un colorante bis-azo FP21399 [18], identificado por un enfoque combinatorio, del fosfortioato oligonucleótido zintevir (AR177) [19], de un polímero a base de naftalenosulfonato, PRO2000 [20] y de un derivado de almidón, el dextrina-2-sulfato (D2S) [21], que inhiben aislados químicos de VIH-1 en cultivos celulares, pero exigen concentraciones elevadas. Entre los inhibidores de la entrada, también está el SPC3 [22], una construcción peptídica sintética con múltiple ramificaciones, que, propuesta inicialmente como inhibidor de la interacción CD4-gp120, se ha revelado posteriormente activa en una etapa que sigue a la unión de los viriones a las células. Se han propuesto otras moléculas de pequeño tamaño como inhibidores de la entrada: el biciclamo AMD3100 [23], el NSC651016 [24], el péptido T22 [25] y su versión más reciente T134 o T140 [26] y el TAK779 [27]. Estas moléculas son inhibidores de la entrada viral, activas sobre los co-receptores de la entrada CXCR4 y CCR5, pero no tienen ninguna actividad en la interacción CD4-gp120. Péptidos derivados de la secuencia de la región C-terminal de la glicoproteína gp41, el péptido T20 (o DP178) [28] y su versión más reciente mejorada DT1249 [29], son otros inhibidores de la infección que seleccionan como diana una fase transitoria de la entrada, posterior a la unión de la envuelta viral al CD4 y previa a la fusión de las membranas virus-célula: esos péptidos son inactivos en la interacción gp120-CD4. La mayor parte de estos productos están actualmente en ensayo clínico de fase I/II, pero aún falta verificar su eficacia terapéutica.

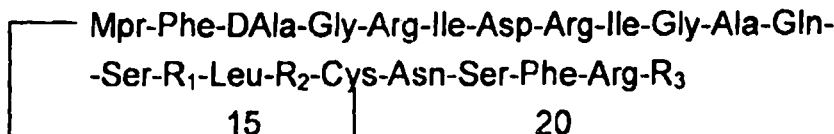
El régimen terapéutico anti-SIDA actualmente utilizado en la clínica, la triterapia, comprende una combinación de tres inhibidores que seleccionan como diana dos enzimas virales, la transcriptasa inversa y la proteasa. Aunque la triterapia ha conseguido reducir significativamente la carga viral de muchos enfermos, no puede ni siquiera en los casos más favorables erradicar la enfermedad, ya que siempre persisten reservas latentes de infección [30]. El éxito parcial de la triterapia por una parte y la imposibilidad de detener la infección por el SIDA con los protocolos terapéuticos actuales, por otra parte, ha aumentado la demanda de nuevos medicamentos que puedan ser activos al nivel de otras dianas virales y aumentar el repertorio y la eficacia de los medicamentos clínicos actuales.

Los experimentos en el laboratorio de J. H. Nunberg, Montana Biotechnology Center, The University of Montana, Missoula, EE.UU., han demostrado que la formación de puentes químicos de formas proteicas presentes en la etapa previa a la fusión virus-célula representa nuevos inmunógenos que pueden inducir la formación de anticuerpos que neutralizan el virus [31]. El complejo de pre-fusión de la envuelta viral con los receptores de la entrada representa por tanto una estructura de gran interés actualmente, dado que esta estructura podría representar el componente más importante de una formación proteica en la preparación de una vacuna contra el SIDA. Experimentos en el laboratorio de A. DeVico, Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, EE.UU., han demostrado que el complejo gp120-CD4, estabilizado por una formación de puentes químicos o como proteína de fusión recombinante, representa una forma macromolecular que expone sitios antigénicos crípticos de la proteína viral gp120 y que puede inducir anticuerpos neutralizantes [32], [33]. La obtención de este complejo antigénico mediante formación de puentes químicos no es satisfactoria ya que no es homogénea y resulta difícil de reproducir. Su obtención como proteína recombinante no conduce a una forma estructuralmente estable y eficaz. Pero, sobre todo, la presencia del CD4 en estas preparaciones podría presentar el peligro de inducir una respuesta autoinmunitaria en un organismo que ya está inmunológicamente deprimido.

Por otro lado, la producción de la envuelta viral en su forma recombinante monomérica (gp120) o en la forma más nativa trimérica (gp140 o análogos) presenta un interés muy importante en la investigación y en la producción a gran escala de formas recombinantes, potencialmente utilizables para la vacunación. La purificación de estas formas recombinantes no es sencilla e implica el uso de soportes cromatográficos funcionalizados con ligandos, sobre todo lectinas, que no son muy específicos para la proteína de la envuelta. El uso de un soporte cromatográfico que contiene el CD4 recombinante fijado de manera covalente, introduciría una etapa más específica y eficaz para la purificación de la proteína viral gp120, pero el coste de un soporte de este tipo sería muy elevado y esta proteína no sería suficientemente estable en todas las condiciones de uso.

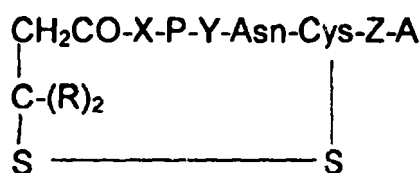
El documento de MARTIN *et al*, "Engineering Novel Bioactive Mini-Proteins on Natural Scaffolds" TETRAHE-DRON, vol. 56, 24 de noviembre de 2000, páginas 9451-9460, describe péptidos CD4 pero éstos no comprenden un ácido tiopropiónico (TPA) en el extremo C-terminal conforme a los péptidos de la presente invención. Presentan concentraciones de inhibición (CI50%) muy superiores a las de la presente invención.

El documento US-A-4 721 704 (CHANG JAW-KANG) describe péptidos auriculares que tienen una actividad natriurética, diurética y antihipertensiva. Esos péptidos tienen 21 ó 22 aminoácidos y tienen la secuencia:



en la que Mpr es un derivado del ácido β -mercaptopropanoico que sustituye a una Cys (siendo R₁ y R₂ Gly o DAla, y siendo R₃ OH, NH₂, Tyr-OH o Tyr-NH₂). Además del hecho de que los péptidos descritos no tienen relación con los de la presente invención, este documento no describe ninguna actividad biológica asociada al ácido β -mercaptopropanoico.

El documento US-A-4 684 622 (HUFFMAN WILLIAM F *et al*) describe péptidos que son derivados de la vasopresina y tienen una secuencia:



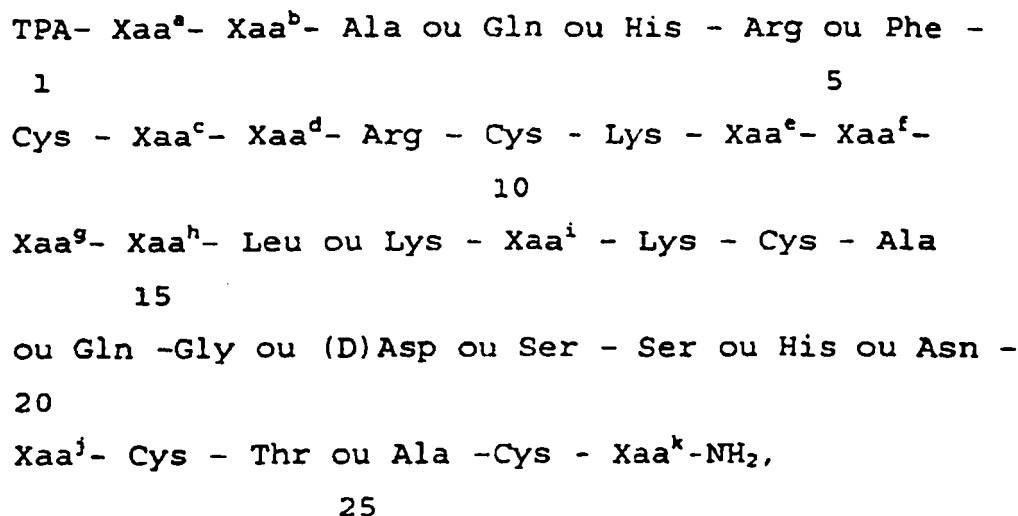
Un ácido mercaptopropiónico puede estar presente en la posición 1. Además del hecho de que los péptidos descritos en este documento no tienen relación con los de la presente invención, no se asocia ninguna actividad biológica al ácido mercaptopropiónico.

Los documentos H. OZAKI *et al*: “Molecular Structure of the Toxic Domain of Heat-Stable Enterotoxin Produced by a Pathogenic Strain of *Escherichia coli*”, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 266, 25 de marzo de 1991, páginas 5934-5941 y EP 0 989 136 no describen péptidos CD4. Describen, respectivamente, una enterotoxina producida por *E. Coli*, y un péptido cíclico que tiene un efecto sobre la restauración de mutantes de la proteína P53. Nada en estos documentos hace pensar que un TPA en la posición 1 pueda modificar la actividad biológica de los péptidos que se describen en los mismos.

Exposición de la invención

La presente invención proporciona una familia de péptidos que imitan el CD4 y reducen los inconvenientes citados anteriormente de la técnica anterior. En efecto, proporciona un péptido estable, que presenta una afinidad muy fuerte por la envuelta del virus del SIDA, en particular por la proteína gp120.

El péptido de la presente invención se caracteriza porque comprende la secuencia (I) siguiente:



en la que TPA representa el ácido tiopropiónico, Xaa^a, Xaa^b, Xaa^c, Xaa^d, Xaa^e, Xaa^f, Xaa^g, Xaa^h, y Xaaⁱ, son aminoácidos, naturales o no naturales, idénticos o diferentes, Xaa^j representa Nal, Phe o Bip, y Xaa^k representa Gly, Val o Ile.

ES 2 291 439 T3

El residuo (D)Asp representa el isómero óptico D del ácido aspártico, Nal representa la β -naftilalanina, y Bip representa la bi-fenilalanina.

Los inventores han demostrado que el péptido de la presente invención definido por la secuencia (I), que comprende un ácido tiopropiónico en la posición 1 de la secuencia, un residuo Phe, Nal, o Bip en la posición 23 de la secuencia (Xaaⁱ), y un residuo Gly, Val o Ile en la posición 27 de la secuencia (Xaa^k), presenta una fuerte afinidad y una gran especificidad de unión por la proteína gp120 de la envuelta viral del virus de la inmunodeficiencia.

Este péptido comprende únicamente 27 ó 28 residuos, y presenta una estructura en horquilla constituida por dos cadenas β antiparalelas unidas por un codo β de cuatro residuos. Las dos cadenas antiparalelas, estando a una distancia que puede provocar interacciones en puentes de hidrógeno intramoleculares, estabilizan la estructura. Especialmente, la distancia entre los átomos de nitrógeno amídico y oxígeno carbonílico del enlace peptídico es de 2,5 a 3,6 Å. Esta estructura bien definida y estable reproduce elementos estructurales del CD4 críticos para su unión a la glicoproteína gp120.

La estructura tridimensional del péptido de la presente invención se ha resuelto experimentalmente mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Este análisis demuestra que la organización tridimensional de este péptido reproduce el esqueleto peptídico de la estructura en horquilla del CD4, y la región 37-46 de este péptido puede superponerse a la región 36-37 del CD4 con una desviación cuadrática media de tan sólo 1,05 Å. Además, las cadenas laterales de los residuos Ala o Gln 20, Ser 22, Xaaⁱ 23 (Nal, Phe o Bip), y Thr o Ala 25 tienen una orientación comparable a la de los residuos correspondientes del CD4, es decir Gln 40, Ser 42, Phe 43, y Thr 45. En particular, la cadena lateral de Xaaⁱ 23 sobresale del motivo en horquilla en una conformación similar a la de la Phe 43 del CD4 para insertarse en la entrada de una cavidad hidrófoba de la proteína viral gp120, reforzando así la unión con gp120. Arg y Lys en las posiciones 9 y 18 son topológicamente equivalentes a los residuos Arg59 y Lys35 de la proteína CD4.

El TPA y las 5 cys del péptido forman puentes disulfuro que presentan un apareamiento de tipo 1-3, 2-4 y 3-6 y estabilizan la estructura en horquilla.

El motivo estructural en horquilla tiene una superficie accesible para el disolvente y/o para una molécula de mayor tamaño que una proteína, lo que puede favorecer su interacción con la proteína de la envuelta viral.

Las cadenas laterales de los aminoácidos de la superficie accesible para el disolvente de este motivo están próximas en el espacio y forman una superficie molecular continua que reproduce la estructura de varios residuos importantes para la unión CD4-gp120.

La plataforma estructural que contiene el motivo estructural en horquilla también contiene otras regiones estructurales que pueden alojar funcionalidades químicas adicionales en una posición espacial bien definida con respecto al motivo estructural en horquilla pudiendo así reforzar su función biológica de unión y/o presentar grupos de marcaje. Por ejemplo, se ha incorporado un grupo biotina o un grupo fluoresceína al nivel de la cadena lateral de la lisina 11, sin provocar pérdida de la actividad biológica del derivado. La incorporación de estos grupos ha permitido el uso de estos derivados en pruebas de interacción con la proteína de la envuelta, tal como se describe a continuación.

Según la invención, la secuencia (I) puede comprender además un residuo prolina unido al residuo Xaa^k. Un residuo prolina añadido en la posición 28 estabiliza el extremo C-terminal y hace que la cadena β C-terminal del motivo estructural en horquilla sea menos flexible.

Según la invención, en la secuencia (I), Xaaⁱ puede ser Gly.

Por ejemplo, el péptido de la presente invención puede comprender una secuencia seleccionada de entre las secuencias ID n° 4, ID n° 5, ID n° 6, ID n° 7, ID n° 8, ID n° 9, ID n° 10, ID n° 11, ID n° 12, ID n° 13, ID n° 14, ID n° 15 y ID n° 16 de la lista de secuencia adjunta.

El péptido de la presente invención puede obtenerse mediante síntesis química en fase sólida o mediante recombinación genética. Además, la presente invención se refiere igualmente a un procedimiento de fabricación del péptido según la invención tal como se definió anteriormente, comprendiendo dicho procedimiento una síntesis química en fase sólida de dicho péptido. La síntesis química puede realizarse por ejemplo con un sintetizador automático de péptidos del tipo Applied Biosystems, mod. 433A. Puede realizarse por ejemplo en química de Fmoc que utiliza el grupo fluorenilmetiloxycarbonilo para la protección temporal de la función α -amínica de los aminoácidos.

El péptido de la invención también puede prepararse por medio de un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

a) integración de una secuencia de ácido nucleico en un vector de expresión, codificando dicha secuencia de ácido nucleico para el péptido de la presente invención,

b) introducción del vector de expresión que comprende dicha secuencia de ácido nucleico en una célula huésped,

c) cultivo de la célula huésped que comprende dicho ácido nucleico en condiciones de cultivo que permiten la síntesis de dicho péptido,

d) recuperación del péptido sintetizado, y

e) injerto del TPA en la posición N-terminal.

Los elementos técnicos para la realización de este procedimiento de síntesis peptídica se conocen por el experto en la técnica. Se describen por ejemplo en la obra de Sombrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª edición. El injerto de un TPA en la posición N-terminal del péptido puede realizarse por medio de un procedimiento clásico de química orgánica aplicable a un péptido.

Los inventores han sintetizado una familia de péptidos que reproducen una parte de la estructura de la región del CD4 que se parece a la región CDR2 de las inmunoglobulinas, que, tal como han demostrado los resultados de mutagénesis y de análisis cristalográfico, están entre las regiones críticas de la unión de CD4 a la proteína viral gp120. Los péptidos de la presente invención pueden fijarse sobre la región de la glicoproteína gp120 que interacciona con el CD4, el receptor principal de la entrada del VIH-1 en las células diana CD4.

Constituyen una familia de inhibidores cuya afinidad por la glicoproteína viral gp120 recombinante monomérica varía entre valores de CI_{50} que van de 0,1 nM a 400 nM. Representan inhibidores específicos y potentes de la interacción CD4-gp120 basados en la estructura del CD4. La unión con la proteína viral gp120 recombinante se realiza en competición con el CD4 soluble y es específica de la forma bien estructurada.

Gracias al mimetismo estructural y funcional del CD4, esos péptidos pueden utilizarse en los diferentes dominios descritos a continuación.

Los péptidos de la presente invención pueden fijar la envuelta del VIH-1 en su forma recombinante tal como demuestran las pruebas ELISA. Esos péptidos, tras marcaje con una sonda fluorescente o radioactiva apropiada, permiten detectar la presencia de la envuelta del VIH-1 en disolución o en la superficie de una célula, y por tanto revelar la presencia de una célula infectada y por tanto de la infección por VIH-1.

Los péptidos de la presente invención inhiben la interacción entre las proteínas recombinantes CD4-gp120 *in vitro* y, mediante esto, pueden detener igualmente la entrada del virus VIH-1_{LAI} (aislado primario) y VIH-1_{LEN} (aislado clínico) en los linfocitos circulantes. Los péptidos más potentes de la presente invención pueden, en efecto, inhibir la infección de los linfocitos con una DE_{50} de entre 100 y 900 nM. Por tanto, estas moléculas representan agentes antivirales que encuentran una aplicación clínica. Debido a su naturaleza peptídica pueden utilizarse mediante inyección o perfusión o en aplicaciones locales externas.

La capacidad de los péptidos de la presente invención de inhibir la unión de la proteína viral gp120 al CD4 es una demostración de la capacidad de esos péptidos de inhibir la infección viral, ya que impiden una de las primeras etapas de la entrada viral. Por tanto, estos inhibidores de la entrada son componentes con acción antiviral. Por tanto, los péptidos de la presente invención representan moléculas que pueden utilizarse en una terapia anti-VIH.

Los péptidos de la presente invención pueden inducir variaciones de la conformación de la proteína viral gp120 recombinante y de la envuelta que permiten detectarse por anticuerpos monoclonales específicos denominados CD4i, tales como CG10, 17b y 48D. Por tanto, estas variaciones de la conformación son aparentemente similares a las que se inducen mediante la unión del CD4. La unión de los péptidos de la invención a la proteína viral gp120 recombinante y a la envuelta viral desenmascara por tanto epítomos de la envuelta, que normalmente no son accesibles sin el CD4. Estos epítomos representan nuevos sitios antigénicos, potencialmente muy importantes para desarrollar anticuerpos que neutralicen el VIH-1. Por tanto, los péptidos de la presente invención también pueden utilizarse en una aplicación de vacuna, especialmente en una formulación que comprende su complejo con una proteína de la envuelta viral.

Ciertos péptidos de la presente invención presentan una afinidad más débil por la proteína viral gp120 recombinante que otros. Estos tienen igualmente un uso práctico muy importante en la purificación de formas funcionales de la envuelta viral. En efecto, la fijación de la proteína viral sobre esos péptidos puede revertirse más fácilmente. Para demostrarlo, los inventores fijaron de manera covalente uno de estos péptidos a un soporte polimérico hidrófilo (Sepharose 4B) utilizado en cromatografía de líquidos, utilizando un brazo flexible fijado en el lado opuesto a la superficie activa de la molécula. Esta molécula, fijada de esta manera, todavía puede interaccionar con la proteína viral gp120 recombinante y puede retener esta proteína viral sobre la matriz polimérica. A continuación, puede separarse mediante una acidificación del medio. Por tanto, un soporte funcionalizado de esta manera permite purificar la proteína viral gp120 recombinante, y eventualmente otras formas de la envuelta viral e incluso el virus entero, en preparaciones a gran escala.

Además, los péptidos de la presente invención pueden marcarse por ejemplo con fluoresceína y biotina o radio-marcarse, sin que la afinidad de unión a la proteína de la envuelta viral gp120 se vea alterada. Estos péptidos marcados pueden utilizarse como indicadores, en experimentos de competición de su unión a gp120 por ejemplo para realizar una selección molecular. Los métodos utilizables son los que son accesibles para el experto en la técnica en la bibliografía que se refiere al estudio de las interacciones moleculares (véase por ejemplo [37, 38, 39 y 40]). En un procedimiento

de selección, todas las moléculas que puedan inhibir la interacción entre un péptido de la presente invención y una proteína viral gp120 pueden representar un inhibidor de la interacción CD4-gp120, y por tanto un inhibidor de la infección viral. Por tanto, es posible, gracias a los péptidos de la presente invención, seleccionar cualquier molécula que pueda interaccionar con la proteína gp120 o una proteína análoga a gp120, en particular moléculas con actividad antiviral o moléculas útiles para la fabricación de un medicamento.

Por tanto, la presente invención se refiere igualmente al uso del péptido según la invención, tal como se definió anteriormente, para preparar un medicamento.

Se refiere igualmente al uso del péptido según la invención, tal como se definió anteriormente, para preparar un agente antiviral.

Se refiere igualmente al uso del péptido según la invención, tal como se definió anteriormente, para preparar un medicamento destinado al tratamiento del SIDA.

Se refiere igualmente a una vacuna que comprende un complejo de un péptido según la invención y una proteína de envuelta de un virus. El virus puede ser un virus del SIDA tal como los citados anteriormente.

La presente invención se refiere igualmente al uso del péptido según la invención, tal como se definió anteriormente, para fabricar un producto de diagnóstico, por ejemplo del SIDA.

Se refiere igualmente al uso del péptido según la invención, tal como se definió anteriormente, para la detección de moléculas de la envuelta viral del VIH.

Se refiere igualmente al uso del péptido según la invención, tal como se definió anteriormente, para la selección de moléculas inhibidoras de la interacción de la gp120 o de sus análogos con la molécula CD4, para la selección de moléculas con actividad antiviral y para la selección de moléculas útiles para la fabricación de un medicamento.

Se refiere igualmente al uso del péptido según la invención, tal como se definió anteriormente, como ligando inmovilizado para funcionalizar una matriz de cromatografía.

Aparecerán otras ventajas más con la lectura de los ejemplos siguientes en referencia a la lista de secuencias y a las figuras adjuntas.

35 Breve descripción de la lista de las secuencias

La lista de las secuencias adjunta proporciona las siguientes secuencias peptídicas:

- Secuencia ID nº 1: secuencia sCD4.

- Secuencia ID nº 2: secuencia de la escilatoxina (ScTx).

- Secuencia ID nº 3: secuencia CD4M9: péptido procedente de la escilatoxina, que no presenta TPA en la posición 1 de la secuencia.

- Secuencias ID nº 4-16: secuencias denominadas CD4M9T, CD4M26, CD4M27, CD4M27A, CD4M27B, CD4M27C, CD4M30, CD4M31, CD4M32, CD4M33, CD4M35, K15 y K16 respectivamente de la presente invención.

- Secuencia ID nº 17: secuencia denominada CD4M3 procedente de la escilatoxina que no presenta TPA en la posición 1 de la secuencia.

- Secuencia ID nº 18: secuencia denominada CD4MO procedente de la caribdotoxina.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: curvas de inhibición de la unión del CD4 a la proteína viral gp120, por péptidos de la presente invención, obtenidas mediante ELISA en competición. Los péptidos sometidos a prueba son: CD4M9, CD4M9T, CD4M27, CD4M32, CD4M33 y CD4M35. Los datos experimentales se indican en porcentaje de unión (%F) en función de la concentración de los péptidos.

- Figura 2: curva de inhibición de la unión del CD4 a la proteína viral gp120, por el péptido marcado CD4M33-fluoresceína, CD4M33-F, obtenida mediante ELISA en competición. Las curvas de los péptidos CD4M9 (secuencia ID nº 3), CD4M33 (secuencia ID nº 13) y CD4M35 (secuencia ID nº 14) también se representan para su comparación. Los datos experimentales se indican en porcentaje de unión (%F) en función de la concentración de los péptidos.

- Figura 3: curvas de interacción de la proteína viral recombinante gp120-HXB2 con el péptido CD4M33 (secuencia ID nº 13) fijado a la superficie de una placa de un instrumento de resonancia de plasmón superficial. Las curvas de asociación (0-300 s) y de disociación (300-800 s) se registraron tras la inyección de la proteína viral gp120 a las

concentraciones de 13,2 (1), 19,8 (2), 29,6 (3), 44,4 (4), 66,6(5) y 100(6) nM. Los datos se indican en unidades de resonancia (UR) en función del tiempo (t) en segundos.

- Figura 4(a) y (b): curva de interacción del VIH-1, inactivado mediante AT-2 [34], con el anticuerpo 48d [11] (a) y CG10 [35], (b), fijados a la superficie de una placa de un instrumento de resonancia de plasmón superficial en presencia del péptido CD4M33 (10 $\mu\text{g/ml}$), de un péptido inactivo (Ala23) CD4M9 (Phe23 sustituida por Ala en la secuencia peptídica de CD4M9) (10 $\mu\text{g/ml}$) y en ausencia de péptido. Las curvas de asociación (0-180 s) y de disociación (180-600 s) se registraron tras la inyección del VIH-1, que se incubó previamente con los péptidos a 20°C durante 1 h. Los datos se indican en unidad de resonancia (UR) en función del tiempo (t) en segundos.

- Figuras 5(A)-(C): efectos de los péptidos CD4M30 (secuencia ID nº 10) (figura 4A), CD4M33 (secuencia ID nº 13) (figura 4B), CD4M35 (secuencia ID nº 14) (figura 4C) sobre la replicación de la cepa VIH-1_{LAI} en las CMSP activadas mediante PHA-P. Los datos se representan en porcentaje de inhibición (%I) de la actividad transcriptasa inversa (TI) en los sobrenadantes de cultivo en función de la concentración en nM de los péptidos.

- Figuras 6(A) y (B): efecto de la presencia del CD4 soluble y de los péptidos de la presente invención sobre la interacción de la proteína viral recombinante gp120_{HXB2} con los anticuerpos CG10 (A) y 48d (B), fijados a la superficie de una placa de un instrumento de resonancia de plasmón superficial. Las curvas de asociación (0-180 s) y de disociación (180-400, 180-450 s) se indican para la proteína viral gp120 sola y la proteína viral gp120 en presencia del CD4M27 (1,5 equivalente, secuencia ID nº 6), del CD4M9 (1,5 equivalente), del mutante inactivo (Ala23) CD4M9 (1,5 equivalente) y del CD4 soluble (1,5 equivalente). Los datos se indican en unidad de resonancia (UR) en función del tiempo (t) en segundos.

- Figura 7: ejemplos de secuencias peptídicas de la presente invención representadas con los códigos de una letra de los residuos de aminoácidos. TPA y B representan el ácido tio-propiónico y la bi-fenilalanina, respectivamente, y "d" la forma óptica D del ácido aspártico.

- Figura 8: perfil cromatográfico de la purificación de la proteína recombinante gp120_{HXB2} sobre una columna (1,2 x 4 cm) de Sepharose 4B funcionalizada con el péptido de la presente invención CD4M9 (secuencia ID nº 3). Los datos se indican en absorbancia a 280 nm en función del tiempo (min.), tras la adición de ácido acético 0,5 M.

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de los péptidos de la presente invención

Los péptidos de la presente invención se prepararon en este ejemplo mediante síntesis química en fase sólida con un sintetizador automático de péptidos Applied Biosystems, mod. 433A, y en química de Fmoc, que utiliza el grupo fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) para la protección temporal de la función α -amínica de los aminoácidos. Los grupos protectores utilizados para evitar las reacciones secundarias de las cadenas laterales de los aminoácidos, en esta estrategia de Fmoc, fueron tercio-butil éter (tBu) para los residuos Ser, Thr y Tyr; éster tercio-butilico (OtBu) para Asp, Glu; tritilo (Trt) para Gln, Asn, Cys, His; tercio-butiloxycarbonilo (Boc) para Lys y 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo (Pmc) para Arg.

La reacción de acoplamiento se desarrolla con un exceso de 10 equivalentes de aminoácidos (1 mmol) con respecto a la resina (0,1 mmol). Se disuelve el aminoácido protegido en 1 ml de N-metilpirolidona (NMP) y 1 ml de una disolución de 1-N-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) 1 M en el disolvente NMP. Entonces se añade 1 ml de una disolución de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) 1 M. Después de de 40 a 50 minutos de activación, se transfiere el éster activo formado al reactor que contiene la resina. Antes de esta etapa de transferencia y después del acoplamiento, se desprotege la resina de su grupo Fmoc mediante una disolución del 20% de piperidina en NMP. Se retira el exceso de piperidina mediante lavado con NMP tras aproximadamente de 5 a 10 minutos.

Durante la desprotección, la detección de los aductos de dibenzofulveno-piperidina a 305 nm permite seguir el buen desarrollo de la síntesis. En efecto, la cuantificación del aducto permite estimar la eficacia de la desprotección del grupo Fmoc y en consecuencia del acoplamiento del último aminoácido incorporado.

Modificaciones químicas aportadas a los péptidos de la presente invención

Se acoplaron una sonda fluorescente así como un grupo biotina en dos de los péptidos de la presente invención estudiados, el CD4M9T (secuencia ID nº 4) y el CD4M33 (secuencia ID nº 13). La incorporación en estos dos compuestos se realiza en el residuo de lisina 11, al nivel de una cara opuesta al sitio de unión de la proteína viral gp120. Esta elección de una lisina estuvo condicionada por sus posibilidades de protección de su cadena lateral con un grupo protector, denominado ortogonal, tal como el grupo (1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciclohexiliden)etilo). En efecto, un grupo de este tipo es estable al tratamiento con un 20% de piperidina utilizado para la desprotección del grupo Fmoc, pero se escinde de manera específica mediante tratamiento con una disolución de hidrazina al 2%. Una vez retirado el grupo Dde, pudieron acoplarse la fluoresceína así como la biotina.

Introducción de la fluoresceína. Se introdujo el grupo fluorescente en la cadena lateral de la lisina 11 del péptido de la presente invención CD4M33 y de la lisina 15 ó 16 de los péptidos K15 (secuencia ID nº 15) o K16 (secuencia ID nº 16), respectivamente, de la presente invención. Por tanto, se utilizó el grupo Dde para la protección de la cadena lateral de la lisina durante la síntesis del péptido, y a continuación se liberó mediante dos tratamientos de 5 min con un 2% de hidrazina en dimetilformamida (DMF). Se acopló la molécula de fluoresceína directamente en el péptido sintetizado o por medio de un brazo, que sirve para alejar la fluoresceína, molécula voluminosa, lo que podría entorpecer la actividad de unión. En este último caso, la molécula que permite introducir un brazo es el ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanóico. De esta forma se añaden a un equivalente de resina 17 equivalentes de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanóico, 60 equivalentes de diisopropiletilamina (DIEA), 17 equivalentes de hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU). Tras el acoplamiento durante 1 hora a temperatura ambiente, se desprotege el grupo Fmoc con piperidina al 20%. A continuación se realizó el acoplamiento de la sonda con ayuda del éster fluoresceína-(5)-(6)-carboxilato de N-hidroxisuccinimidilo. Para ello, a un equivalente de resina se le añaden 4 equivalentes de éster activado de fluoresceína en presencia de 14 equivalentes de diisopropiletilamina (DIEA). La reacción se desarrolla en el disolvente NMP durante una noche. Finalmente se realiza la desprotección final.

Introducción de la biotina. En primer lugar se añadió un brazo separador 8-amino-3,6-dioxaoctanóico en la lisina 11 previamente desprotegida del grupo Dde. La reacción es similar a la descrita en el párrafo anterior. A continuación se incorpora la biotina en forma de un éster biotinamidocaproato de N-hidrosuccinimidilo: de este modo a un equivalente de resina se le añaden 4 equivalentes de éster activado de biotina en presencia de 14 equivalentes de diisopropiletilamina (DIEA). La reacción continúa durante una noche a temperatura ambiente. A continuación se lava la resina antes de tratarse mediante la disolución de desprotección final.

Introducción de un grupo tiol. El péptido CD4M9 se sintetiza según el procedimiento descrito anteriormente, presentando la lisina en la posición 11 como grupo protector de la cadena lateral un grupo Dde. Tras la síntesis del péptido, se trata el péptido-resina 5 veces con una disolución de un 2% de hidrazina en DMF. Se realiza el acoplamiento de un brazo de unión durante una hora a temperatura ambiente en DMF con 10 equivalentes de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanóico utilizando el reactivo HBTU en presencia de diisopropiletilamina. A continuación se desprotege el grupo Fmoc con un 20% de piperidina en DMF. Entonces se trata el péptido-resina con 10 equivalentes de reactivo de Traut (clorhidrato de 2-iminotiolano (Sigma) en presencia de DIEA. Finalmente se libera el péptido y se desprotege tal como se describió anteriormente.

Desprotección final de la resina

La escisión de la resina y de los grupos protectores presentes en las cadenas laterales se realizaron simultáneamente mediante tratamiento del péptido unido a la resina mediante ácido trifluoroacético (TFA). Antes de realizar la escisión, se lavó la resina varias veces con diclorometano (DCM) y finalmente se secó. El reactivo utilizado durante la escisión es una mezcla ácida que contiene el 81,5% de TFA y los agentes de extinción fenol (5%), tioanisol (5%), agua (5%), etanoditiol (2,5%) y tri-isopropilsilano (1%). Se trató la resina con esta mezcla durante tres horas con agitación y a temperatura ambiente, con 100 ml de disolución por gramo de resina. Se recuperó el péptido libre en disolución mediante filtración. A continuación se precipitó el péptido y se lavó en frío en diisopropil éter y después se disolvió en ácido acético al 20% y se liofilizó.

Plegamiento de los péptidos de la presente invención mediante formación de puentes disulfuro

El péptido recuperado tras la liofilización, el producto bruto de síntesis, se encuentra en forma reducida, es decir que los puentes disulfuro entre las cadenas no están formados. La formación de estas uniones covalentes se realizó utilizando el par redox cistamina/cisteamina. Se llevó el producto bruto de síntesis en agua con TFA al 0,1% (v/v) y cloruro de guanidinio 6 M añadidos para facilitar su disolución, con 2,0 mg.ml⁻¹. A continuación se añadió gota a gota esta disolución, diluida a 0,2 mg/ml⁻¹, al tampón de reducción, compuesto por Tris/HCl 100 mM, pH 7,8 y cisteamina 5 mM. La cistamina (oxidante) 0,5 mM al final, se añadió tras 45 minutos de reacción a temperatura ambiente. Se lleva el medio a pH 3,0 tras 30 minutos.

La cisteamina permite reducir los grupos tioles presentes en el péptido. Al aire libre, se oxida y permite la oxidación de cisteínas y por tanto el plegamiento del péptido mediante formación de puentes disulfuro entre las cadenas. La cistamina añadida al final de la manipulación permite realizar el plegamiento. El buen desarrollo de la oxidación se verifica mediante cromatografía analítica comparando los tiempos de retención de los productos bruto y oxidado, superior para el primero.

La oxidación del péptido CD4M9, que presenta un grupo tiol en la posición 11, se diferencia un poco de la descrita en el párrafo anterior. Se desgasifica durante mucho tiempo mediante argón el medio de plegamiento de reacción, compuesto por un tampón de fosfato 20 mM, NaCl 200 mM, ajustado a pH 7,8, y a continuación se le añaden 5 mM de cisteamina, cistamina 5 mM. A continuación se añade el péptido que comprende siete funciones SH libres y se detiene la reacción de oxidación mediante adición de ácido tras tan sólo 10 minutos, tiempo suficiente para el plegamiento y la formación de los tres puentes disulfuro naturales y suficientemente corto para limitar la formación de producto secundario correspondiente a estados de oxidación superiores.

Purificación de los péptidos de la presente invención

Se purificaron los péptidos de la presente invención mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa sobre una columna preparativa Vydac C18 (1,0 x 25,0 cm). A continuación se utilizó un gradiente lineal del 0-60% de acetonitrilo en una disolución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1% durante 90 minutos. Se analizaron las fracciones del pico principal mediante HPLC analítica; se reunieron las fracciones que sólo presentaban un único pico y se liofilizaron. Se analizó el producto así obtenido mediante espectrometría de masas.

*Ejemplo 2**Pruebas de competición mediante ELISA indirecta*

Se midió la inhibición de la interacción rgp120-CD4 mediante ELISA (Ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas) indirecta. Se inmovilizaron 50 ng por pocillo de anticuerpo anti-gp120, D7324, sobre una placa de 96 pocillos (Maxisorb, Nunc) durante una noche a 4°C. Tras la pasivación mediante albúmina sérica bovina y tres lavados con el tampón de lavado (Tris 10 mM, pH 7,8, Tween 20 al 0,05%), se añadieron 15 ng de rgp120_{HXB2} por pocillo. A continuación se añadieron diferentes concentraciones de competidores, tras tres lavados, así como 0,4 ng de CD4 soluble por pocillo. Se realizaron controles al 100% que sólo contenían CD4 soluble. Tras una noche a 4°C y tres lavados, se añadieron 5 ng por pocillo de anticuerpo de ratón anti-CD4 L120.3, y después un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (GAMPO). Se realizó el revelado mediante adición de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, sustrato fluorescente de la peroxidasa. Se detuvo la reacción tras 30 minutos mediante adición de ácido sulfúrico 2 M. Se calculó la inhibición de la interacción rgp120-CD4 mediante lectura de la absorbancia A a 450 nm. Controles sin competidor permitieron determinar la absorbancia A_{100%} (absorbancia en ausencia de competidor). Se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración de péptido de la presente invención mediante la fórmula:

$$\text{porcentaje de inhibición} = 100 \times (A_{100\%} - A) / A_{100\%}$$

Las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados se expresan como la media de repeticiones experimentales.

Se sometieron a prueba las actividades biológicas del péptido CD4MO (secuencia ID nº 18) procedente de la caribdoxina y del péptido CD4M3 (secuencia ID nº 17), procedente de la escilatoxina (secuencia ID nº 2) en una prueba ELISA indirecta. Estos péptidos presentan una capacidad para inhibir la interacción rgp120_{LAI}-CD4 soluble, con una concentración de inhibición al 50% (o CI₅₀) de 4,0 x 10⁻⁵ M y de 2,0 x 10⁻⁵ M, respectivamente (tabla I) [4]. Estos valores son 10000 veces superiores a la CI₅₀ presentada por el CD4 soluble (CI₅₀ = 4,0 x 10⁻⁹ M) [4].

La figura 1 adjunta agrupa los resultados obtenidos en este ejemplo con los péptidos de la presente invención.

Se trata de representaciones del porcentaje de fijación (%F) de la proteína viral gp120_{HXB2}-CD4 en función de la concentración molar (C(M)) de competidor, es decir, de péptido de la presente invención. Esta figura muestra la inhibición de la interacción CD4-gp120_{HXB2}.

Se sometió a prueba el CD4M9 (secuencia ID nº 3) en ELISA por competición. Presenta la capacidad de inhibir la interacción rgp120_{LAI}-CD4 soluble con una concentración de inhibición al 50% (o CI₅₀) de 4 x 10⁻⁷ M (tabla I), es decir, un aumento de la capacidad de inhibición por un factor de 50 con respecto al péptido de la presente invención CD4M3 (secuencia ID nº 17). El péptido de la presente invención CD4M9, en prueba de ELISA por competición, puede igualmente inhibir la interacción del CD4 con otras proteínas gp120 recombinantes, procedentes de virus T y M-trópicos: VIH-1_{IIB}, VIH-1_{MN}, VIH-1_{Ba-L}, VIH-1_{JR-FL}, VIH-1_{W61D}, con una concentración de inhibición al 50% (CI₅₀) entre 0,1 y 1,0 x 10⁻⁶ M [4].

Este péptido inhibe la interacción gp120_{HXB2}-CD4 soluble a una CI₅₀ de 9 x 10⁻⁸ M (figura 1, tabla I).

Un mutante CD4MV, que comprende la sustitución de la secuencia C-terminal Gly-Pro del CD4M9 por Val, presenta una CI₅₀ de 3,0 x 10⁻⁷ M en la inhibición de la interacción gp120_{LAI}-CD4 (tabla 1), lo que representa un ligero aumento de la capacidad inhibidora. El mutante CD4M9Bip comprende la sustitución Phe23Bip con respecto al CD4M9; este péptido presenta una CI₅₀ de 1,0 x 10⁻⁷ M en la inhibición de la interacción gp120_{LAI}-CD4 (tabla 1), lo que representa un aumento complementario de la capacidad inhibidora. El mutante CD4M9T (secuencia ID nº 4), que comprende un ácido tio-propiónico en sustitución del aminoácido Cys N-terminal, presenta una CI₅₀ de 3,0 x 10⁻⁸ M en la inhibición de la interacción gp120_{LAI}-CD4 (figura 1; la CI₅₀ en la interacción gp120_{HXB2} es de 1,1 x 10⁻⁸ M, tabla 1), lo que representa un aumento de la capacidad de inhibición por un factor cercano a 10 con respecto a CD4M9.

Todos los mutantes siguientes presentan un residuo tio-propiónico (TPA) y valina (Val o Ile) en posición N- y C-terminal, respectivamente, y todos se han sometido a prueba con la gp120, procedente de los virus T trópicos VIH-1_{HXB2} y VIH-1_{LAI}.

El péptido de la presente invención CD4M27 (secuencia ID nº 6) comprende las mutaciones Arg5Phe (para eliminar una arginina no esencial y proteger el puente disulfuro 6-24), Gly27Val y la delección del residuo C-terminal prolina (para estabilizar mejor la estructura β). Presenta un aumento de la capacidad de inhibición de la unión CD4-

gp120_{HXB2}, CI_{50} de $7 \cdot 10^{-9}$ M, (figura 1, tabla I). Los péptidos CD4M27 A, B y C se obtienen respectivamente mediante una mutación Gly21Ser(a), Ser22His(b) y Ser22Asn(c) a partir del péptido CD4M27. Presentan una capacidad de inhibición comparable a la del péptido CD4M27.

5 El péptido de la presente invención CD4M32 (secuencia ID n° 12), comparado con CD4M9T, comprende la delección del residuo prolina C-terminal, la mutación Gly27Val y la mutación de la Phe23 por bifenilalanina (Bip): la mutación Phe23Bip añade una extensión hidrófoba a la cadena lateral de la Phe23, para aumentar la interacción con la cavidad hidrófoba de la proteína viral gp120. CD4M32 presenta un aumento de la inhibición de la unión CD4-gp120_{HXB2} (CI_{50} de $8 \cdot 10^{-10}$ M, figura 1). El mutante CD4M30 (secuencia ID n° 10), con respecto al CD4M32, comprende la mutación Arg5Phe (ya introducida en el CD4M27) y Ala4Gln para aumentar la solubilidad de la molécula. Este péptido de la presente invención presenta una CI_{50} de 3,0 nM, en las pruebas de inhibición de la interacción CD4 - gp120_{LAI}. El mutante CD4M33 (secuencia ID n° 13) agrupa las mutaciones presentes en los dos péptidos anteriores, especialmente Cys1TPA, Arg5Phe, Phe23Bip, Gly27Val, la delección de un residuo en posición C-terminal y además la mutación Ala4His (para aumentar la solubilidad de la molécula). Estas mutaciones tienen un efecto aditivo y permiten al péptido de la presente invención CD4M33 inhibir la interacción CD4 - gp120_{HXB2} y CD4-gp120_{LAI} con una CI_{50} de $1,2 \cdot 10^{-10}$ M y de $2,5 \cdot 10^{-10}$ M (figura 1 y tabla 1), es decir un aumento de la capacidad de inhibición de la unión CD4 - gp120 por un factor de 1000 con respecto al CD4M9. Se sintetizó un péptido complementario, CD4M35 (secuencia ID n° 14), con, con respecto al péptido CD4M33 de la presente invención, las mutaciones Val27Ile y Gly21(D)Asp. Estas mutaciones permiten al péptido de la presente invención inhibir la interacción CD4-gp120_{HXB2} con una CI_{50} de $7,0 \cdot 10^{-11}$ M (figura 1, tabla 1).

Se sintetizaron otros dos péptidos K15 (secuencia ID n° 15) y K16 (secuencia ID n° 16): comprenden las sustituciones Gln7Val, Leu8Gln, Lys11His, con respecto al péptido CD4M33 de la presente invención, y un residuo Lys en las posición 15 ó 16, respectivamente. A continuación se fijó un grupo fluorescente de fluoresceína, de una manera covalente, a nivel de la cadena lateral de este residuo de lisina, según el protocolo descrito en el ejemplo 1. Los péptidos fluorescentes K15 y K16 presentan una CI_{50} de $5,0 \cdot 10^{-8}$ M y $6,0 \cdot 10^{-9}$ M en la inhibición de la interacción gp120_{LAI}-CD4, cuya afinidad por la proteína viral gp120 no resulta modificada por el marcaje.

En conclusión, la presente invención proporciona una familia de péptidos que representan inhibidores potentes de la interacción CD4-gp120.

TABLA 1

Concentración de inhibición al 50% (CI_{50}) de los péptidos miméticos del CD4 en la interacción del CD4 recombinante soluble para la proteína de la envuelta viral gp120 _{LAI} y gp120 _{HXB2} . La desviación estándar para cada valor es inferior al 30%			
Nombre	Secuencia ID n°	CI_{50} (gp120 _{LAI})	CI_{50} (gp120 _{HXB2})
CD4M0	18	40 μ M	-
CD4M3	17	20 μ M	-
CD4M9	3	400 nM	90 nM
CD4M9V	-	300 nM	-
CD4M9T	4	30 nM	11 nM
CD4M9Bip	-	100 nM	-
CD4M27	6	10 nM	7 nM
CD4M30	10	3,0 nM	-
CD4M32	12	2,0 nM	800 pM
CD4M33	13	250 pM	120 pM

Concentración de inhibición al 50% (CI_{50}) de los péptidos miméticos del CD4 en la interacción del CD4 recombinante soluble para la proteína de la envuelta viral gp120_{LAI} y gp120_{HXB2}. La desviación estándar para cada valor es inferior al 30%

Nombre	Secuencia ID n°	CI_{50} (gp120 _{LAI})	CI_{50} (gp120 _{HXB2})
CD4M35	14	-	70 pM
K15FR	15	50 nM	-
K16FR	16	6 nM	-

Ejemplo 3

Experimentos de resonancia de plasmón superficial

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial se realizaron con un sistema Biacore 2000 (Biacore, Uppsala, Suecia). Se acoplaron los péptidos que iban a someterse a prueba con biotina (tal como se describió anteriormente) y después se inmovilizaron sobre una placa sobre la que se había fijado previamente estreptavidina.

Se inmovilizó estreptavidina sobre la placa tal como sigue: en primer lugar se activó la superficie de la placa mediante inyección de 50 μ l de agente de acoplamiento previsto por el constructor y que puede formar uniones amídicas: N-etil-N'-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS), 50/50; a continuación, se inyectaron 20 μ l de estreptavidina, 0,2 mg.ml⁻¹ en acetato de sodio 10 mM, pH 4,5, a 5 μ l.min⁻¹, seguido de una neutralización de los grupos carboxílicos activados por 2 x 20 μ l de etanolamina 1,0 M, pH 8,5. A continuación se inyectaron las moléculas biotiniladas (10 μ l.min⁻¹ en un tampón Hepes 10 mM, NaCl 0,3 M, pH 7,4) en tres de las cuatro pistas de la placa. Sobre la primera pista, se inmovilizó el CD4M9 (10⁻⁷ M) hasta un valor de UR (unidad de resonancia) de 100; se dejó la segunda pista virgen (control); se recubrió la tercera pista con CD4 soluble (10⁻⁷ M) hasta un valor de 450 UR; sobre la cuarta pista, se inmovilizó el CD4M33 (10⁻⁷ M) a un valor de 100 UR. Para cada análisis, se inyectaron varias concentraciones de diferentes gp120 (cepas HXB2, BAL, JRFL), a una velocidad de 50 μ l.min⁻¹ a 25°C, durante un tiempo de asociación de 4 min. A continuación se aclaró la placa con un tampón de elución, Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM y P₂O al 0,05%, pH 7,4, para analizar la fase de disociación. Después de cada experimento, se regenera la placa con 25 μ l de ácido fórmico 1,0 M. Las constantes de disociación se calculan a partir de las constantes cinéticas determinadas por el software Bia-evaluation 3.0.

Ejemplo 4

Actividad antiviral de los agentes miméticos de CD4

Las manipulaciones del material infeccioso se realizaron en un laboratorio de alta seguridad de tipo L3. Para aproximarse lo más posible a las condiciones fisiopatológicas, el estudio se realizó con ayuda de cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas. En todos los experimentos, se compararon los efectos de las nuevas moléculas con los de AZT.

Aislamiento, cultivo y activación de las células. Medios de cultivo

El medio A está compuesto por medio de cultivo celular RPMI 1640 (Life Technologies) complementado con un 10% de suero de ternero fetal (FCS, Roche Product) descomplementado mediante calor a +56°C durante 30 min, 2 mM de L-Glutamina (Roche Product) y una disolución a 100 μ g/ml de tres antibióticos (penicilina, estreptomycin, neomicina; PSN, Life Technologies). El medio B está compuesto por medio A complementado con 20 UI/ml de IL-2 humana recombinante (Roche Product).

Aislamiento y activación de las CMSP

Se separan las CMSP de otros elementos que se encuentran en la sangre mediante centrifugación en gradiente de ficoll (MSL2000, Eurobio): se depositan 30 ml de sangre, de un donante sano, diluidos hasta un tercio sobre una almohadilla de 20 ml de ficoll. Tras 20 min de centrifugación a 850 g, se extrae el anillo de CMSP y después se lava dos veces con ayuda de RPMI 1640, después de 10 min de centrifugación a 750 g y 5 min a 400 g. Entonces se activan las CMSP durante 48 h mediante 1 μ g/ml de fitohemaglutinina-P (PHA-P; Difco Laboratories). Se cultivan las CMSP a +37°C, en atmósfera saturada de humedad, bajo un 5% de CO₂. Al cabo de las 48 horas de activación mitogénica, se cultivan en medio B. A lo largo de todo el cultivo, se extraen los sobrenadantes de cultivo, y se renuevan los medios de cultivo cada tres o cuatro días. Con cada renovación del medio de cultivo, se evalúa la viabilidad celular mediante una observación al microscopio.

Evaluación de la actividad antiretroviral de las moléculas

Se solubilizaron los compuestos de la presente invención CD4M30, CD4M33 y CD4M35 en agua ppi estéril (Aguettant), se tomaron alícuotas y después se conservaron a -20°C. Se conservó el compuesto SAH-CD4 (CD4 soluble acoplado a albúmina sérica humana proporcionado por Aventis (Vitry-sur-Seine) a -80°C hasta su uso. A continuación se realizaron inmediatamente las disoluciones y las diluciones en medio A. Se trataron previamente las CMSP con los compuestos durante 1 hora y después se infectaron por el aislado de referencia con tropismo linfocitario VIH-1_{LAI} o por el aislado clínico VIH-1_{LEN}. Las características biológicas de este aislado son: rapid/high, scyncitia inducing (SI), X4: por tanto es preferiblemente apto para infectar los linfocitos. La reserva viral se constituyó amplificando *in vitro* esta cepa con ayuda de células mononucleares de sangre umbilical (CMSU) previamente activadas mediante 1 µg/ml de PHA-P y cultivadas en medio B. Con el fin de eliminar los factores solubles tales como las citocinas, se sometieron a ultracentrifugación los sobrenadantes de cultivo a 360000 g durante 5 min, y volvieron a suspenderse los sedimentos en RPMI 1640. A continuación se valoró la reserva viral así constituida con ayuda de CMSP activadas mediante PHA-P. Se calculó la DICT₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose - dosis infecciosa de cultivo tisular al 50%) utilizando la fórmula de Kärber. Se infectaron las CMSP con diferentes dosis virales de 10-100 DICT₅₀ de la cepa VIH-1_{LAI} y por 50 DICT₅₀ de la cepa VIH-1_{LEN} (multiplicidad de infección m.o.i. = 0,001).

Dosificación de la replicación viral en los sobrenadantes de cultivo

Se midió la replicación viral el día 7 del cultivo, titulando la actividad transcriptasa inversa en los sobrenadantes de cultivo con ayuda del kit de titulación RetroSys (marca registrada) según las recomendaciones de la sociedad Innovagen.

Análisis de los resultados y determinación de las dosis eficaces al 50%

Se calculan las dosis eficaces al 50% (DE₅₀) utilizando el software "Dose-effects analysis with microcomputers" desarrollado por J. Chou & T. C. Chou.

*Ejemplo 5**Protocolo de producción de la proteína viral gp120 recombinante*

Se amplificó el fragmento que codifica para la proteína viral gp120 (aminoácido V12 a R481) mediante PCR en el plásmido HIVIIB/HXB2R, con ayuda de dos cebadores que permiten generar un fragmento que contiene los sitios BamHI (en sentido 5' del sitio KpnI de la proteína viral gp120) y PstI (en sentido 3' del codón de detención añadido en el extremo de la secuencia de la proteína viral gp120). Se clonó el fragmento BamHI/PstI así obtenido en el vector Bluescript (pBS, Stratagene), conduciendo al plásmido pBSm1. Se insertaron la secuencia que codifica para el extremo N-terminal de la proteína viral gp120 (T1 a G11), así como la que codifica para el péptido señal de la ecdisteroide glicosiltransferasa del baculovirus de *Autographa californica*, entre los sitios BamHI y KpnI de pBSm1, conduciendo a pBSm2.

A continuación se insertó el fragmento BamHI-PstI de pBSm2 entre los sitios BglII-PstI del vector de transferencia p119P del baculovirus P10. Se transfectaron conjuntamente células de insectos Sf9 con el ADN viral purificado del baculovirus modificado AcSLP10 y el ADN del vector recombinante p119P gp120. Se purificaron los virus recombinantes mediante un método convencional.

Se conservaron las células Sf9 scl (línea adaptada al crecimiento sin suero, depositada en la colección del Instituto Pasteur) en un tubo de centrifuga en medio sin suero. A continuación se infectan estas células (5 10⁵ células/ml) por los virus recombinantes con una multiplicidad de infección de 1 UFP (unidad formadora de placas) por célula y se incubaron a 28°C. Después de seis días de infección, se centrifugaron las células (500 g), y se concentró la proteína viral gp120 de tipo natural y se purificó directamente a partir del sobrenadante de cultivo mediante cromatografía de afinidad sobre una columna Sepharose bromoacetilada acoplada al anticuerpo anti-gp120 D7324.

*Ejemplo 6**Fijación de la envuelta viral*

Con el fin de caracterizar mejor su actividad biológica, se marcó el péptido de la presente invención CD4M33 (secuencia ID nº 13) con biotina y con la sonda fluorescente de fluoresceína tal como se describió en el ejemplo 1, a nivel de la Lys-11 colocada sobre la superficie opuesta a la superficie activa del péptido de la presente invención CD4M33. Su actividad permanece inalterada en las pruebas ELISA (figura 2).

La figura 2 agrupa los resultados obtenidos en este ejemplo. Se trata de curvas que muestran la evolución del porcentaje de fijación (%F) de péptidos de la presente invención a la proteína viral gp120_{HXB2} en función de la concentración molar de esos péptidos (C(M)).

Estos resultados muestran que el péptido CD4M33 puede incorporar un grupo de marcaje sin que su actividad biológica se vea alterada.

Con el fin de obtener una primera evaluación de la afinidad del péptido de la presente invención CD4M33 por la proteína viral gp120, se utilizó un análisis de interacciones bioespecíficas (descrito en el ejemplo 3), basado en la detección por resonancia de plasmón superficial. En esta técnica, se fijó el péptido CD4M33 de la presente invención biotinilado (preparado tal como en el ejemplo 1) de manera específica sobre la matriz de dextrano carboxilado de una placa en la que se injertó previamente estreptavidina. A continuación se inyectaron disoluciones de diferentes proteínas recombinantes gp120 (gp120_{HXB2}, gp120_{BAL} y gp120_{JRFL}) sobre esta matriz y entonces se detectó una señal que indicaba una asociación específica y de alta afinidad. La figura 3 muestra la evolución de la señal de resonancia de plasmón en función del tiempo, tras la interacción de la proteína gp120_{HXB2} (a diferentes concentraciones) con el péptido CD4M33 de la presente invención.

Después de la regresión no lineal de las curvas de asociación y de disociación obtenidas, se obtiene una constante de disociación K_D de $2,4 \cdot 10^{-9}$ M por la proteína viral gp120_{HXB2}, de $7,4 \cdot 10^{-9}$ M por la proteína viral gp120_{BAL} y de $8,5 \cdot 10^{-9}$ M por la proteína viral gp120_{JRFL}. Estos valores son comparables al valor de $K_D = 1,9 \cdot 10^{-8}$ M, indicado en la bibliografía [34] para la interacción CD4-gp120. Se utilizó también la misma técnica basada en la detección por resonancia de plasmón superficial para verificar si el péptido de la presente invención CD4M33 podía fijar la envuelta viral en su forma nativa. Para ello, se inyectó una suspensión de partículas virales inactivadas por adritiol-2 [35] en la misma placa, en la que se injertaron los anticuerpos 48d y CG10. Entonces se detectó claramente una señal de interacción específica y de alta afinidad, en el caso en el que la suspensión se incubó con el péptido de la presente invención CD4M33, pero no en el caso en el que la suspensión viral se incubó con el péptido CD4M9, mucho menos activo, o en ausencia del péptido (figura 4).

La figura 4 muestra que la presencia del péptido CD4M33 es esencial para la interacción de la envuelta viral con los anticuerpos 48d y CG10, específicos de la envuelta viral, y que el VIH-1 no se fija a los anticuerpos en su ausencia: se trata de una demostración indirecta de la fijación del péptido CD4M33 a la envuelta viral del VIH-1.

Estos experimentos demuestran que el péptido de la presente invención CD4M33, marcado o no, presenta una capacidad para fijar la envuelta viral VIH tanto en su forma recombinante aislada y purificada como en su forma nativa presente en la superficie del virus.

Ejemplo 7

Inhibición de la infección por VIH-1

Con el fin de evaluar la capacidad antiviral de los péptidos de la presente invención, los inventores realizaron experimentos de infección, por el virus VIH-1_{LAI} y por el aislado químico VIH-1_{LEN}, de cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas. En todos los experimentos, se compararon los efectos de las nuevas moléculas a los de AZT. Se añadió el virus VIH-1_{LAI} a diferentes dosis virales (10 - 100 DICT₅₀, tabla 2) en presencia de concentraciones variables de CD4M30, CD4M33, CD4M35 y de SAH-CD4. Se añadió el virus VIH-1_{LEN} a DICT₅₀ (tabla 4) en presencia de CD4M33. También se realizaron pruebas de toxicidad de agentes miméticos del CD4 en las mismas células.

a. Toxicidad de los agentes miméticos CD4

A las dosis sometidas a prueba, ninguno de los compuestos, AZT, SAH-CD4 o agentes miméticos anti-CD4, ha reducido la viabilidad de las CMSP activadas por PHA-P.

b. Actividad anti-VIH-1_{LAI} de los agentes miméticos de CD4

b.1. Replicación de la cepa VIH-1_{LAI} en las CMSP

La cepa VIH-1_{LAI} se replica a alto nivel en las CMSP activadas por PHA-P. El máximo de replicación viral está en el día 7 del cultivo, y se cuantificaron los efectos de los péptidos CD4M30, CD4M33 y CD4M35 en este momento tras la infección.

b.2. Efectos de AZT sobre la replicación de la cepa VIH-1_{LAI} en las CMSP

AZT inhibe fuertemente la replicación de la cepa VIH-1_{LAI} en las CMSP activadas por PHA-P (tabla 2). La DE₅₀ es igual a 3 - 14 nM.

b.3. Efectos del compuesto SAH-CD4 sobre la replicación de la cepa VIH-1_{LAI} en las CMSP

La actividad antiretroviral del compuesto SAH-CD4 con respecto a las CMSP activadas por PHA-P e infectadas por la cepa VIH-1_{LAI} se traduce en una inhibición del $85 \pm 15\%$ de la replicación viral a la concentración de $2,5 \mu\text{M}$.

b.4. Efectos de los agentes miméticos de CD4 sobre la replicación de la cepa VIH-1_{LAI} en las CMSP

Los péptidos de la presente invención CD4M30, CD4M33 y CD4M35 han demostrado una actividad anti-retroviral (tabla 3) en los cultivos de CMSP activadas por PHA-P e infectadas por la cepa VIH-1_{LAI}. El compuesto CD4M33 es el más antiviral de los tres a las diferentes dosis virales sometidas a prueba. Su actividad es más débil que la de AZT: DE₅₀ = 100-500 nM frente a AZT: DE₅₀ = 3 nM (tabla 3 a continuación), pero es superior en al menos 1 logaritmo de base 10 a la del derivado del receptor CD4, SAH-CD4.

Las figuras 5A-C agrupan los resultados obtenidos: porcentaje de inhibición (%I) en función de la concentración de péptido en nM.

c. Actividad antiretroviral del compuesto CD4M33 con respecto al aislado clínico VIH-1_{LEN}c1. Efectos de AZT sobre la replicación del aislado VIH-1_{LEN} en las CMSP

La AZT inhibe fuertemente la replicación de la cepa VIH-1_{LEN} en las CMSP activadas por PHA-P e infectadas por el aislado VIH-1_{LEN}, con una DE₅₀ igual a 2,2 nM (tabla 4). El grado de inhibición es idéntico al observado con respecto a la cepa de referencia con tropismo linfocitario VIH-1_{LAI}.

c2. Efectos del agente mimético CD4M33 sobre la replicación del aislado clínico VIH-1_{LEN} en las CMSP

La actividad retroviral del agente mimético CD4M33 con respecto a CMSP activadas por PHA-P e infectadas por el aislado VIH-1_{LEN} se traduce por una reducción dependiente de la dosis de la replicación viral y una DE₅₀ igual a 367 nM (tabla 4). Por tanto, el agente mimético CD4M33 conserva una actividad anti-VIH-1 significativa, aunque resulta ser ligeramente más débil con respecto a la observada con la cepa VIH-1_{LAI}.

Estos experimentos demuestran que esos péptidos de la presente invención pueden inhibir la infección de las células, incluso a dosis virales elevadas, con valores de DE₅₀ de 900-35 nM (tabla 3 a continuación). El péptido de la presente invención CD4M33 es el más antiviral y su DE₅₀ es de aproximadamente 100 nM para las dosis virales habituales de infección (figura 4 a-c, tabla 3 a continuación).

Además, el péptido CD4M33 está dotado de una actividad antiretroviral superior en 1 logaritmo de base 10 a la observada con otro derivado del receptor CD4, el SAH-CD4, y sobre todo ha demostrado una actividad anti-VIH significativa con respecto a un aislado clínico (tabla 4).

En conclusión, el péptido de la presente invención CD4M33, que puede fijarse sobre la proteína viral gp120 recombinante con una K_d de 2,4-8,0 nM (experimentos de resonancia de plasmón superficial) e inhibir la interacción entre las proteínas recombinantes CD4-gp120 en ELISA, con una CI₅₀ de 120-250 pM, también presenta la capacidad de inhibir esta interacción en cultivos primarios de células humanas, inhibir la etapa inicial de la entrada y por tanto bloquear la infección incluso de un aislado clínico de VIH-1.

TABLA 2

Efecto de AZT sobre la replicación de la cepa VIH-1 _{LAI} en las CMSP activadas por PHA-P. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición ± desviación estándar	
AZT (nM)	% de inhibición
1	39 ± 10%
10	59 ± 28%
100	87 ± 18%
1000	100 ± 0%
10000	100 ± 0%

TABLA 3

Dosis eficaces al 50% (DE ₅₀) de los péptidos de la presente invención y de AZT en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas, activadas por fitohemaglutinina-P (PHA-P) e infectadas por la cepa VIH-1 _{LAI} a diferentes dosis infecciosas (DICT ₅₀ : dosis infecciosa de cultivo tisular al 50%)			
DE ₅₀ (nM)			
secuencias	100 DICT ₅₀	50 DICT ₅₀	10 DICT ₅₀
CD4M30	894	235	253
CD4M33	534	133	118
CD4M35	154	428	266
AZT	14	3	5

TABLA 4

Efecto de AZT y del agente mimético CD4M33 sobre la replicación del aislado clínico VIH-1 _{LEN} en los cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas, activadas por fitohemaglutinina-P (PHA-P). Las células se infectaron por 50 DICT ₅₀ de virus		
VIH-1 _{LEN}	AZT	CD4M33
DE ₅₀ (nM)	2,2	367
DE ₇₀ (nM)	4,8	542
DE ₉₀ (nM)	16,5	1006

Ejemplo 8

Exposición de sitios antigénicos de la envuelta

Con el fin de evaluar la capacidad del péptido de la presente invención CD4M33 para inducir variaciones conformacionales en la proteína gp120, caracterizada por la exposición de epítopos sensibles a anticuerpos neutralizantes, se llevó a cabo la interacción de tales anticuerpos humanos 48d y CG10 con la envuelta del VIH en presencia del CD4M33 y, para comparación, del CD4 recombinante, utilizando la técnica de resonancia de plasmón superficial. Se fijaron los anticuerpos 48d y CG10 de manera covalente a la superficie de las placas (biochip), después se inyectaron disoluciones de gp120, en ausencia de CD4 y en presencia de un exceso de CD4 y de CD4M33. Cuando se añade CD4M33 a la proteína viral gp120_{HXB2}, con un exceso molar de 1,5 y 20 veces, la proteína viral manifiesta una fuerte interacción con los anticuerpos (figuras 6a-b); por el contrario, en su ausencia (y en ausencia de CD4 soluble) la proteína de la envuelta interacciona con los anticuerpos muy débilmente (figura 6a-b). Además, el efecto de la adición de CD4M33 sobre el aumento de la afinidad de interacción de la proteína viral gp120 para los anticuerpos es comparable al que se obtiene mediante adición de cantidades equivalentes de CD4 soluble.

Los inventores han realizado igualmente experimentos similares de resonancia de plasmón utilizando directamente el VIH-1, la cepa HXB2. La figura 4 muestra los resultados obtenidos en estos experimentos y demuestra la evolución de la señal de resonancia de plasmón en función del tiempo tras la interacción de una suspensión de partículas virales VIH-1_{HXB2} con una placa que presenta los anticuerpos 48d y CG10 inmovilizados: el VIH-1 interacciona con los anticuerpos únicamente tras la incubación con el péptido CD4M33 de la presente invención y, por el contrario, en su ausencia o en presencia del péptido[Ala23]CD4M9 inactivo, la interacción es prácticamente nula.

Por tanto, la técnica de resonancia de plasmón superficial ha permitido demostrar que la unión del CD4M33 a la proteína de la envuelta gp120 puede inducir una modificación de la proteína viral, que, a continuación, expone de manera preferencial ciertas superficies moleculares a los anticuerpos neutralizantes (17b, CG10), aislados de personas afectadas por el VIH-1 [11], [12], [13].

La exposición de estos epítomos crípticos, inducida por el péptido CD4M33 de la presente invención, es eficaz tanto en la proteína de la envuelta en forma recombinante como en la envuelta de los viriones. Además, en vista de los experimentos recientes que demuestran que la proteína gp120 complejada con CD4 puede ser una forma molecular capaz de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes [31, 32, 33], el complejo CD4M33-gp120 representa entonces un candidato muy interesante como inmunógeno para la inducción de anticuerpos neutralizantes, especialmente en una aplicación de vacuna.

El CD4M33 presenta la propiedad de desenmascarar epítomos de la proteína viral gp120, tal como hace el CD4 soluble, con la ventaja de que no podrá inducir respuesta inmunitaria contra el CD4 y que, además, debido a su pequeño tamaño, permitirá un acceso aún más favorable a los epítomos desenmascarados de la proteína viral gp120.

Ejemplo 9

Síntesis de un soporte cromatográfico para la purificación de la envuelta viral del VIH

Con el fin de evaluar la posibilidad de utilizar el péptido de la presente invención mimético del CD4 como ligando inmovilizado para funcionalizar una matriz cromatográfica para la purificación de la proteína viral gp120, se funcionalizó un soporte polimérico hidrófilo, Sepharose 4B (Farmacia, Uppsala, Suecia) con uno de nuestros agentes miméticos del CD4 y a continuación se utilizó para la fijación de la proteína viral gp120 directamente a partir del medio de cultivo de la proteína viral. Para evitar utilizar condiciones demasiado drásticas durante la elución de la proteína gp120 del soporte y para limitar por tanto las posibilidades de desnaturalización, se seleccionó un ligando con una afinidad más débil por la proteína viral gp120. Se trata del CD4M9 que presenta en ELISA una afinidad (CI_{50}) por la proteína viral gp120 de entre 0,1 μ M y 1,0 μ M, según el aislado de VIH-1. Se modificó el CD4M9 sobre la posición Lys11, ya utilizada en los marcapos anteriores, para incluir un grupo tiol complementario (descrito en el ejemplo 1) que se utilizó a continuación para su inmovilización covalente sobre el soporte de Sepharose 4B, tal como se describe a continuación.

Se funcionaliza la resina EAH Sepharose (marca comercial) (comercializada por Pharmacia Biotech), que comprende de 7 a 12 μ moles de funciones amina primaria por ml de resina seca, por un grupo maleimida. Para ello, se tratan 12 ml de resina, previamente equilibrados en 24 ml de agua, durante 12 h con 1,05 mg de reactivo de azufre SMCC (éster 3-sulfo-M-hidroxisuccinimídico del ácido (4-N-maleimidoetil)ciclohexano-1-carboxílico (Sigma)) manteniendo el pH a aproximadamente 4,5. La tasa de sustitución esperada es de 200 nmoles de función maleimida por ml de resina seca. A continuación se retira el exceso de reactivo mediante lavados sucesivos con Tris-HCl 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0, después con un tampón 100 mM de acetato de sodio, NaCl 500 mM, pH 4,0. A continuación se acetilan las funciones amina libre restantes mediante dos tratamientos con una disolución de anhídrido acético al 1%. A la resina funcionalizada por la maleimida se le añaden 3,8 mg de péptido CD4M9 tiolado. Se agita la reacción a 4°C durante 12 horas. A continuación se lava la resina y se equilibra con el tampón de uso, fosfato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4. Se preparó una columna cromatográfica de 6,0 ml con esta matriz que contiene aproximadamente 0,1 mg/ml de péptido según la presente invención CD4M9 inmovilizado. A continuación se cargó esta columna con el medio de cultivo de la gp120 y a continuación se eluyó la proteína viral retenida sobre la columna de la columna con tratamiento de ácido acético 0,5 M. Se analizaron las fracciones eluidas con ácido acético mediante SDS-PAGE y a continuación se liofilizaron. El análisis de estas fracciones demuestra que contienen la proteína viral gp120.

La figura 8 es una representación gráfica del perfil cromatográfico obtenido en este ejemplo: absorbancia a 280 nm (A280) en función del tiempo en minutos (t(min)).

El perfil cromatográfico de la figura 8 muestra varios picos de elución de la proteína de la envuelta. Los inventores piensan que los diferentes picos representan la proteína viral gp120 a diferentes grados de desnaturalización provocada por el ácido acético utilizado en la elución de la columna.

Ejemplo 10

Selección

Se marcaron moléculas de la presente invención con fluoresceína o biotina sin alterar la afinidad de unión a la proteína viral gp120.

En este ejemplo, se realiza un marcaje con metales lantánidos fluorescentes o con isótopos radiactivos, sin alterar la actividad de unión de los péptidos de la presente invención a la proteína viral gp120. Esos péptidos marcados se utilizan como indicadores, en experimentos de selección mediante competición de la interacción de estos péptidos con la proteína viral gp120.

En un primer experimento, se inmoviliza la proteína viral gp120 en microplacas de 96 pocillos y se coloca el péptido CD4M33, marcado con el lantánido europio (III), en presencia de esta proteína en condiciones que permiten la interacción entre el péptido de CD4M33 y la proteína gp120. Las mediciones de señal (por ejemplo las mediciones de fluorescencia de resolución temporal) permiten cuantificar la capacidad de las moléculas seleccionadas para desplazar los péptidos marcados.

En un segundo experimento, se marca el péptido CD4M33, con fluoresceína y se une a la proteína viral gp120, y se detecta mediante mediciones de polarización de fluorescencia en disolución, en sistemas miniaturizados.

Estos dos sistemas, utilizados para seleccionar moléculas que pueden inhibir la interacción CD4-gp120, no son limitativos. Las moléculas detectadas por esta selección representan inhibidores de la interacción CD4-gp120 y por tanto posiblemente inhibidores de la infección viral.

Las técnicas de puesta en práctica utilizadas en este ejemplo se describen en la bibliografía, especialmente en los documentos [37, 38, 39 y 40].

Bibliografía

[1] Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., Hendrickson, W.A. (1998) *Nature* 393, 648-659.

[2] Sweet, R.W., Truneh, A., Hendrickson, W.A. (1991) *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 622-633.

[3] Ryu, S.E., Truneh, A., Sweet, R.W., Hendrickson, W.A. (1994) *Structure* 2, 59-74.

[4] Vita, C., Drakopoulou, E., Vizzavona, J., Rochette, S., Martin, L., Ménez, A., Roumestand, C., Yang, Y.S., Ylistagui, L., Benjouad, A., Gluckman, J.C. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13091-13096.

[5] Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A. (1996) *Science* 272, 872-877.

[6] Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., Sodroski, J. (1996) *Cell* 85, 1135-1148.

[7] Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., Paxton, W.A. (1996) *Nature* 381, 667-673.

[8] Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M., Berger, E.A. (1996) *Science* 272, 1955-1958.

[9] Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., Sodroski, J. (1996) *Nature* 384, 179-183.

[10] Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J., Moore, J.P. (1996) *Nature* 384, 184-187.

[11] Thali, M., Moore, J.P., Furman, C., Charles, M., Ho, D.D., Robinson, J., Sodroski, J. (1993) *J. Virol.* 67, 3978-3988.

[12] Wyatt, R., Moore, J., Accola, M., Desjardin, E., Robinson, J., Sodroski, J. (1995) *J. Virol.* 69, 5723-5733.

[13] Moore, J., Sodroski, J. (1996) *J. Virol.* 70, 1863-1872.

[14] Chen S., Chrusciel, R.A., Nakanishi, H., Raktabut, A., Johnson, M.E., Sato, A., Weiner, D., Hoxie, J., Sagarovi, H.U., Greene, M.I., Kahn, M. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 5872-5876.

[15] Zhang, X., Gaubin, M., Briant, L., Srikantan, V., Murali, R., Saragoui, H.U., Weiner, D., Devaux, C., Autiero, M., Piatier-Tonneau, D., Greene, M.I. (1997), *Nature Biotechnol.*, 15, 150-154.

[16] Moore, J.P., Sweet, R.W. (1993), *Perspect. Drug Disc. Design* 1, 235-250.

[17] Allaway GP, Davis-Bruno KL, Beaudry GA, Garcia EB, Wong EL, Ryder AM, Hasel KW, Gauduin MC, Koup RA, McDougal JS, et al. (1995) *AIDS Res Hum Retroviruses*. 11, 533-539.

[18] Otomo, H., Wesolowski, J., Way, J.C., Itoh, I., Ono, M., Wada, Y., Wu, Y., Nemori, R., Jinbo, Y., Wang, H., Lo, K.M., Yamaguchi, N., Brunkhorst, B., Gillies, S., Chen, L.B. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15, 343-348.

[19] Ojwang, J.O., Buckheit, R.W., Pommier, Y., Mazumder, A., De Vreese, K., Este, J.A., Reyman, D., Pallas, L.A., Lackman-Smith, C., Wallace, T.L., et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2426-2435.

[20] Rusconi, S., Moonis, M., Merrill, D.P., Pallai, P.V., Neidhardt, E.A., Singh, S.K., Willis, K.J., Osburne, M.S., Profy, A.T., Jenson, J.C., Hirsch, M.S. (1996) *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 234-236.

[21] De Clercq, E. (1998) *Pure Appl. Chem.* 70, 567-577.

- [22] **Yahi, N., Fantini, J., Baghdiguian, S., Mabrouk, K., Tamalet, C., Rochat, H., Van Rietschoten, J., Sabatier, J.M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4867-4871.**
- [23] **De Clercq, E., Yamamoto, N., Pauwels, R., Balzarini, J., Witvrouw, M., De Vreese, K., Debyser, Z., Rosenwirth, B., Peichl, P., Datema, R., Thornton, D., Skerlj, R., Gaul, F., Padmanabhan, S., Bridger, G., Henson, G., Abrams, M. (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 668-674.**
- [24] **Howard, O.M., Oppenheim, J.J., Hollingshead, M.G., Covey, J.M., Bigelow, J., McCormack, J.J., Buckheit, R.W. Jr, Clanton, D.J., Turpin, J.A., Rice, W.G. (1998) *J. Med. Chem.* 41, 2184-2193.**
- [25] **Tamamura, H., Muratami, T. Masuda, M., Otaka, A., Takeda, W., Ibuka, T., Nakashira, H., Waki, M., Matsumoto A., Yamamoto, N. et al. (1994), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205, 1729-1735.**
- [26] **Tamamura, H., Omagari, A., Oishi, S., Kanamoto, T., Yamamoto, N., Peiper, S.C., Nakasima, H., Otaka, A., Pujiri, N. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 2633-2637.**
- [27] **Baba, M., Nishimura, O., Kanzaki, N., Okamoto, M., Sawada, H., Iizawa, Y., Shiraishi, M., Aramaki, Y., Okonogi, K., Ogawa, Y., Meguro, K., Fujino, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5698-5703.**
- [28] **Wild, C., Dubay, J.W., Greenwell, T., Baird, T. Jr, Oas, T.G., McDanal, C., Hunter, E., Matthews, T. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9770-9774.**
- [29] **Rimsky, L.T., Shugars, D.C., Matthews, T.J. (1998) *J. Virol.* 72, 986-993.**
- [30] **Chun, T.W., Fauci, A.S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10958-10961.**
- [31] **LaCasse R.A., Follis K.E., Trahey, M., Scarborough, J.D., Littman, D.R., Nunberg, J.H. (1999) *Science* 283,357-362.**
- [32] **Devico A, Silver A, Thronton AM, Sarngadharan MG, Pal R. (1996) *Virology* 218, 258-63.**
- [33] **Fouts TR, Tuskan R, Godfrey K, Reitz M, Hone D, Lewis GK, DeVico AL. (2000) *J Virol.* 74, 11427-36.**
- [34] **Rossio, J.L., Esser, M.T., Suryanarayana, K., Schneider, D.K., Bess, J.W. Jr, Vasquez, G.M., Wiltrout, T.A., Chertova, E., Grimes, M.K., Sattentau, Q., Arthur, L.O., Henderson, L.E., Lifson, J.D. (1998) *J. Virol.* 72, 7992-8001.**
- [35] **Lee, S., Peden, K. Dimitrov, D.S., Broder, C.C., Manischewitz, J., Denisova, G., Gershoni, J.M., Golding, H. (1997) *J. Virol.* 71, 6037-6043.**
- [36] **Wu, M., Myszka, D.G., Tendian, S.W., Brouillette, C.G., Sweet, R.W., Chaiken, I.M., Heudrickson, W.A. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 120530-15035.**
- [37] **McMahon J.B., Beutler, J.A., O'Keefe, B.R., Goodrum, C.B., Myers, M.A., Boyd, M.R. (2000) *J. Biomol. Screen* 5, 169-176.**
- [38] **Sportman, J.R., Leytes, L.J. (2000) *Drug Discov, Today* 1, 27-32.**
- [39] **Mathis G., *Biochemistry*, 1993, 32 (43), 11682-7.**
- [40] **Pernelle C., et al.; *Clin. Chem.*, 1993, 39 (9), 1953-9.**

REIVINDICACIONES

1. Péptido **caracterizado** porque comprende la secuencia (I) siguiente:

TPA - Xaa^a - Xaa^b - Ala o Gln o His - Arg o Phe - Cys - Xaa^c - Xaa^d - Arg - Cys - Lys - Xaa^e -
Xaa^f - Xaa^g - Xaa^h - Leu o Lys - Xaaⁱ - Lys - Cys - Ala o Gln - Gly o (D)Asp o Ser - Ser o His o
Asn - Xaa^j - Cys - Thr o Ala - Cys - Xaa^k - NH₂

en la que TPA representa el ácido tiopropiónico, Xaa^a, Xaa^b, Xaa^c, Xaa^d, Xaa^e, Xaa^f, Xaa^g, Xaa^h y Xaaⁱ, son aminoácidos, naturales o no naturales, idénticos o diferentes, Xaa^j representa β-naftilalanina o fenilalanina o bi-fenilalanina, y Xaa^k representa Gly o Val o Ile.

2. Péptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia (I) puede comprender además un residuo prolina unido al residuo Xaa^k.

3. Péptido según la reivindicación 1 ó 2, en el que Xaaⁱ es Gly.

4. Péptido que comprende una secuencia seleccionada de entre las secuencias ID n° 4, ID n° 5, ID n° 6, ID n° 7, ID n° 8, ID n° 9, ID n° 10, ID n° 11, ID n° 12, ID n° 13, ID n° 14, ID n° 15 y ID n° 16 de la lista de secuencia adjunta.

5. Procedimiento de fabricación de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicho procedimiento una síntesis química en fase sólida de dicho péptido.

6. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para preparar un medicamento.

7. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para preparar un agente antiviral.

8. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para preparar un medicamento destinado al tratamiento del SIDA.

9. Vacuna que comprende un complejo de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y de una proteína de envuelta de un virus.

10. Vacuna según la reivindicación 9, en la que el virus es un virus del SIDA.

11. Uso *in vitro* de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la detección de moléculas de la envuelta viral del VIH.

12. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para fabricar un producto de diagnóstico.

13. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como ligando inmovilizado para funcionalizar una matriz de cromatografía.

14. Uso *in vitro* de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un procedimiento de selección.

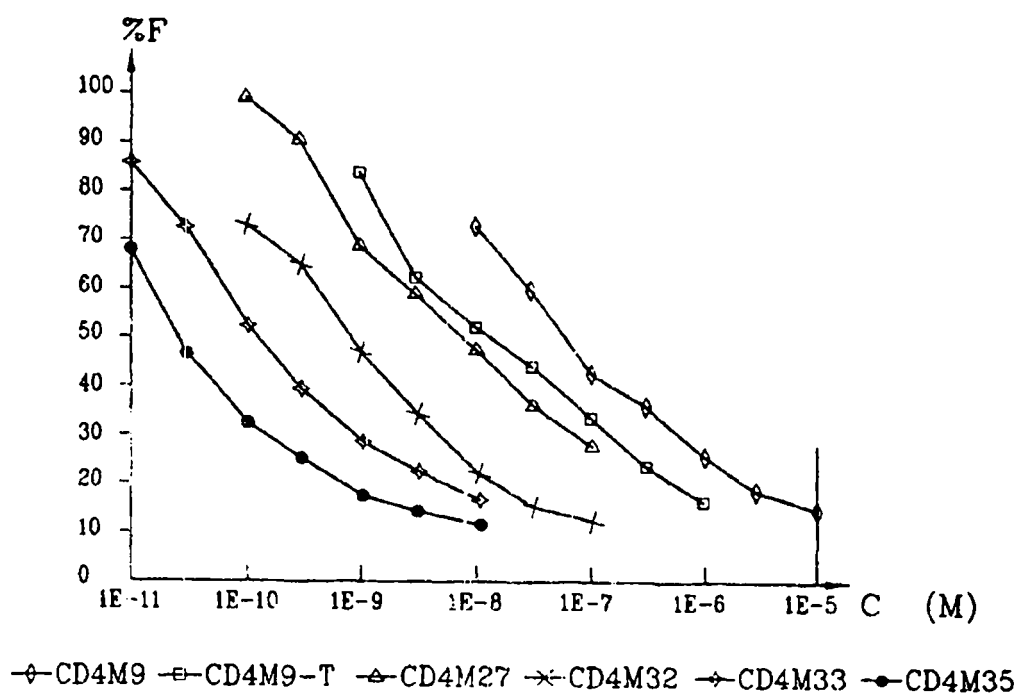


Fig. 1

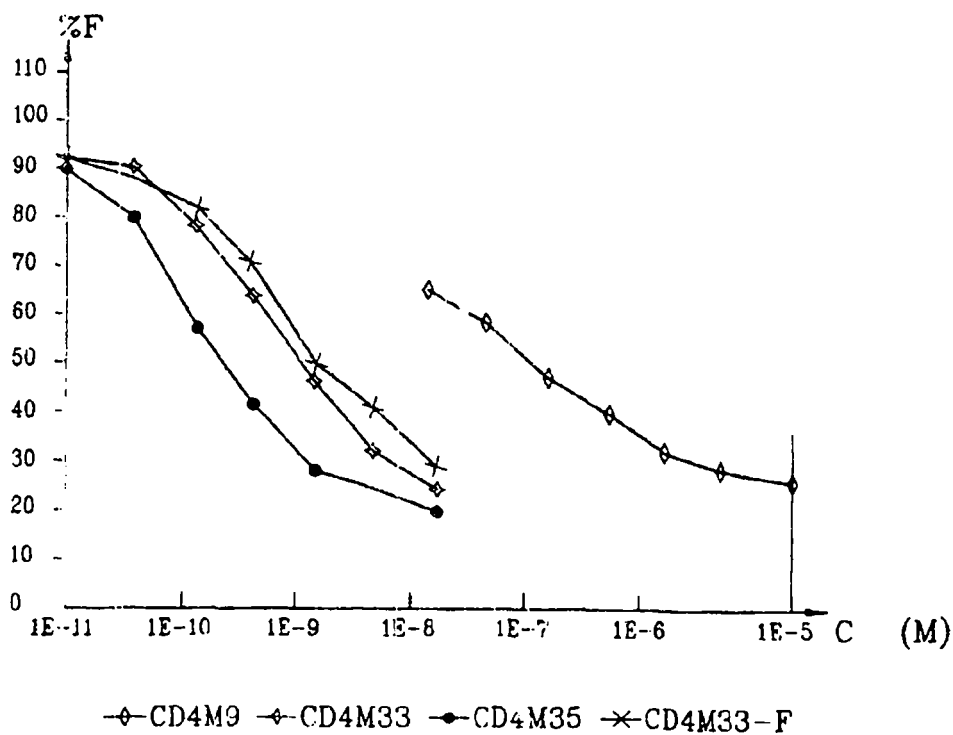


Fig. 2

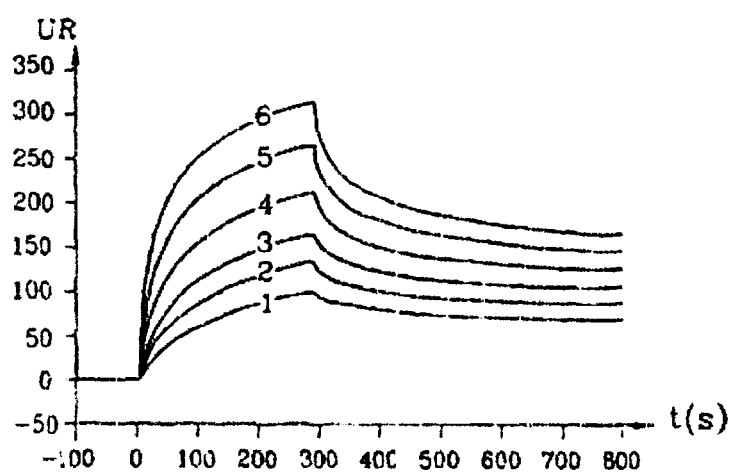


Fig. 3

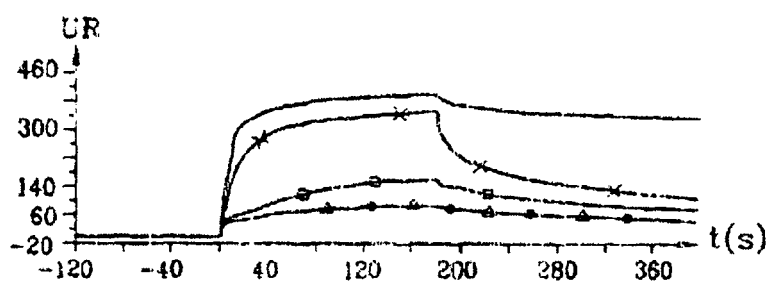


Fig. 6A

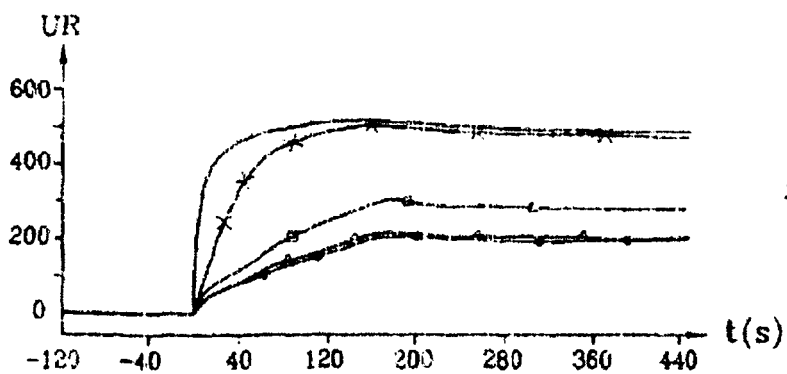


Fig. 6B

x gp120+CD4M27 o gp120+CD4M9 square gp120+(A23)CD4M9
 triangle gp120 sola circle gp120+CD4s

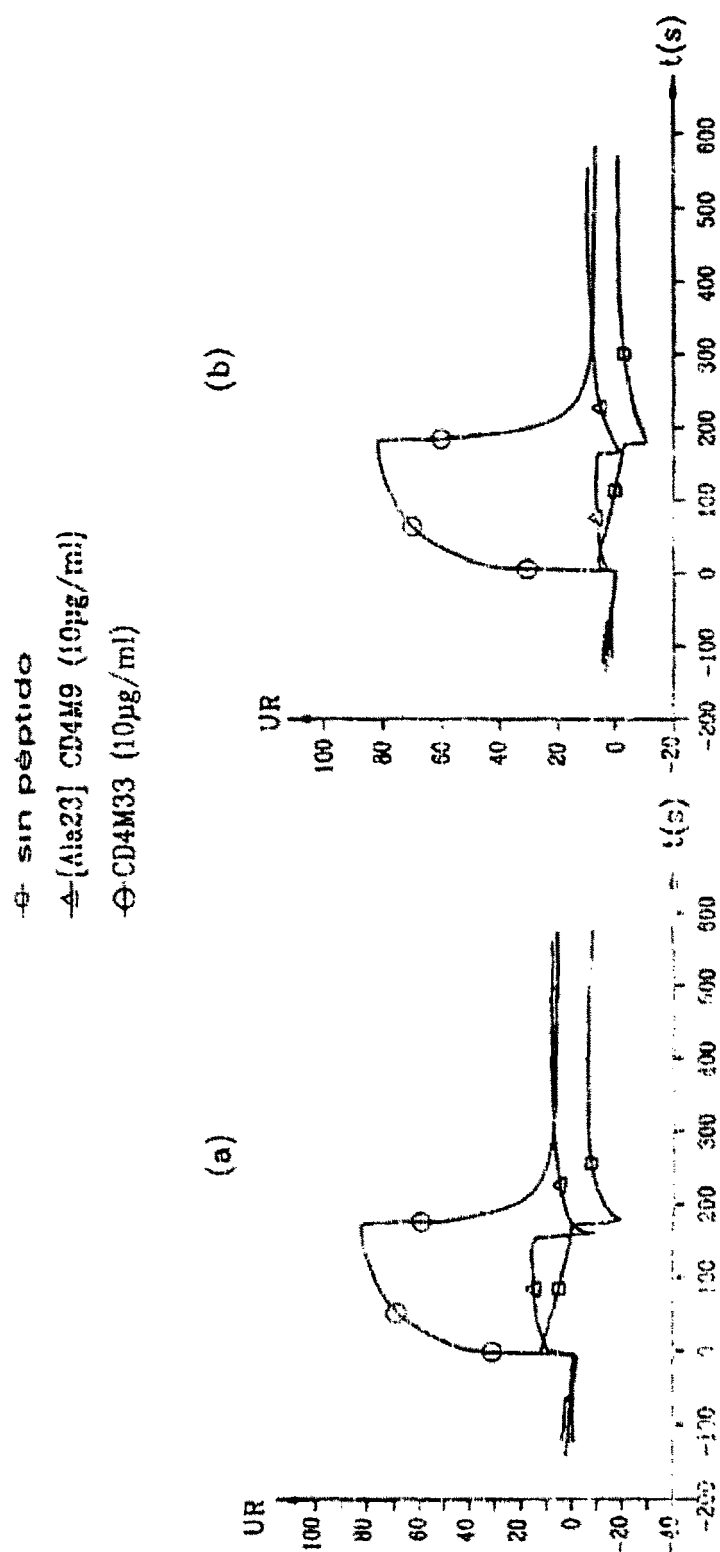


Fig. 4

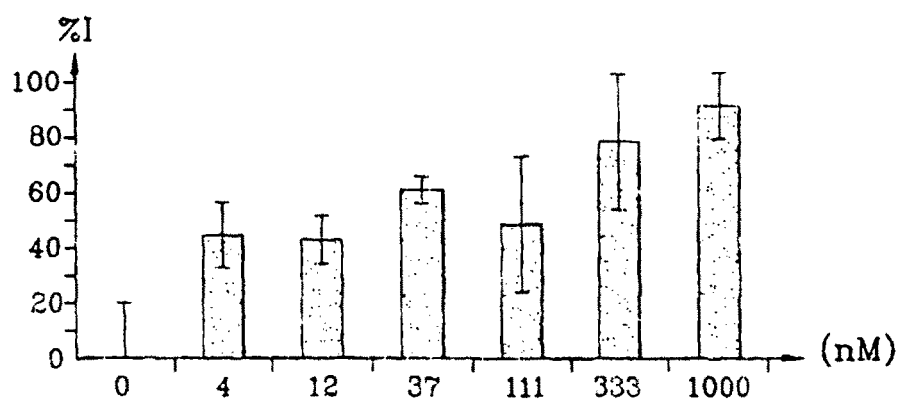


Fig. 5A

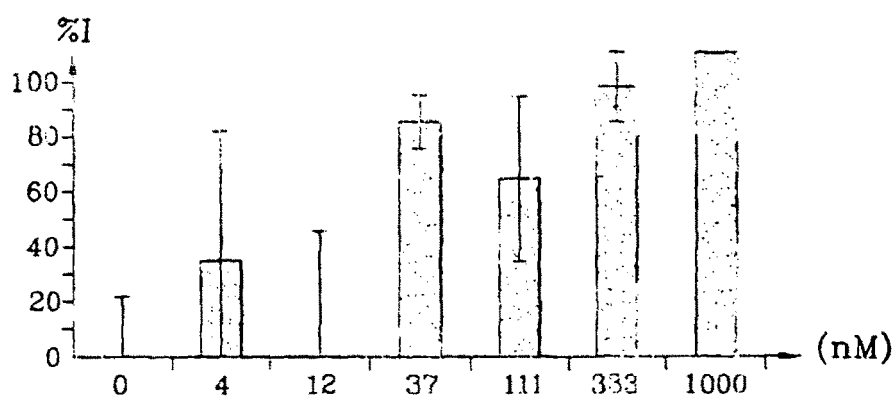


Fig. 5B

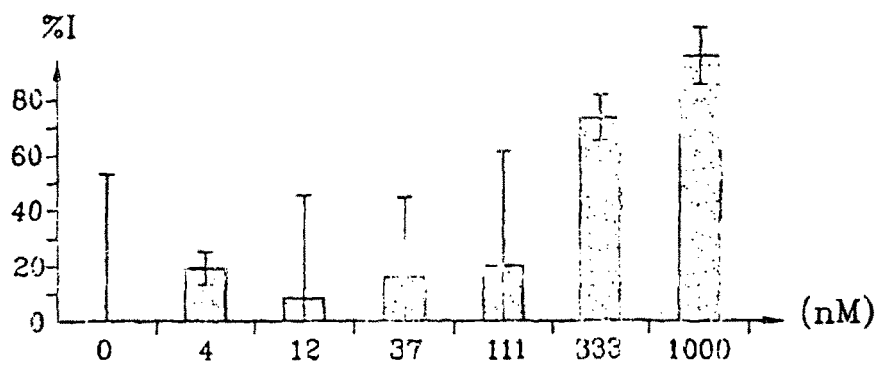


Fig. 5C

Q I K I L G N Q G S F L T K G P										SCDA
33										48 (CDR2)
2 F T N V S C T T S K E C W S V C Q A L H N T S R G K C M N E K C R C Y S										CDTX
1	10	20	30	37						
- - - - V S C T T S K E C W S V C Q R L H N T S K G G C Q G S F C T C G P										CD4M
A F C N L R M C Q L S C R S L G L L G K C I G D K C E C V K H										ScTx
1	31									
- - C N L A R C Q L S C K S L G L K G G C Q G S F C T C G - -										CD4M3
1	27									
- - C N L A R C Q L R C K S L G L L G K C A G S F C A C G P -										CD4M9
- - L A M L A R C Q L R C K S L G L L G K C A G S F C A C G P -										CD4M9T
- - L A N L A F C Q L R C K S L G L L G K C A G S F C A C V - -										CD4M27
- - L A N L A F C Q L R C K S L G L L G K C A G S F C A C V - -										CD4M27A
- - L A N L A F C Q L R C K S L G L L G K C A G H F C A C V - -										CD4M27B
- - L A N L A F C Q L R C K S L G L L G K C A G N F C A C V - -										CD4M27C
- - L A N L Q F C Q L R C K S L G L L G K C A G S E C A C V - -										CD4M30
- - L A N L A R C Q L R C K S L G L L G K C A G S E C A C V - -										CD4M32
- - L A N L H F C Q L R C K S L G L L G K C A G S E C A C V - -										CD4M33
- - L A N L H F C Q L R C K S L G L L G K C A d S B C A C I - -										CD4M35
- - L A N L H F C V Q R C H S L G L L G K C A G S F C A C V - -										K15
- - L A N L H F C V Q R C H S L G L L G K C A G S F C A C V - -										K16

Fig. 7

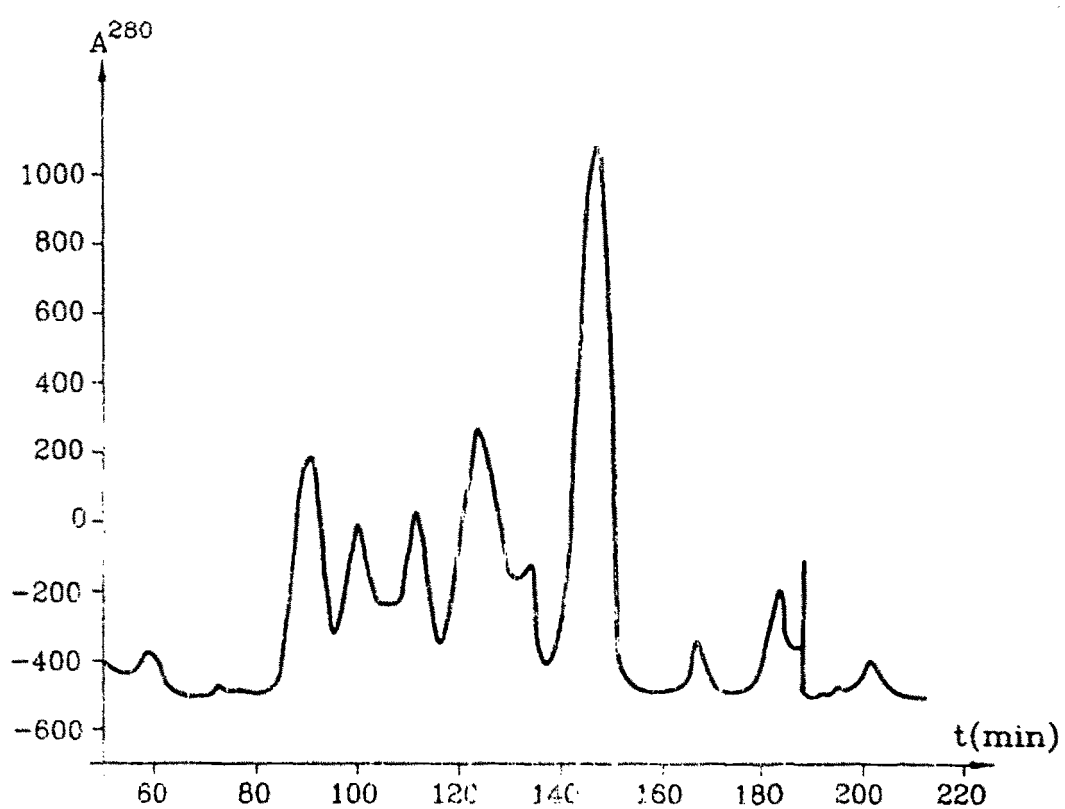


Fig. 3

ES 2 291 439 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CEA
- 5 <120> PÉPTIDO CON AFINIDAD POR LA PROTEÍNA gp 120
 <130> B13685,3EE
 <140>
 <141>
 10 <160> 18
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 15 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 20 <223> Secuencia Gln33 a Pro48 del CD4 humano
- <400> 1
- 25 Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
 1 5 10 15
- <210> 2
 30 <211> 31
 <212> PRT
 <213> escorpión
- 35 <400> 2
- Ala Phe Cys Asn Leu Arg Met Cys Gln Leu Ser Cys Arg Ser Leu Gly
 40 1 5 10 15
- Leu Leu Gly Lys Cys Ile Gly Asp Lys Cys Glu Cys Val Lys His
 20 25 30
- 45 <210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina
- 55 <400> 3
- Cys Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
 60 1 5 10 15
- Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Gly Pro
 20 25
- 65 <210> 4
 <211> 28

ES 2 291 439 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (1)

<223> ácido tiopropiónico

<400> 4

15 Xaa Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
1 5 10 15

20 Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Gly Pro
20 25

<210> 5

25 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina

<220>

<221> MOD_RES

35 <222> (1)

<223> ácido tiopropiónico

<220>

<221> MOD_RES

40 <222> (23)

<223> bi-fenilalanina o naftilalanina

<400> 5

45 Xaa Asn Leu His Phe Cys Val Gln Arg Cys His Ser Leu Gly Leu Leu
1 5 10 15

50 Gly Lys Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val
20 25

<210> 6

55 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina

<220>

<221> MOD_RES

65 <222> (1)

<223> ácido tiopropiónico

ES 2 291 439 T3

<400> 6

Xaa Asn Leu Ala Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
 5 1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Val
 10 20 25

<210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina
 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> ácido tiopropiónico

<400> 7

Xaa Asn Leu Ala Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
 30 1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Ser Ser Phe Cys Ala Cys Val
 20 25

<210> 8
 <211> 27
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> ácido tiopropiónico

<400> 8

Xaa Asn Leu Ala Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
 55 1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly His Phe Cys Ala Cys Val
 20 25

<210> 9
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina

ES 2 291 439 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 5 <223> ácido tiopropiónico
 <400> 9

 10 Xaa Asn Leu Ala Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15

 15 Gly Lys Cys Ala Gly Asn Phe Cys Ala Cys Val
 20 25

 20 <210> 10
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> ácido tiopropiónico
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (23)
 <223> bi-fenilalanina o naftilalanina
 40 <400> 10

 Xaa Asn Leu Gln Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
 45 1 5 10 15

 Gly Lys Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val
 20 25
 50
 <210> 11
 <211> 27
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina
 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> ácido tiopropiónico
 65 <220>
 <221> MOD_RES

ES 2 291 439 T3

<222> (23)
 <223> bi-fenilalanina o naftilalanina
 5 <400> 11

 Xaa Asn Leu His Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 10
 Gly Lys Cys Gln Gly Ser Xaa Cys Thr Cys Val
 20 25
 15
 <210> 12
 <211> 27
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> ácido tiopropiónico
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)
 <223> bi-fenilalanina o naftilalanina
 35
 <400> 12

 Xaa Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 40
 Gly Lys Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val
 20 25
 45
 <210> 13
 <211> 27
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 60 <223> ácido tiopropiónico
 <220>
 <221> MOD_RES
 65 <222> (23)
 <223> bi-fenilalanina o naftilalanina

ES 2 291 439 T3

<400> 13

Xaa Asn Leu His Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val
20 25

<210> 14

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> ácido tiopropiónico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)

<223> bi-fenilalanina o naftilalanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)

<223> isómero D de Asp

<400> 14

Xaa Asn Leu His Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Xaa Ser Xaa Cys Ala Cys Ile
20 25

<210> 15

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> ácido tiopropiónico

<400> 15

Xaa Asn Leu His Phe Cys Val Gln Arg Cys His Ser Leu Gly Lys Leu
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Val
20 25

ES 2 291 439 T3

<210> 16
 <211> 27
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> ácido tiopropiónico
 15 <400> 16
 Xaa Asn Leu His Phe Cys Val Gln Arg Cys His Ser Leu Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Val
 20 25
 25 <210> 17
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la escilatoxina
 <400> 17
 35 Cys Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Ser Cys Lys Ser Leu Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Gly Gly Cys Gln Gly Ser Phe Cys Thr Cys Gly
 40 20 25
 <210> 18
 45 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia procedente de la caribdotoxina
 <400> 18
 Val Ser Cys Thr Thr Ser Lys Glu Cys Trp Ser Val Cys Gln Arg Leu
 55 1 5 10 15
 His Asn Thr Ser Lys Gly Gly Cys Gln Gly Ser Phe Cys Thr Cys Gly
 60 20 25 30
 Pro
 65