(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 351 027**

(21) Número de solicitud: 200930045

(51) Int. CI.:
A61K 38/10 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **06.04.2009**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2011**

Fecha de la concesión: **14.11.2011**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **24.11.2011**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **24.11.2011**

(73) Titular/es:
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)
SERRANO, 117
28006 MADRID, ES

(72) Inventor/es:
GOMARA ELENA, MARIA JOSE y
HARO VILLAR, ISABEL

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **USO DE PEPTIDOS DE LA PROTEINA E1 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS G PARA INHIBIR LA ACTIVIDAD DEL VIRUS VIH.**

(57) Resumen:
Uso de péptidos de la proteína E1 del virus de la hepatitis G para inhibir la actividad del virus VIH. La presente invención se refiere al uso de al menos un péptido, o derivado del mismo, contenido en la secuencia de la proteína E1 del virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV), capaz de inhibir la actividad del virus VIH, impidiendo o reprimiendo la función y/o actividad del virus VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), de forma transitoria o permanente, o además capaz de interaccionar con una secuencia aminoacídica de la glicoproteína gp41 del virus VIH, para la elaboración de una composición farmacéutica. Dicho péptido es capaz de impedir la inhibición de la función del fragmento de la proteína gp41 del virus VIH, impedir la fusión celular o impedir la replicación del VIH en una célula huésped. Asimismo la presente invención también se refiere a dicha composición farmacéutica y al método para su fabricación.

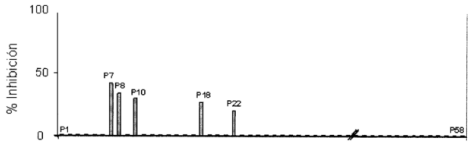


FIG. 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

ES 2 351 027 B1

DESCRIPCIÓN

Uso de péptidos de la proteína E1 del virus de la hepatitis G para inhibir la actividad del virus VIH.

La presente invención se refiere al uso de al menos un péptido, o derivado del mismo, contenido en la secuencia de la proteína E1 del virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV), capaz de inhibir la actividad del virus VIH, impidiendo o reprimiendo la función y/o actividad del virus VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), de forma transitoria o permanente, o además capaz de interaccionar con una secuencia aminoacídica de la glicoproteína gp41 del virus VIH, para la elaboración de una composición farmacéutica. Dicho péptido es capaz de impedir la inhibición de la función del fragmento de la proteína gp41 del virus VIH, impedir la fusión celular o impedir la replicación del VIH en una célula huésped. Asimismo la presente invención también se refiere a dicha composición farmacéutica y al método para su fabricación.

Estado de la técnica anterior

Cuando a mediados de los años 90 se descubrió un supuesto nuevo virus de la hepatitis, el GB virus C (GBV-C), también denominado virus de la hepatitis G (HGV) (Simons *et al*., 1997. *Nature Medicine* 1: 564-569; Linnen *et al*., 1996 *Science* 271, 505-508), muchos grupos de investigación trataron de correlacionarlo con la inflamación hepática u otras enfermedades asociadas. Sin embargo, no se pudo identificar ninguna influencia en la salud (Mphahlele *et al*., 1998. *Liver* 18: 143-155; Theodore *et al*., 1997. *Hepatology* 25: 1285-1286), hasta que el Prof. Tillmann descubrió el inesperado beneficio de la coinfección por GBV-C/HGV en el curso de la enfermedad de los pacientes que habían sido infectados por VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana 1) (Heringlake *et al*., 1998. *J. Infect. Dis.* 177: 1723-1726).

Aunque en algunas ocasiones los resultados no han sido claramente significativos (Zhang *et al*., 2006. *HIV Med*. 7: 173-180), se ha observado una menor progresión de la enfermedad y un incremento en la supervivencia en individuos GBV-C/HGV positivos comparados con individuos GBV-C/HGV negativos, mientras que la pérdida de la viremia GBV-C/HGV está estrechamente relacionada con una mortalidad incrementada así como con una mayor progresión del SIDA (Van der Bij *et al*., 2005. *J. Infect. Dis*. 191: 678-685; Williams *et al*., 2004. *N. Engl. J. Med*. 350: 981-990).

El empleo de péptidos sintéticos como inhibidores del VIH-1 ha sido objeto de investigación durante los últimos años. Se han estudiado y lo están siendo en la actualidad, para su aplicación clínica en la lucha contra la infección por el VIH-1 un gran número de péptidos que tienen como diana las distintas etapas del ciclo vital del VIH-1.

Los péptidos inhibidores del VIH-1 han sido identificados y/o desarrollados mediante distintos métodos. Algunos péptidos terapéuticos como el Enfuvirtide, ya aprobado para su uso clínico (Burton, 2003. *Lancet Infec. Dis.* 3, 260), derivan del VIH-1, mientras que otros son péptidos naturales como las quimiocinas, defensinas o el "Virus Inhibitory Peptide" (VIRIP) (Munch *et al*., 2007, *Cell* 129: 263-275) o han sido diseñados y sintetizados a partir de datos cristalográficos de las proteínas del VIH-1 o a partir de librerías peptídicas (Boggiano *et al*., 2006. *Biochem. Biophvs. Res. Comun*. 347: 909-915).

El ciclo replicativo del VIH ha sido descrito con detalle en numerosas revisiones (Greene y Peterling, 2002. *Nat. Med*. 8: 673-680; Freed y Mouland, 2006. *Retrovirology* 3: 77). Se ha descrito la entrada del virus a la célula huésped como un proceso que requiere tres etapas: 1) aproximación y unión del VIH a las moléculas de CD4 (receptor primario) a través de la glicoproteína viral gp120; 2) cambio conformacional en gp120, lo que permite la unión al coreceptor de quimiocinas (CCR5 o CXCR4) y 3) fusión de la envuelta del VIH con la membrana de la célula mediante un cambio conformacional en la glicoproteína de membrana gp41,el cual tiene lugar únicamente tras la unión productiva de gp120 a CD4. Cada una de estas etapas representa una diana potencial en la inhibición de la replicación viral.

Así pues, sería útil el uso de inhibidores de fusión o entrada viral y/o replicación del virus, para impedir la acción del virus VIH en células huésped, siendo esta fase de fusión y/o entrada un punto adecuado para la actuación de los inhibidores, ya que el virus todavía no ha introducido su material genético en el interior celular.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere al uso de al menos un péptido contenido en la secuencia de la proteína E1 del virus GBV-C/HGV, capaz de inhibir la actividad del virus VIH, impidiendo o reprimiendo la función y/o actividad del virus VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), de forma transitoria o permanente, o además capaz de interaccionar con una secuencia amininoacídica de la glicoproteína gp41 del virus VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana 1), para la elaboración de una composición farmacéutica. Dicho péptido es capaz de inhibir la función del fragmento de la proteína gp41 del virus VIH, impedir la fusión celular o impedir la replicación del VIH en una célula huésped.

En los ejemplos de la presente invención se sintetizan 58 péptidos compuestos por 18 aminoácidos que abarcan la secuencia completa de la proteína E1 del virus GBV-C/HGV (SEQ ID NO: 1). Dichas secuencias solapan en 15 aminoácidos, es decir, un péptido concreto tiene tres aminoácidos diferentes respecto al péptido que le precede o que le sigue.

A continuación se determina la interacción de cualquiera de los péptidos de la secuencia SEQ ID NO: 1 del virus GBV-C/HGV con una secuencia aminoacídica (SEQ ID NO: 2) de la glicoproteína de membrana gp41 del virus VIH-1 (Virus de Inmunodeficiencia Humana 1) mediante el empleo de técnicas biofísicas que permiten determinar la inhibición de liberación de contenidos vesiculares inducida por SEQ ID NO: 2, y evaluando el potencial carácter inhibitorio del VIH-1 mediante ensayos celulares dirigidos a determinar la inhibición de la fusión celular o la inhibición de la replicación del virus.

Las principales ventajas que aportan los péptidos sintéticos de la presente invención son:

- Su baja toxicidad sistémica.

- La posibilidad de realizar modificaciones estructurales en ellos y consecuentemente la capacidad que presentan para mimetizar determinados sustratos o epítopos.

- Su aplicabilidad en terapias combinadas o cuando aparecen resistencias a otros fármacos antirretrovirales, o

- Que pueden actuar antes de que se produzca la entrada del virus en la célula.

En este sentido, cualquiera de los péptidos de la presente invención podría tener el mismo potencial que la inducción de inmunidad que aporta una vacuna.

Así pues, un aspecto de la presente invención es el uso de al menos un péptido, o derivado del mismo, contenido en una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1, capaz de inhibir la actividad del virus VIH, para la elaboración de una composición farmacéutica.

Es decir, la composición farmacéutica de la presente invención se usa para el tratamiento o prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causado por cualquier tipo de VIH, bien sea del tipo VIH-1, del tipo VIH-2 o cualquier otro tipo de VIH.

Las secuencias aminoacídicas que tienen al menos un 60% de identidad con SEQ ID NO: 1 son secuencias homologas de diferentes genotipos del virus GBV-C/HGV. Este porcentaje de identidad no se ha escogido de forma arbitraria sino tras obtener la identidad de los genotipos conocidos de la base de datos de GeneBank y compararlas por medio de un análisis Blast de la secuencia SEQ ID NO: 1. En este análisis comparativo se ha encontrado una secuencia correspondiente a un fragmento de una poliproteína de la variante Troglodites del virus GBV-C/HGV. La secuencia completa (de 2942 aminoácidos) se puede consultar en el número de acceso AAD31543 del GeneBank. En este análisis comparativo se ha podido determinar una identidad de un 66% del fragmento del virus GBV-C/HGV Troglodites respecto de SEQ ID NO: 1.

El término “derivado del mismo”, tal como se entiende en la presente invención se refiere al péptido resultante de variaciones en la composición aminoacídica de su secuencia de forma que se obtenga un péptido que tenga su origen en la secuencia original sin perder la característica funcional que le caracteriza en la presente invención. A modo de ejemplo, un péptido derivado de cualquiera de los péptidos que proceden de una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1, puede tener aminoácidos distintos en la misma posición de la secuencia siempre que esos cambios no afecten a la eficacia en la función definida para los mismos en la presente invención y teniendo en cuenta que dichos péptidos derivados tienen al menos un 60% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

El término “inhibición de la actividad del virus VIH” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a impedir o reprimir la función y/o actividad del virus VIH, de forma transitoria o permanente.

SEQ ID NO: 1 es una secuencia aminoacídica de la proteína de envoltura E1 del virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV). El péptido, contenido en la secuencia SEQ ID NO: 1, es capaz de inhibir la actividad del virus VIH actuando en una o varias etapas del proceso de infección de dicho virus.

Una realización preferida se refiere al uso de al menos un péptido, o derivado del mismo, contenido en una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 capaz de inhibir la actividad del virus VIH, para la elaboración de una composición farmacéutica. Según una realización más preferida, el péptido, o derivado del mismo está contenido en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

Otra realización preferida se refiere al uso de al menos un péptido, donde además dicho péptido es capaz de interaccionar con un fragmento de la proteína gp41 del virus VIH.

Según otra realización más preferida, el virus VIH es el virus VIH-1. Otra realización más preferida se refiere al uso de al menos un péptido, donde el fragmento de la proteína gp41 es la secuencia SEQ ID NO: 2 del virus VIH-1.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia aminoacídica comprendida entre los aminoácidos 1 y 23 la glicoproteína de membrana gp41 del virus VIH-1 (Virus de Inmunodeficiencia Humana 1) (Nº de acceso ACJ04095 de GeneBank). La envoltura del virus VIH-1 está compuesta de espículas, que son complejos proteicos integrados en la membrana. Cada

espícula está formada por la proteína gp41, integral en la membrana, y una cabeza externa formada por la proteína gp120, esencial para el acoplamiento con el exterior de ciertas células previo a su invasión. Una posibilidad para inhibir la unión del virus a las células sanas, como por ejemplo, pero sin limitarse, linfocitos es actuar contra la proteína gp41.

La interacción de cualquiera de los péptidos con la secuencia SEQ ID NO: 2 tal como se entiende en la presente invención, hace referencia a la acción que se ejerce recíprocamente entre dichas secuencias. Así pues, por ejemplo, pero sin limitarse, la interacción hace referencia a cualquier tipo de enlace químico, fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas.

Para referirse a la composición farmacéutica se puede emplear también el término "medicamento". La composición farmacéutica comprende cualquier péptido contenido en la secuencia SEQ ID NO: 1, tal como se ha descrito en párrafos precedentes. Dicha composición puede comprender uno o más péptidos así como cualquier combinación de dichos péptidos. Cualquiera de los péptidos de la presente invención, se formula en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En adelante se podrá hacer referencia a cualquiera de los péptidos definidos en los párrafos precedentes como "péptido/s de la presente invención" o "péptido/s de la invención".

Los péptidos de la presente invención pueden ser lineales o cíclicos, pueden incorporar residuos no naturales como los D-aminoácidos y, también, pueden modificarse mediante la conjugación con ácidos grasos. Además, los péptidos de la presente invención pueden formar parte de un sistema para generar anticuerpos anti-péptidos como por ejemplo, pero sin limitarse, MAPS (*Multiple Antigen Peptide System*). Estas diferentes estrategias de presentación peptídica permiten incrementar la actividad antiviral de péptidos sintéticos y, además, pueden mejorar la estabilidad y selectividad de este tipo de moléculas en su aplicación clínica.

Una realización preferida se refiere al uso donde el péptido de la invención tiene entre 15 y 20 aminoácidos. El orden que ocupa cada aminoácido de cualquiera de los péptidos de la invención es el mismo que el orden que ocupa en la secuencia SEQ ID NO: 1, de esta forma, los péptidos de la presente invención son secuencias parciales de la secuencia SEQ ID NO: 1 que tienen una extensión de entre 15 y 20 aminoácidos o secuencias derivadas de las anteriores que incorporen algún aminoácido sustituido.

Otra realización preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la inhibición de la actividad del virus VIH se produce por impedir la entrada de material genético de dicho virus a la célula huésped.

El término "entrada del material genético del virus" hace referencia a la entrada de ARN viral protegido o no por cápside y/o nucleocápside así como la entrada de proteínas virales que son consecuencia de la traducción de algunas secuencias de ARN viral en el propio virus.

Las posibles células huésped en las que podría entrar el material genético del virus se seleccionan, pero sin limitarse, de la lista que comprende, linfocitos T CD4+, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans o células de microglía del cerebro.

Según una realización más preferida, la entrada del material genético a la célula huésped se impide por la inhibición de la fusión celular. Otra realización aún más preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica, donde la inhibición de la fusión celular se lleva a cabo por medio de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido contenido en cualquiera de los fragmentos aminoacídicos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

El término "inhibición de la fusión celular" tal como se entiende en la presente invención se refiere a impedir o reprimir de forma permanente o transitoria la fusión de la envoltura del virus VIH con la membrana de la célula sana (célula huésped a la que se une el virus VIH). Al menos en algunos casos, esta inhibición está basada probablemente en un cambio conformacional en la glicoproteína de membrana gp41 del virus VIH-1 que impide la fusión con la célula huésped.

La valoración del grado de inhibición de la fusión celular se lleva a cabo por medio de la observación de sincitios al microscopio. La formación de sincitios es el efecto citopático del VIH en algunas líneas celulares y consiste en la formación de acúmulos celulares (por la acumulación de diversos núcleos) que pierden la capacidad de separación de la membrana de la célula infectada tras producirse la mitosis, es decir, la célula pierde la capacidad de dividirse.

Otra realización aún más preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica, donde el péptido, o cualquiera de sus combinaciones, se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. La lista de péptidos que se presenta pertenece a los fragmentos SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 de la manera que se presenta en la tabla 1.

TABLA 1

Correspondencia de los péptidos implicados en la inhibición de la fusión celular, con los fragmentos de SEQ ID NO: 1

Fragmento de SEQ ID NO: 1	Péptido
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 5
	SEQ ID NO: 9
	SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 12
	SEQ ID NO: 13
	SEQ ID NO: 14
	SEQ ID NO: 15
	SEQ ID NO: 16

Otra realización preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica donde la inhibición de la actividad del virus VIH se produce por inhibir la función de un fragmento de la proteína gp41 del virus VIH. Preferiblemente el fragmento de la proteína gp41 es SEQ ID NO: 2. El fragmento de la proteína gp41 es un péptido de fusión N-terminal del virus VIH. La función del péptido de fusión a la membrana celular hace que la envoltura del virus se adhiera y penetre el virus o su material genético al interior del citoplasma de la célula huésped. Es decir, la inhibición de la función del fragmento de la proteína gp41 del virus VIH se puede experimentar mediante la inhibición de la liberación de contenidos vesiculares.

Una realización más preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica, donde la inhibición de la función del fragmento de la proteína gp41 del virus VIH-1 se lleva a cabo por medio de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido contenido en el fragmento aminoacídico SEQ ID NO: 3.

El término “inhibición de la liberación de contenidos vesiculares” tal como se entiende en la presente invención se refiere a impedir o reprimir de forma permanente o transitoria la lisis de vesículas lipídicas.

La secuencia SEQ ID NO: 3 es un fragmento aminoacídico que corresponde a una secuencia parcial de SEQ ID NO: 1. El fragmento está compuesto de 69 aminoácidos. Así pues, a modo de ejemplo, el fragmento puede contener 55 péptidos de 15 aminoácidos o 50 péptidos de 20 aminoácidos además de cualquier péptido derivado de ellos.

Una realización aún más preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica, donde el péptido, o cualquiera de sus combinaciones, se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. La lista anterior de péptidos pertenece al fragmento SEQ ID NO: 3.

La composición farmacéutica de la presente invención podría ser utilizada en la inhibición de la replicación del virus VIH-1 y la eficacia de dicha inhibición puede ser valorada por medio de la medida de la concentración del antígeno p24 del virus VIH-1. La detección la proteína p24, es un marcador directo de la presencia del virus en el organismo.

El término “inhibición de la replicación” tal como se entiende en la presente invención se refiere a impedir o reprimir de forma permanente o transitoria la generación de nuevo material genético a partir del material genético del virus VIH-1, nuevos virus o viriones. El término “virión” se refiere a la partícula viral infectiva compuesta al menos por ácido nucleico vírico y/o proteínas víricas. Las proteínas víricas son proteínas estructurales como las que forman la cubierta externa o cápside, o también pueden ser otro tipo de proteínas enzimáticas (por ejemplo POL, VIF, VPR, TAT, etc...). Los viriones son liberados al medio extracelular.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido, o derivado del mismo, contenido en una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1, capaz de inhibir la actividad del virus VIH.

Una realización preferida se refiere a la composición farmacéutica donde la secuencia aminoacídica tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1. Según otra realización más preferida, la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1.

Otra realización preferida se refiere a la composición farmacéutica, donde además al menos un péptido, o derivado del mismo, capaz de inhibir la actividad del virus VIH, es capaz además de interaccionar con un fragmento de la

proteína gp41 del virus VIH. Según otra realización más preferida, el fragmento de la proteína gp41 es la secuencia SEQ ID NO: 2 del virus VIH-1.

Otra realización preferida más se refiere a la composición farmacéutica, donde el péptido tiene entre 15 y 20 aminoácidos.

Otra realización preferida se refiere a la composición farmacéutica que además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los péptidos de la presente invención, estabiliza dichos péptidos o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportarle cualquier otra característica deseable para dicha preparación. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término excipiente "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo, en este caso, el principio activo es cualquiera de los péptidos de la presente invención.

Otra realización preferida se refiere a una composición farmacéutica que además comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición farmacéutica para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

Otra realización preferida se refiere a la composición farmacéutica que además comprende otra sustancia activa. Esta sustancia activa debe permitir la actividad de cualquiera de los péptidos de la invención, es decir, debe ser compatible.

En adelante se podrá hacer referencia a la cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas como "composición/es farmacéutica/s de la presente invención" o "composición/es farmacéutica/s de la invención".

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la fabricación de la composición farmacéutica de la invención, que comprende:

a) Sintetizar al menos un péptido, o derivado del mismo, y

b) preparar el producto obtenido en el apartado (a) en una forma adaptada a la administración oral o parenteral.

Tal como se ha descrito en párrafos precedentes, el péptido, o derivado del mismo, está contenido en una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el péptido, o derivado del mismo, está contenido en una secuencia aminoacídica con al menos un 80% y aún más preferiblemente el péptido, o derivado del mismo, está contenido en la secuencia SEQ ID NO: 1. Cualquiera de los péptidos de la presente invención es capaz de inhibir la actividad del virus VIH, preferiblemente el virus es VIH-1 y además, puede ser capaz de interaccionar con un fragmento de la proteína gp41 del virus VIH, preferiblemente el fragmento de la proteína gp41 es la secuencia SEQ ID NO: 2 del virus VIH-1.

La síntesis de cualquiera de los péptidos de la presente invención puede llevarse a cabo por medio de cualquier técnica conocida en el estado de la técnica. La técnica de síntesis puede, pero sin limitarse, una técnica de síntesis macromolecular, como por ejemplo, pero sin limitarse, síntesis de péptidos en fase sólida. También se puede obtener cualquiera de los péptidos de la invención mediante técnicas de ADN recombinante, es decir, mediante técnicas adaptadas de biología molecular y biotecnológica, en microorganismos o plantas modificados genéticamente.

La síntesis de cualquiera de los péptidos de la presente invención mediante técnicas de ADN recombinante se lleva a cabo mediante inserción en un vector de expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica de cualquiera de los péptidos de la presente invención.

La célula hospedadora se transfecta, mediante las técnicas conocidas en el estado de la técnica, como por ejemplo pero sin limitarse, con electroporación, con biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención en el ADN de la célula huésped, ya sea genómico, cloroplástico o mitocondrial.

La expresión del ácido nucleico en la célula de la invención da lugar a un péptido que puede ser purificado mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica.

En cada caso la forma de presentación de la composición farmacéutica se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente eficaz.

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral. Cualquiera de los péptidos de la invención puede ir asociado, por ejemplo, pero sin limitarse, con liposomas o micelas. Un liposoma es una vesícula esférica con una membrana fosfolipídica. El liposoma contiene un núcleo de solución acuosa. La micela es un lípido esférico que contiene material no acuoso. Tanto los liposomas como las micelas pueden utilizarse como transportadores de diversas sustancias entre el exterior y el interior de la célula.

Por otra parte, cualquiera de los péptidos de la presente invención puede ir unido a uno o más lípidos. El lípido puede estar formado por cadenas alifáticas saturadas o insaturadas, lineales, o constituyendo uno o más anillos aromáticos. En este caso se denominan lipopéptidos. Además, cualquiera de los péptidos de la invención puede ir asociado a partículas como por ejemplo partículas de oro.

Otra posibilidad es que la composición farmacéutica se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada. La forma adaptada a la administración rectal se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, supositorio, cápsula rectal, dispersión rectal o pomada rectal. La forma adaptada a la administración transdérmica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, parche transdérmico o iontoforesis.

Otra realización preferida se refiere al método donde el péptido se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 5-16, es decir, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para el experto en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. *Muestra los péptidos con capacidad de inhibir la liberación de contenidos vesiculares inducida por el péptido de fusión SEQ ID NO: 2 del VIH-1.*

Entre paréntesis se muestra el número de la secuencia que le ha sido asignado en la presente invención a cada uno de los péptidos de la figura: P7 (SEQ ID NO: 6), P8 (SEQ ID NO: 7), P10 (SEQ ID NO: 8), P18 (SEQ ID NO: 10), P22 (SEQ ID NO: 11).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la síntesis de los péptidos de la presente invención así como la inhibición de determinadas actividades del virus VIH-1. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

1.1. *Síntesis de los péptidos*

Se han obtenido 58 péptidos de la proteína de envoltura E1 del virus GBV-C/HGV (SEQ ID NO: 1) por metodología de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida en un sintetizador semiautomático de péptidos (SAM, Multisyntech, Germany), en forma de carboxamidas terminales, empleando una resina Tentagel RAM (Rapp Polymere GmbH, Germany) (100 mg, 0.28 meq/g) y siguiendo una estrategia Fmoc/tBut. La protección de los aminoácidos se ha llevado a cabo de la siguiente forma:

Trifenilmetil (Trt) para glutamina, asparagina, histidina y cisteína; terbutilo (tBu) para ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina y tirosina; 2,2,5,7,8-pentametill-croman-6-sulfonil (Pmc) para arginina y tert-butiloxicarbonilo (Boc) para lisina y triptófano.

La reacción de acoplamiento entre aminoácidos se llevó a cabo por duplicado empleando excesos de tres veces de los Fmoc-aminoácidos. La activación de los aminoácidos se realizó con diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o con hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HATU) en presencia de N-etildiisopropilamina (DIEA). La eliminación secuencial del grupo protector Fmoc se llevó a cabo con 20% de piperidina en dimetilformamida (DMF). La finalización de estas reacciones fue evaluada por reacción colorimétrica (test de ninhidrina). Una vez completada la síntesis se realizó la etapa final de desanclaje del péptido de la resina y desprotección de los grupos funcionales. Para ello se trató la peptidil-resina con ácido trifluoroacético (TFA) al 95% en presencia de capturadores de carbocationes, fundamentalmente un 2.5% de agua y un 2.5% de triisopropilsilano (TIS), durante cuatro horas. Los péptidos finales se aislaron por precipitación con dietiléter, se centrifugaron y liofilizaron en un 10% de ácido acético.

La caracterización de los péptidos se llevó a cabo por cromatografía HPLC analítica en una columna de fase reversa (Kromasil, C-18, 5 μm, 25x0.46 cm) empleando como eluyentes acetonitrilo y agua con un 0.05% en TFA. La identidad de los péptidos obtenidos con un grado de pureza superior al 90% por HPLC analítica a una longitud de onda de 215 nm, fue confirmada por espectrometría de masas MALDI-Tof.

1.2. *Estudio de la inhibición del VIH-1 por parte de los péptidos del virus GBV-C/HGV*

El posible papel inhibidor de las secuencias peptídicas relacionadas con el virus GBV-C/HGV, diseñadas, sintetizadas, purificadas y convenientemente caracterizadas, se ha comprobado por medio de los siguientes ensayos:

a. Ensayo de inhibición de liberación de contenidos vesiculares inducida por el FP del VIH-1,

b. Ensayo de inhibición de la fusión celular.

a) *Ensayo de inhibición de liberación de contenidos vesiculares inducida por la secuencia SEQ ID NO: 2 (fragmento aminoacídico que pertenece a la secuencia de la glicoproteína de membrana gp41 del VIH-1)*

Se ha realizado el ensayo biofísico de liberación de contenidos vesiculares descrito por Ellens (Ellens *et al*., 1984. *Biochemistry* 23: 1532-1538). Para ello se han preparado vesículas lipídicas unilamelares (LUVs) que contienen las sondas fluorescentes: sal sódica del ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico (ANTS) y p-xileno-bis(piridinio)-bromuro (DPX), según el protocolo descrito por nuestro grupo de trabajo (Larios *et al*.,2005. *Arch. Biochem. Biophys*. 442: 149-159). Las diferentes construcciones peptídicas se han mezclado con SEQ ID NO: 2 en DMSO previamente a su adición a la suspensión de liposomas LUVs registrándose la emisión de la sonda ANTS a una longitud de onda de 520 nm. El posible efecto lítico propio de cada una de las construcciones del GBV-C/HGV ha sido restado de la liberación observada en cada caso. Los ensayos se han realizado en un espectrofluorímetro PTI QM4CW (*Photon Technology Internacional*).

b) *Ensayo de inhibición de la fusión celular*

Este ensayo se llevó a cabo empleando dos líneas celulares:

HeLa-env, que expresa la proteína de la envoltura del VIH-1 e integra en su genoma el promotor LTR del VIH-1, y **TZM-bl** (AIDS reagents Cat. No 8129), que expresa el receptor de membrana de los linfocitos CD4 y los coreceptores CCR5 y CXCR4 e integra en su genoma los genes de la luciferasa y la β-galactosidasa. Cuando fusionan las dos células se activa la expresión del gen de la luciferasa, lo que produce la oxidación de la luciferina formándose un peróxido intermedio que se degrada rápidamente y da lugar a la oxiluciferina, la cual al pasar del estado excitado al fundamental emite fotones que pueden ser detectados en un lector de luminiscencia (indicativo del grado de fusión celular).

El ensayo de inhibición de la fusión celular inducido por los péptidos del virus GBV-C/HGV consiste en la incubación de aproximadamente 2.500 células HeLa-env por pocillo (placas Cultek Ref: 3912) durante 1 hora con concentraciones crecientes de los péptidos a ensayar (en la presente invención se han empleado concentraciones de entre 100 y 1000 μM), seguida de la adición de unas 10 veces (aproximadamente de unas 25.000 células) de TZM-bl e incubación durante 24 horas. Para controlar la fusión celular se reservaron pocillos en ausencia de péptidos, y se empleó un inhibidor conocido de la fusión celular, C-34 (AIDS reagents Cat. No 9824), como control positivo.

La valoración cualitativa del grado de inhibición de la fusión celular se llevó a cabo por medio de la observación de la formación de sincitios al microscopio. Los valores cuantitativos se han obtenido por lectura de la luminiscencia (kit comercial Britelite, Perkin Elmer Cat. No 6016761) en un lector de microplacas SpectraMax M5 (*Molecular Devices*).

1.3. *Estudio de la viabilidad celular de los péptidos del virus GBV-C/HGV*

La toxicidad celular de los péptidos sintetizados del virus GBV-C/HGV se determinó según el ensayo que empleó bromuro de 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Mosmann, 1983. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63).

Ejemplo 2

Resultados de inhibición de la función del péptido de fusión del VIH-1 (SEQ ID NO: 2) e inhibición de la fusión celular, inducidas por distintos péptidos de la secuencia SEQ ID NO: 1

Con la finalidad de analizar la interacción de la proteína de envuelta del virus GBV-C/HGV con el péptido de fusión de la glicoproteína gp41 del virus VIH-1 (SEQ ID NO: 2), se realizó la síntesis de péptidos que abarcan la secuencia completa de la proteína E1 del virus GBV-C/HGV (SEQ ID NO: 1) mediante la síntesis de secuencias peptídicas compuestas de 18 aminoácidos solapadas en 15 residuos. Los 58 péptidos obtenidos se caracterizaron por HPLC y HPLC-MS mostrando una pureza superior al 90%.

Se llevó a cabo el estudio de su capacidad de inhibir el proceso de desestabilización de vesículas lipídicas inducido por el péptido de fusión del VIH-1 (SEQ ID NO: 2) siguiendo el procedimiento detallado en la parte experimental. Tal y como se muestra en la Fig. 1, se han podido seleccionar una serie de péptidos con capacidad de inhibir la función de SEQ ID NO: 2. Estos péptidos seleccionados son SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. Para comprobar la especificidad de la interacción observada entre los péptidos del virus GBV-C/HGV y el péptido SEQ ID NO: 2 del virus VIH-1, se utilizó melitina como péptido control. Se pudo comprobar que los péptidos seleccionados no inhibían la capacidad lítica de la melitina tras realizar el mismo ensayo pero en presencia de melitina en lugar del péptido SEQ ID NO: 2, por lo que se confirmó la especificidad de la interacción antes descrita.

En la tabla 2 se indican los péptidos que corresponden a la proteína de envuelta E1 del virus GBV-C/HGV (SEQ ID NO: 1) que a distintas concentraciones, han mostrado capacidad de inhibir la formación de sincitios según el ensayo realizado de fusión celular. Asimismo se muestran los valores de inhibición alcanzados por el péptido inhibidor control. Tras la realización de los ensayos de toxicidad, siguiendo el ensayo del MTT (ejemplo 1.3), con los péptidos del virus GBV-C/HGV se pudo comprobar una viabilidad celular del 100%.

El cálculo del porcentaje de inhibición para cada péptido se ha obtenido según la ecuación:

$$\%\ \text{inhibición péptido} = 100-\{[(Lum(P) - Lum_0)/(Lum_{100} - Lum_0)] \times 100\}$$

siendo:

Lum(P)= luminiscencia de las células tratadas con el péptido

Lum_0= luminiscencia de las células control no fusionadas

Lum_{100}= luminiscencia de las células control totalmente fusionadas

Los estudios realizados indican que varias de las secuencias sintetizadas, pertenecientes a la proteína de envuelta E1 del virus GBV-C/HGV, disminuyen notablemente la fusión de membranas celulares, lo que indica un efecto inhibidor de éstos péptidos frente al virus VIH-1.

TABLA 2

Resultados de la inhibición de la fusión celular inducida por distintos péptidos de la secuencia SEQ ID NO: 1 (proteína de envoltura E1) del virus GBV-C/HGV a diferentes concentraciones. Se muestran los valores de inhibición alcanzados por el inhibidor control (C34)

Péptido	% inhibición (100 µM)	% inhibición (500 µM)	% inhibición (1000 µM)	%inhibición C34 (1.34 µM)
SEQ ID NO: 5	------	46	62	70
SEQ ID NO: 9	------	------	46	70
SEQ ID NO: 10	------	14	65	53
SEQ ID NO: 12	------	------	50	72
SEQ ID NO: 13	------	70	81	72
SEQ ID NO: 14	57	69	60	72
SEQ ID NO: 15	68	47	23	72
SEQ ID NO: 16	93	88	80	74

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un péptido, o derivado del mismo, contenido en una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1, capaz de inhibir la actividad del virus VIH, para la elaboración de una composición farmacéutica.

2. Uso de al menos un péptido según la reivindicación 1, donde la secuencia aminoacídica tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1.

3. Uso de al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1.

4. Uso de al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el virus VIH es del tipo VIH-1.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el péptido tiene entre 15 y 20 aminoácidos.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el péptido está contenido en cualquiera de los fragmentos aminoacídicos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, de la secuencia SEQ ID NO: 1, donde además dicho péptido mantiene la función de origen.

7. Uso según la reivindicación 6, donde el péptido, o cualquiera de sus combinaciones, se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 5-16.

8. Uso según la reivindicación 7, donde el péptido, o cualquiera de sus combinaciones, se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9-10, SEQ ID NO: 12-16.

9. Uso según la reivindicación 7, donde el péptido, o cualquiera de sus combinaciones, se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 6-8, SEQ ID NO: 10-11.

10. Composición farmacéutica que comprende al menos un péptido, o derivado del mismo, contenido en una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1, donde dicho péptido es capaz de inhibir la actividad del virus VIH.

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, donde la secuencia aminoacídica tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1.

12. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1.

13. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde el péptido tiene entre 15 y 20 aminoácidos.

14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

15. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que además comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, que además comprende otra sustancia activa.

17. Método para la fabricación de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16 que comprende:

a) Sintetizar al menos un péptido, o derivado del mismo, y

b) preparar el producto obtenido en el apartado (a) en una forma adaptada a la administración oral o parenteral.

18. Método para la fabricación de la composición farmacéutica según la reivindicación 17, donde el péptido se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 5-16.

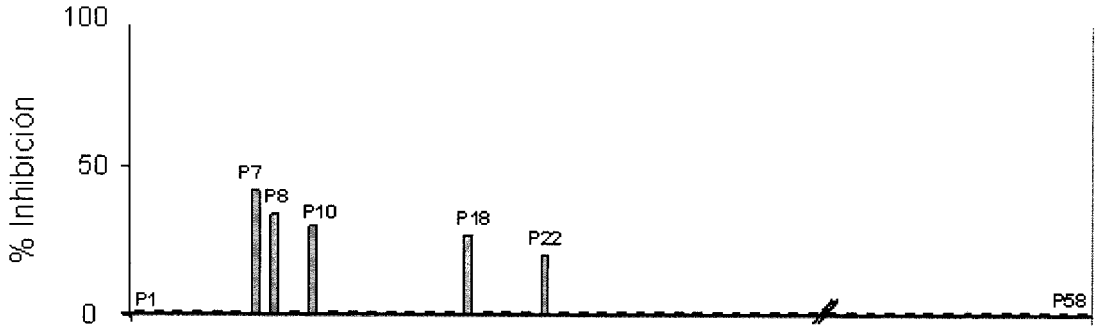


FIG. 1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

<120> Uso de péptidos de la proteína El del virus de la hepatits G para inhibir la actividad del virus VIH

<130> 1641.438bis

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 190
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 1

```
Ile Leu Ala Pro Ala Thr His Ala Cys Arg Ala Asn Gly Gln Tyr Phe
1               5                   10                  15

Leu Thr Asn Cys Cys Ala Pro Glu Asp Ile Gly Phe Cys Leu Glu Gly
            20                  25                  30

Gly Cys Leu Val Ala Leu Gly Cys Thr Ile Cys Thr Asp Gln Cys Trp
        35                  40                  45

Pro Leu Tyr Gln Ala Gly Leu Ala Val Arg Pro Gly Lys Ser Ala Ala
    50                  55                  60

Gln Leu Val Gly Glu Leu Gly Ser Leu Tyr Gly Pro Leu Ser Val Ser
65                  70                  75                  80

Ala Tyr Val Ala Gly Ile Leu Gly Leu Gly Glu Val Tyr Ser Gly Val
                85                  90                  95

Leu Thr Val Gly Val Ala Leu Thr Arg Arg Val Tyr Pro Val Pro Asn
            100                 105                 110

Leu Thr Cys Ala Val Ala Cys Glu Leu Lys Trp Glu Ser Glu Phe Trp
        115                 120                 125

Arg Trp Thr Glu Gln Leu Ala Ser Asn Tyr Trp Ile Leu Glu Tyr Leu
    130                 135                 140

Trp Lys Val Pro Phe Asp Phe Trp Arg Gly Val Ile Ser Leu Thr Pro
145                 150                 155                 160

Leu Leu Val Cys Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Glu Gln Arg Ile Val
                165                 170                 175

Met Val Phe Leu Leu Val Thr Met Ala Gly Met Ser Gln Gly
            180                 185                 190
```

<210> 2
<211> 23

<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 2

Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly
1 5 10 15

Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
20

<210> 3
<211> 69
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 3

Gly Gln Tyr Phe Leu Thr Asn Cys Cys Ala Pro Glu Asp Ile Gly Phe
1 5 10 15

Cys Leu Glu Gly Gly Cys Leu Val Ala Leu Gly Cys Thr Ile Cys Thr
20 25 30

Asp Gln Cys Trp Pro Leu Tyr Gln Ala Gly Leu Ala Val Arg Pro Gly
35 40 45

Lys Ser Ala Ala Gln Leu Val Gly Glu Leu Gly Ser Leu Tyr Gly Pro
50 55 60

Leu Ser Val Ser Ala
65

<210> 4
<211> 48
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 4

Cys Ala Val Ala Cys Glu Leu Lys Trp Glu Ser Glu Phe Trp Arg Trp
1 5 10 15

Thr Glu Gln Leu Ala Ser Asn Tyr Trp Ile Leu Glu Tyr Leu Trp Lys
20 25 30

Val Pro Phe Asp Phe Trp Arg Gly Val Ile Ser Leu Thr Pro Leu Leu
35 40 45

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 5

Gly Gln Tyr Phe Leu Thr Asn Cys Cys Ala Pro Glu Asp Ile Gly Phe
1 5 10 15

Cys Leu

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 6

Asn Cys Cys Ala Pro Glu Asp Ile Gly Phe Cys Leu Glu Gly Gly Cys
1 5 10 15

Leu Val

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 7

Ala Pro Glu Asp Ile Gly Phe Cys Leu Glu Gly Gly Cys Leu Val Ala
1 5 10 15

Leu Gly

<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 8

Phe Cys Leu Glu Gly Gly Cys Leu Val Ala Leu Gly Cys Thr Ile Cys
1 5 10 15

Thr Asp

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 9

Cys Leu Val Ala Leu Gly Cys Thr Ile Cys Thr Asp Gln Cys Trp Pro
1 5 10 15

Leu Tyr

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 10

```
Gln Ala Gly Leu Ala Val Arg Pro Gly Lys Ser Ala Ala Gln Leu Val
1               5                   10                  15

Gly Glu
```

<210> 11
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 11

```
Ala Gln Leu Val Gly Glu Leu Gly Ser Leu Tyr Gly Pro Leu Ser Val
1               5                   10                  15

Ser Ala
```

<210> 12
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 12

```
Cys Ala Val Ala Cys Glu Leu Lys Trp Glu Ser Glu Phe Trp Arg Trp
1               5                   10                  15

Thr Glu
```

<210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 13

```
Phe Trp Arg Trp Thr Glu Gln Leu Ala Ser Asn Tyr Trp Ile Leu Glu
1               5                   10                  15

Tyr Leu
```

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 14

Trp Thr Glu Gln Leu Ala Ser Asn Tyr Trp Ile Leu Glu Tyr Leu Trp
1 5 10 15

Lys Val

<210> 15
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 15

Gln Leu Ala Ser Asn Tyr Trp Ile Leu Glu Tyr Leu Trp Lys Val Pro
1 5 10 15

Phe Asp

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis GB virus C

<400> 16

Trp Lys Val Pro Phe Asp Phe Trp Arg Gly Val Ile Ser Leu Thr Pro
1 5 10 15

Leu Leu

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud:200930045

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 06.04.2009

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JUNG, S., KNAUER, O., DONHAUSER, N. et al. Inhibition of HIV strains by GB virus C in cell culture can be mediated by CD4 and CD8 T-lymphocyte derived soluble factors. AIDS. Agosto 2005, Vol. 19, Nº 12, páginas 1267-1272. ISSN 0269-9370.	1-4,10-12,17
A	JUNG, S., EICHENMÜLLER, M., DONHAUSER, N. et al. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. AIDS. Marzo 2007, Vol. 21, Nº 5, páginas 645-647. ISSN 0269-9370. <DOI:10.1097/QAD.0b013e32803277c7>	1-4,10-12,17
A	SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J., AMIGO, J. M., PUJOL, M. et al. Fluorescence study of the dynamic interaction between E1(145-162) sequence of hepatitis GB virus C and liposomes. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Junio 2009, Vol. 394, Nº 4, páginas 1003-1010. ISSN 1618-2650. <DOI: 10.1007/s00216-008-2593-8> Publicado en línea el 20.01.2009.	5-8,13,18
A	PÉREZ-LÓPEZ, S., VILA-ROMEU, N., ALSINA ESTELLER, M. A. et al. Interaction of GB virus C/ hepatitis G virus synthetic peptides with lipid langmuir monolayers and large unilamellar vesicles. The Journal of Physical Chemistry. B. 8 Enero 2009, Vol. 113, Nº 1, páginas 319-327. ISSN 1520-6106. <DOI: 10.1021/jp806938y>	6-9,18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
15.12.2010	E. Relaño Reyes	1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/10 (01.01.2006)
C07K14/18 (01.01.2006)
A61P31/18 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-18	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-18	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JUNG, S. et al. AIDS. Agosto 2005, Vol. 19, Nº 12, páginas 1267-1272.	08-2005
D02	JUNG, S. et al. AIDS. Marzo 2007, Vol. 21, Nº 5, páginas 645-647.	03-2007
D03	SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J., et al. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Junio 2009, Vol. 394, Nº 4, páginas 1003-1010.	20.01.2009
D04	PÉREZ-LÓPEZ, S. et al. The Journal of Physical Chemistry. B. 8 Enero 2009, Vol. 113, Nº 1, páginas 319-327.	08.01.2009

En D01 se anticipa el hecho de que se produce una disminución en la replicación del VIH, tanto con tropismo CCR5 como con tropismo CXCR4, en células mononucleadas periféricas (PBMC) infectadas con el virus GBV-C. Esto se confirmó con PBMC transfectadas con el ARN de cadena positiva de GBV-C, ya sea completo o con una deleción en la región NS4A y NS5B, y PBMC incubadas con sobrenadantes de células PBMC infectadas, o transfectadas con el ARN con o sin la deleción. El hecho de que el ARN con la deleción sea funcional, indica que al menos una de las proteínas E1, E2, NS2 o NS3, es responsable de la inhibición del VIH. Sin embargo, aunque se señala que todavía no se conoce el mecanismo a través del cual el GBV-C inhibe la replicación del VIH, no se destaca a E1 como posible responsable del mismo, sino que centra sus hipótesis, todavía no concluyentes, en E2.

D02 divulga un trabajo de investigación sobre la capacidad que presenta la proteína E2 de GBV-C de inhibir la replicación del VIH. Aunque está centrado en E2, comprueba que la transfección de PBMC con un ARN de GBV-C que expresa solo las proteínas E1 y E2, es capaz de inhibir la replicación del VIH. Sin embargo, en los estudios de inhibición presentados, no confiere importancia a E1.

En D03 se investigan las propiedades de un péptido que consiste en los aminoácidos del 145 al 162 de E1, y que presenta un 100% de identidad con la SEQ. ID. NO. 16 de la solicitud. Este péptido puede que actúe como péptido de fusión en el GBV-C. A pesar de que en el documento se anticipa que este virus puede que tenga actividad inhibitoria frente al VIH, no se apunta que el péptido estudiado o la proteína E1, sean los responsables de dicha actividad.

En D04 se estudia un péptido que consiste en los residuos del 53 al 66 de la proteína E1 de GBV-C. Sin embargo, no se señala ninguna relación entre E1 o dicho péptido, y la inhibición en la replicación del VIH.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud, tiene por objeto el uso de péptidos que estén contenidos en una secuencia aminoacídica con al menos un 60% de identidad con la SEQ. ID. NO. 1, y capaces de inhibir la actividad del VIH, en la fabricación de una composición farmacéutica (reivindicaciones de la 1 a la 5). Dichos péptidos pueden presentar las secuencias SEQ. ID. NO. 5-16 (reivindicaciones de la 6 a la 9). La SEQ. ID. NO. 1 corresponde a la proteína E1 del virus de la hepatitis G (GBV-C). También son objeto de la solicitud, la composición farmacéutica que comprende al menos uno de estos péptidos (reivindicaciones de la 10 a la 16) y el método de fabricación de la misma (reivindicaciones 17 y 18).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 Y 8.1 LP 11/1986)

1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 9

El objeto de la presente solicitud, de acuerdo con la reivindicación 1, es el uso de al menos un péptido contenido en una secuencia aminoacídica con al menos un 60% de identidad con respecto a la SEQ. ID. NO. 1, y capaz de inhibir el VIH-1, en la elaboración de una composición farmacéutica. La SEQ. ID. NO. 1 corresponde a la proteína E1 del virus GBV-C.

Aunque los documentos D01 y D02 realizan estudios sobre la capacidad inhibidora del GBV-C en la replicación del VIH, de ninguno de ellos se deduce que E1 pueda ser la responsable de esta actividad.

Por otro lado, ni D03 ni D04, que estudian péptidos derivados de E1, apuntan la posibilidad de que estos péptidos, o la propia E1, inhiban la replicación del VIH.

En consecuencia, ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en la reivindicación 1. Además, en dichos documentos no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por esta reivindicación. Por lo tanto, la reivindicación 1 tiene novedad y actividad inventiva.

Las reivindicaciones de la 2 a la 9, son dependientes de la reivindicación 1 y como ella también cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva.

2. REIVINDICACIONES DE LA 10 A LA 16

La reivindicación 10 tiene por objeto una composición farmacéutica que comprende un péptido, o derivado del mismo, contenido en una secuencia aminoacídica con al menos un 60% de identidad con la SEQ. ID. NO. 1 y con actividad inhibidora frente al VIH.

Dado que el uso de estos péptidos para la elaboración de una composición farmacéutica es nuevo e inventivo, la composición farmacéutica que los comprende también lo es. Así, la reivindicación 10 presenta novedad y actividad inventiva.

Las reivindicaciones de la 11 a la 16, son dependientes de la 10, y como ésta tienen novedad y actividad inventiva.

3. REIVINDICACIONES 17 Y 18.

El objeto de la presente solicitud, según las reivindicaciones 17 y 18, es un método de fabricación de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 16.

Al ser la composición nueva e inventiva, también lo es el método de fabricación. En consecuencia, las reivindicaciones 17 y 18 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva.