

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
14 de octubre de 2010 (14.10.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/116015 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 38/10 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2010/070209

(22) Fecha de presentación internacional:

5 de abril de 2010 (05.04.2010)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 200930044 6 de abril de 2009 (06.04.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **HARO VILLAR, Isabel** [ES/ES]; Instituto De Quimica Avanzada De Cataluña (iqac), Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **GÓMARA ELENA, María José** [ES/ES]; Instituto De Quimica Avanzada De Cataluña (iqac), Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Ruben Dario 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: USE OF PEPTIDES OF THE E2 PROTEIN OF THE HEPATITIS G VIRUS IN ORDER TO INHIBIT THE ACTIVITY OF THE HIV VIRUS

(54) Título : USO DE PÉPTIDOS DE LA PROTEÍNA E2 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS G PARA INHIBIR LA ACTIVIDAD DEL VIRUS VIH

(57) Abstract: The invention relates to the use of peptides of the E2 protein of the hepatitis G virus in order to inhibit the activity of the HIV virus. More specifically, the invention relates to the use of at least one peptide, or a derivative of same, contained in the sequence of the E2 protein of the hepatitis G virus (GBV-C/HGV), capable of inhibiting the activity of the HIV virus, impeding or repressing the function and/or activity of the HIV virus (human immunodeficiency virus), in a temporary or permanent manner, or additionally capable of interacting with an amino acid sequence of glycoprotein gp41 of the HIV virus, for the production of a pharmaceutical composition. Said peptide can impede the inhibition of the function of the fragment of protein gp41 of the HIV virus, impede cell fusion or impede the replication of HIV in a host cell. In addition, the invention relates to the aforementioned pharmaceutical composition and to the method for the production thereof.

(57) Resumen: Uso de péptidos de la proteína E2 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 E2 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.



WO 2010/116015 A1

**Uso de péptidos de la proteína E2 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
5 del mismo, contenido en la secuencia de la proteína E2 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
10 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
15 fabricación.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

20 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
25 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
30 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 Infect. 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. Biophys. Res. Commun. 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
- 5 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.
- 10 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.

15

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

- La presente invención se refiere al uso de al menos un péptido contenido
- 20 en la secuencia de la proteína E2 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
- 25 Inmunodeficiencia Humana), 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.
- 30 En los ejemplos de la presente invención se sintetizan 124 péptidos compuestos por 18 aminoácidos que abarcan la secuencia completa de la

proteína E2 del virus GBV-C/HGV (SEQ ID NO: 1). Dichas secuencias se solapan en 15 aminoácidos, es decir, un péptido concreto tiene tres aminoácidos diferentes respecto al péptido que le precede o que le sigue.

- 5 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
- 10 contenidos vesiculares inducida por SEQ ID NO: 2 que permiten determinar la capacidad de inhibir la función del fragmento de la proteína gp41 del virus VIH-1, 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.

15

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
- 20 consecuentemente la capacidad que presentan para mimetizar determinados sustratos o epítomos,
- 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
- 25 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
- 30 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
5 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
10 con SEQ ID NO: 1 son secuencias homólogas 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
15 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-
20 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
25 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
30 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 E2 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
5 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
10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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: 4-8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13-14 o SEQ ID NO: 15

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.

15

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 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: 4-8 (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8), SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13-14 (SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14) o SEQ ID NO: 15.

30

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: 4-5 (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5), SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15-23 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23), SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 41. La lista de péptidos que se presenta pertenece a los fragmentos SEQ ID NO: 4-8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13-14 o SEQ ID NO: 15 de la manera que se presenta en la

tabla 2.

Tabla 2. 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: 4	SEQ ID NO: 4
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 16
	SEQ ID NO: 17
	SEQ ID NO: 18
	SEQ ID NO: 19
	SEQ ID NO: 20
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 21
	SEQ ID NO: 22
	SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 35
SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 37
	SEQ ID NO: 41

SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 15
---------------	---------------

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.

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.

Una realización aún más preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica, donde la inhibición de la función de un fragmento de la proteína gp41 del virus VIH se lleva a cabo por medio de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido contenido en cualquiera de los fragmentos aminoácidos SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12-14 (es decir, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14).

Las secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12-14 son fragmentos de secuencias de aminoácidos que corresponden a la secuencia parcial de SEQ ID NO: 1. Los fragmentos están compuestos de 18 aminoácidos o más, según el caso. Así pues, a modo de ejemplo, los fragmentos que tengan 18 aminoácidos podrán contener péptidos de entre 15 y 18 aminoácidos.

Una realización todavía 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: 24-40. La lista de péptidos que se presenta pertenece a los fragmentos SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12-14 de la manera que se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Correspondencia de los péptidos implicados en la inhibición de la liberación de los contenidos vesiculares (inhibición de la función del fragmento de la proteína gp41), con los fragmentos de SEQ ID NO: 1.

Fragmento de SEQ ID NO: 1	Péptido
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 24
	SEQ ID NO: 25
SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 26
	SEQ ID NO: 27
	SEQ ID NO: 28
	SEQ ID NO: 29
	SEQ ID NO: 30
	SEQ ID NO: 31
	SEQ ID NO: 32
	SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 34
	SEQ ID NO: 35
SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 36
	SEQ ID NO: 37
	SEQ ID NO: 38
	SEQ ID NO: 39
	SEQ ID NO: 40

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 replicación del material genético de dicho virus.

- 5 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, nuevos virus o viriones. El término “virión” se refiere a la partícula viral infectiva compuesta al menos por ácido nucleico vírico y/o
- 10 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. En los ejemplos de realización de la presente invención, se valora el grado de inhibición de la
- 15 replicación del virus VIH mediante la medida de la concentración del antígeno p24 del virus VIH-1. La detección del antígeno del VIH-1, usualmente la proteína p24, es un marcador directo de la presencia del virus en el organismo.
- 20 Una realización más preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica, donde la inhibición de la replicación 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: 3-11 (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6,
- 25 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11), SEQ ID NO: 13-14 (SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14).

- Otra realización aún más preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica, donde el péptido, o cualquiera de sus combinaciones, se
- 30 selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 3-5 (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5), SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10-11 (SEQ

ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11), SEQ ID NO: 16-24 (SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24), SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 41. La lista de péptidos que se presenta pertenece a los fragmentos SEQ ID NO: 3-11, SEQ ID NO: 13-14 de la manera que se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Correspondencia de los péptidos implicados en la inhibición de la replicación, con los fragmentos de SEQ ID NO: 1.

Fragmento de SEQ ID NO: 1	Péptido
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 3
SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 4
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 16
	SEQ ID NO: 17
	SEQ ID NO: 18
	SEQ ID NO: 19
	SEQ ID NO: 20
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 21
	SEQ ID NO: 22
	SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 24
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 35
SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 37
	SEQ ID NO: 41

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 interactuar 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 cualquiera de las composiciones
5 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
10 comprende:

- a) Sintetizar al menos un péptido de la invención, o derivado del mismo, y
- b) preparar el producto obtenido en el apartado (a) en una forma
15 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.
20 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
25 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
30 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.

5

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.

20 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

30

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
5 selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 3-5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10-11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16-41.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas,
10 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.

15

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

**FIG. 1. Muestra los péptidos con capacidad de inhibir la liberación de
20 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:
25 P1 (SEQ ID NO: 42), P40 (SEQ ID NO: 43), P41 (SEQ ID NO: 44), P45 (SEQ ID NO: 21), P47 (SEQ ID NO: 22), P59 (SEQ ID NO: 24), P60 (SEQ ID NO: 25), P80 (SEQ ID NO: 26), P82 (SEQ ID NO: 28), P88-91 (SEQ ID NO: 30-33), P96 (SEQ ID NO: 34), P97 (SEQ ID NO: 35), P105-109 (SEQ ID NO: 37-41) y P124 (SEQ ID NO: 15).

30

FIG. 2. Muestra la inhibición de la fusión celular mediada por péptidos de la proteína E2 del GBV-C/HGV seleccionados como potenciales inhibidores del VIH-1.

- 5 Se muestra el porcentaje de inhibición de la fusión dependiente de la dosis de los péptidos P11 (SEQ ID NO: 4), P19-21 (SEQ ID NO: 16-18), P25 (SEQ ID NO: 20), P45 (SEQ ID NO: 21), P46 (SEQ ID NO: 22), P47 (SEQ ID NO: 23), P59 (SEQ ID NO: 24), P97 (SEQ ID NO: 35), P109 (SEQ ID NO: 41) y P124 (SEQ ID NO: 15).

10

FIG. 3. Muestra imágenes de microscopía de la inhibición de la fusión celular mediada por la proteína gp41 tras la incubación con el péptido P45.

- 15 Las células se crecen en placas de 96 pocillos donde son tratadas con: A) inhibidor C34 (1.2 μ M); B) control; C) 500 μ M P45; D) 250 μ M P45; E) 125 μ M P45 y F) 62.5 μ M P45.

FIG. 4. Muestra la actividad inhibitoria de diferentes dosis del péptido P45 de la fusión celular inducida por la proteína gp41.

20

Cada dato representa la media del porcentaje de inhibición mediado por el péptido P45 (SEQ ID NO: 21) $\pm$ error estándar (barras).

- 25 **FIG. 5. Muestra la inhibición de la infección por el HIV-1 de células CEM174 por parte de los péptidos de la proteína E2 del GBV-C.**

Se muestran los porcentajes de inhibición de la replicación del virus VIH-1 por parte de los péptidos P2, P11, P15, P19-21, P23, P25, P34, P45-47,
30 P59, P60, P67, P77, P89, P97 y P109 administrados a las dosis de 250 y 500 μ M.

EJEMPLOS

5 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
10 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.

15

EJEMPLO 1. Materiales y métodos.

20

1.1. Síntesis de los péptidos

Se han obtenido 124 péptidos de la proteína de envoltura E2 del virus GBV-C/HGV (SEQ ID NO: 1) por metodología de Síntesis de Péptidos en
25 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:

30

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-butiloxycarbonilo (Boc) para lisina y triptófano.

5

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, 25×0.46 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 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:

5

- a. Ensayo de inhibición de liberación de contenidos vesiculares inducida por la secuencia SEQ ID NO: 2 del VIH-1
- b. Ensayo de inhibición de la fusión celular
- c. Ensayos de inhibición de replicación del VIH-1

10

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).

- 15 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
- 20 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 520nm. El posible efecto lítico
- 25 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*).

30

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 co-receptores 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 μ M), 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*).

c) Ensayos de inhibición de replicación del virus VIH-1.

Para estudiar el posible papel inhibidor de los péptidos del virus GBV-C/HGV se llevó a cabo la cuantificación de la concentración del antígeno p24 del VIH en el sobrenadante del cultivo celular. Para ello, se han incubado concentraciones seriadas de los péptidos con aislados de VIH-1 de tropismo X4 y R5 durante dos horas. Los virus aislados pueden proceder de pacientes infectados. Tras el periodo de incubación se incorporaron las células CEM-174 (AIDS reagents Cat. No. 272) y se incubaron con el virus y los péptidos durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se eliminó el virus VIH-1 que aún quedaba en el medio, por lavados con tampón PBS. Finalmente, se resuspendió el pellet celular en medio de cultivo y se recogió una porción del sobrenadante celular cada 12 horas durante una semana. El ensayo de cuantificación del antígeno p24 se realizó en los sobrenadantes post-infección recogidos empleando el kit comercial *Innotest VIH antigen mAb p24* (Innogenetics Diagnostica Iberia Cat. No. 80563). Como control negativo se empleó el sobrenadante del cultivo celular en ausencia de virus y de péptidos; como control positivo de infección se empleó el sobrenadante del cultivo derivado de la incubación de las células con el virus. Finalmente, como control positivo de la inhibición, se empleó el sobrenadante procedente de la incubación de las células con el virus y el inhibidor C34 (*AIDS reagents* Cat. No 9824).

1.3. Estudio de la viabilidad celular de los péptidos del 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), inhibición de la fusión celular e

inhibición de la replicación, 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 E2 del virus GBV-C/HGV (SEQ ID NO: 1) mediante la síntesis de secuencias peptídicas compuestas de 18 aminoácidos solapadas en 15 residuos. Los 124 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 del SEQ ID NO: 2. 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.

25

En la tabla 4 se indican los péptidos que corresponden a la proteína de envuelta E2 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. En la tabla 5 se indican los resultados más relevantes en cuanto a la inhibición de la producción de antígeno p24. Asimismo se muestran los valores de

30

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%.

5

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

$$\% \text{ inhibición péptido} = 100 - \left\{ \left[\frac{\text{Lum (P)} - \text{Lum}_0}{\text{Lum}_{100} - \text{Lum}_0} \right] \times 100 \right\}$$

10

siendo:

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

15

Lum₀ = luminiscencia de las células control no fusionadas

Lum₁₀₀ = luminiscencia de las células control totalmente fusionadas

20

Para llevar a cabo el cálculo de los porcentajes de inhibición de la replicación del virus VIH-1 (inhibición producción antígeno p24) se utilizó la misma ecuación pero empleando los valores de absorbancia en lugar de luminiscencia.

25

Los estudios realizados indican que varias de las secuencias sintetizadas, pertenecientes a la proteína de envuelta E2 del virus GBV-C/HGV, disminuyen notablemente la fusión de membranas celulares y la producción del antígeno p24, lo que indica un posible efecto inhibidor de éstos péptidos frente al virus VIH-1.

30

Tabla 4. Resultados de la inhibición de la fusión celular inducida por distintos péptidos de la secuencia SEQ ID NO: 1 (proteína de envoltura

E2) del virus GBV-C/HGV a diferentes concentraciones. Se muestran los valores de inhibición alcanzados por el inhibidor control (C34).

Péptido	% inhibición (100 μ M)	% inhibición (500 μ M)	% inhibición (1000 μ M)	%inhibición C34 (1.34 μ M)
SEQ ID NO: 4	-----	57	84	78
SEQ ID NO: 5	-----	-----	88	95
SEQ ID NO: 16	-----	-----	62	92
SEQ ID NO: 17	-----	48	45	92
SEQ ID NO: 18	-----	21	59	100
SEQ ID NO: 19	-----	32	61	95
SEQ ID NO: 20	-----	64	91	97
SEQ ID NO: 7	-----	8	36	95
SEQ ID NO: 21	-----	21	48	95
SEQ ID NO: 22	39	98	96	100
SEQ ID NO: 23	13	56	70	92
SEQ ID NO: 10	-----	79	88	91
SEQ ID NO:	-----	91	90	100

30

35

SEQ ID NO:	32	70	72	90
------------	----	----	----	----

37

SEQ ID NO:	-----	-----	34	91
------------	-------	-------	----	----

41

SEQ ID NO:	20	62	68	95
------------	----	----	----	----

15

Tabla 5. Resultados de la inhibición de la producción de antígeno p24 inducida por distintos péptidos de la secuencia SEQ ID NO: 1 (proteína de envoltura E2) del virus GBV-C/HGV a diferentes concentraciones. Se muestran los valores de inhibición alcanzados por el inhibidor control (C34).

Péptido	% I (50 μM)	% I (100 μM)	% I (250 μM)	% I (500 μM)	% I C34 (1.34μM)
SEQ ID NO: 3	-----	-----	-----	98	100
SEQ ID NO: 4	-----	-----	73	96	99
SEQ ID NO: 5	-----	-----	35	98	99
SEQ ID NO: 16	-----	-----	47	45	99
SEQ ID NO: 17	-----	-----	48	100	99
SEQ ID NO: 18	67	97	95	99	97
SEQ ID NO: 19	10	96	99	100	97
SEQ ID NO: 20	-----	-----	30	100	100
SEQ ID NO: 7	-----	-----	48	100	100
SEQ ID NO: 21	-----	-----	29	96	94
SEQ ID NO: 22	75	97	98	95	98
SEQ ID NO: 23	-----	-----	42	98	94
SEQ ID NO: 24	-----	-----	-----	99	98
SEQ ID NO: 10	-----	-----	-----	94	98
SEQ ID NO: 11	-----	-----	60	100	99
SEQ ID NO: 35	-----	-----	51	98	100
SEQ ID NO: 37	-----	-----	-----	43	100
SEQ ID NO: 41	-----	-----	50	99	99

% I: % de inhibición.

EJEMPLO 3. Actividad anti-VIH-1 de los péptidos de E2 del virus GBV-C/HGV de forma dependiente de la dosis.

Se examinó el efecto de los péptidos E2 en la fusión celular en ensayos de fusión célula-célula analizando su capacidad para bloquear la formación de sincitios entre las células HeLa que expresan la proteína de envuelta del virus VIH-1 y las células TZM-bl que expresan el receptor CD4 humano CXCR4 o CCR5 en presencia de varias cantidades de cada péptido.

Los siguientes péptidos de 18 aminoácidos: P11 (SEQ ID NO: 4), P19-21 (SEQ ID NO: 16-18), P23 (SEQ ID NO: 19), P25 (SEQ ID NO: 20), P45-47 (SEQ ID NO: 21-23), P59 (SEQ ID NO: 24), P97 (SEQ ID NO: 35), P109 (SEQ ID NO: 41) y P124 (SEQ ID NO: 15) inhibieron la fusión celular célula-célula inducida por la proteína gp41 de forma dependiente de la dosis, mostrando valores de IC₅₀ entre 142 y 832.9 μ M (FIG. 2 y FIG. 5 en el día 7 después de la infección). Como control positivo se usaron péptidos C34 (IC₅₀=0.023 μ M; 95% CI=0.021-0.025). En las figuras 3 y 4 se puede observar cómo el péptido p45 inhibe la formación de sincitios de una forma dependiente de la dosis.

Tabla 3. Actividad inhibitoria de la fusión celular mediada por la proteína gp41 por parte de los péptidos E2.

Péptido	Residuo nº.^a	Secuencia	IC₅₀^b (μM)	95% CI^c
P11	31-48	SEQ ID NO: 4	439.7	(361.4 - 535.0)
P19	55-72	SEQ ID NO: 16	369.5	(314.8 - 433.7)
P20	58-75	SEQ ID NO: 17	347.6	(305.1 - 396.0)
P21	61-78	SEQ ID NO: 18	832.9	(754.5 - 919.4)
P23	67-84	SEQ ID NO: 19	508.8	(496.9 - 520.9)
P25	73-90	SEQ ID NO: 20	304.4	(260.9 - 355.3)

P45	153-170	SEQ ID NO: 21	141.2	(129.1 - 154.4)
P46	156-173	SEQ ID NO: 22	428.8	(373.1 - 429.7)
P47	159-176	SEQ ID NO: 23	330.8	(277.4 - 394.5)
P59	195-212	SEQ ID NO: 24	529.6	(514.0 - 545.8)
P97	289-306	SEQ ID NO: 35	537.6	(476.9 - 606.0)
P109	325-342	SEQ ID NO: 41	687.1	(616.3 - 766.1)
P124	370-387	SEQ ID NO: 15	332.7	(265.4 - 417.1)

^a El número del residuo corresponde a su posición en la proteína E2 (U45966_usa) del GBV-C.

^b IC_{50} : concentración de péptido causante del 50% de inhibición de la fusión celular (μ M)

Las FIG. 2 y 5 y la tabla 4 muestran la inhibición dependiente de la dosis de los péptidos P2 (SEQ ID NO: 3), P11 (SEQ ID NO: 4), P15 (SEQ ID NO: 5), P19-21 (SEQ ID NO: 16-18), P23 (SEQ ID NO: 19), P25 (SEQ ID NO: 20), P34 (SEQ ID NO: 7), P45-47 (SEQ ID NO: 21-23), P59 (SEQ ID NO: 24), P60 (SEQ ID NO: 25), P67 (SEQ ID NO: 10), P77 (SEQ ID NO: 11), P89 (SEQ ID NO: 81), P109 (SEQ ID NO: 41) y P124 (SEQ ID NO: 15). El efecto inhibitorio fue diferencialmente eficiente entre las cepas X4 y R5. El IC_{50} obtenido por los péptidos P11, P19, P20 y P21 para VIH-1HXB2 fue $< VIH-169/7 < VIH-1BaL$; No obstante, el IC_{50} obtenido para los péptidos P34, P45, P46, P47 y P109 para VIH-169/7 fue $< VIH-1HXB2 < VIH-1BaL$. En general, todos los péptidos analizados mostraron un log IC_{50} mayor para el virus R5 que para el virus X4 o R5X4 DM (Tabla 4).

Tabla 4. Susceptibilidades fenotípicas del HIV-1 a los péptidos E2 en células TZM-bl.

	HXB2		BAL		69-7 ^a	
Péptido	IC_{50}^b	95% CI ^c	IC_{50}	95% CI	IC_{50}	95% CI

P11	162.1 ^d	(125.3 - 209.7)	484.5	(441.6- 531.5)	208.8	(178.8 - 243.9)
P19	46.0	(34.5 - 61.2)	194.3	(171.2- 220.5)	71.4	(64.7 – 78.7)
P20	70.1	(60.5 - 81.2)	125.5	(124.4- 126.7)	111.1 ^d	(104.8- 117.7)
P21	44.9	(36.8 - 54.7)	529.1	(427.3- 655.2)	371.1 ^d	(326.4- 421.9)
P34	237.4	(191.3- 294.6)	411.2	(373.5- 452.7)	118.6	(111.6– 126.0)
P45	48.8 ^d	(42.3 - 56.2)	505.5	(501.3- 509.8)	43.7	(38.4 - 49.7)
P46	39.9 ^d	(34.7 - 45.8)	462.8	(438.7- 488.2)	24.1	(22.0 - 26.5)
P47	58.6 ^d	(50.6 - 67.8)	140.3	(125.9- 156.4)	20.1	(18.1 - 22.2)
P109	37.5	(31.8 - 44.3)	294.8 ^d	(259.2- 335.3)	60.8	(55.1 - 67.1)
P124	-	-	94.7	(79.9 – 112.3)	-	-
C34	n.d.		0.012	(0.010– 0.013)	n.d.	
T20	n.d.		0.021	(0.019– 0.022)	n.d.	
Anfoterici na B	0.175	(0.167- 0.185)	0.136	(0.129– 0.145)	n.d.	

^a Un replicado para cada péptido en este ensayo

^b IC₅₀: concentración μ M de péptido causante del 50% de inhibición de la infección, obtenido a partir de dos experimentos independientes

^c 95% CI: 95% Intervalo de Confianza de IC₅₀

^d Modelo matemático lineal, no sigmoidal

n.d.: no determinado

El péptido P124 fue efectivo solamente para la cepa vírica VIH-1BaL. Nuevos experimentos llevados a cabo en células TZM-bl donde los péptidos fueron incubados con la célula durante dos horas antes de la adsorción del virus, no previnieron la prevención de la infección viral. También fue observado el efecto inhibitorio de la infección de las células PBMCs por medio de los péptidos P11, P19-P21, P34, P45, P46, P47, P109 y P124. En este caso, el análisis cualitativo de la producción de antígeno p24 producido en estos cultivos celulares mostraron: 1) que las concentraciones hasta que la concentración del virus fue indetectable fue menor que el IC50 observado en los cultivos celulares TZM-bl, 2) que esas concentraciones fueron menores en VIH-1HXB2 (R4) que en VIH-1BaL (R5), y 3) que los péptidos P19-P21, P45-P47 y P109 fueron más eficientes para inhibir el virus que los péptidos P11 y P34 (Tabla 5).

15

Tabla 5. Concentraciones de los péptidos E2 (μ M) por encima de las cuales no se detectó infección de los PBMCs por el VIH-1 (tras 7 días de cultivo celular y posterior análisis cualitativo del antígeno p24).

Péptido	HXB2	BAL
P11 (SEQ ID NO: 4)	31.2	62.5
P19 (SEQ ID NO: 16)	15.6	15.6
P20 (SEQ ID NO: 17)	7.8	15.6
P21 (SEQ ID NO: 18)	3.9	62.5
P34 (SEQ ID NO: 7)	31.2	62.5
P45 (SEQ ID NO: 21)	7.8	31.2
P46 (SEQ ID NO: 22)	7.8	7.8
P47 (SEQ ID NO: 23)	7.8	15.6
P109 (SEQ ID NO: 41)	7.8	15.6

P124 (SEQ ID NO: 15) 62.5

7.8

En definitiva, en este ejemplo se demuestra cómo la interacción de los péptidos ensayados interfiere con el virus VIH-1, concretamente en la interacción péptido-vesícula, produciendo una notable reducción de la fusión celular interfiriendo con la infectividad del virus VIH-1 de una forma dependiente de la dosis.

3.1. Ensayo de inhibición de la fusión celular.

Se usaron dos líneas celulares: HeLa-env que expresa la proteína de envuelta del virus VIH-1 y que incluye el promotor LTR en su genoma, y la línea celular TZM-bl (*AIDS reagents* Cat. No 8129), que expresa el receptor de membrana CD4 de linfocitos y los correceptores CCR5 y CXCR4 e incluye los genes de la luciferasa y β -galactosidasa en su genoma.

Dichas líneas celulares fueron cultivadas en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) conteniendo L-Glutamina y piruvato de sodio suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor, 100 μ g/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37°C en una atmósfera con un 5% CO₂. Cuando los dos tipos celulares son co-cultivados, la fusión de las membranas tiene lugar y la luciferasa se activa produciendo la oxidación de la luciferina. El nivel de oxiluciferina fue cuantificado usando el kit Britelite (Perkin Elmer) y SpectraMax M5 *microplate reader*.

La prueba de inhibición de la unión celular inducida por los péptidos E2 consistió en la incubación de 2,500 células/pocillo de HeLa-env (*Nunc Cat.*

plates No 136101) durante 1 hora con diluciones seriales (5-1000 μ M) de los péptidos, seguidos por la adición de alrededor de 25,000 células TZM-bl/pocillo e incubados durante 24 horas.

- 5 Para el control de la unión celular, pocillos sin péptidos fueron reservados y se usó el inhibidor C-34 (*AIDS reagents* Cat. No 9824), como control positivo. El nivel de inhibición de la unión celular también fue observado al microscopio por la formación de sincitios.

10 3.2. Ensayo de inhibición de la infección del virus VIH-1.

3.2.1. Ensayo de susceptibilidad en las células TZM-bl

- El set de péptidos con capacidad potencial para la inhibición del virus VIH-1 demostrada por ensayos biofísicos y los ensayos de fusión célula-célula, fueron investigados con mayor profundidad en un ensayo de susceptibilidad con células TZM-bl y se demostró la dependencia de la inhibición de la dosis de péptido suministrada. Brevemente, triplicados de 2 concentraciones seriales por cada péptido (0 - 500 μ M) fueron preincubadas a lo largo de un volumen predeterminado de cada cepa VIH-1BaL (Tropismo R5, *AIDS Reagent*) o VIH-1HXB2 (tropismo R4, obtenido de pHXB2) o un aislado primario de VIH-1 llamado 69/7 (R5X4 dual o tropismo mezclado DM, aislado de un paciente infectado con VIH-1), en un volumen final de 100 μ L/pocillo de DMEM con 10% FBS en placas de 96 pocillos, durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. Además, 2 concentraciones seriales de T-20 (*AIDS Reagent*, # 9409) o C34 o Amfotericina B (*Bristol-Myers Squibb*, SL) fueron usadas en una inhibición dependiente de la dosis como control del ensayo. Posteriormente, 100 μ L de medio celular conteniendo 15,000 células TZM-bl fueron añadidas a cada pocillo. En estas condiciones, la m.o.i. (de las siglas en inglés *multiplicity of infection*) final de cada cepa viral fue 0.02 para VIH-1BaL y 0.01 para VIH-1HXB2 y

HIV-169/7, respectivamente. Cada TZM-bl infectada por VIH-1 sin péptidos fue analizada por triplicado, al igual que para los controles positivos y negativos. Después de 72 horas tras la infección, el sobrenadante de cada pocillo fue eliminado y, fueron añadidos 50 μ L de buffer de lisis (0.1% Triton X-100, 10mM MgCl₂, 0,5 mM ditioneitol, DTT, en buffer fosfato) junto con 50 μ L de 1.5mM de CPRG. la actividad β -galactosidasa fue analizada por espectrofotometría (570 nm, *SpectraMax M5 microplate reader*). La densidad óptica obtenida fue transformada en porcentaje de inhibición y las curvas sigmoidales fueron analizadas por regresión no lineal (*prism Graph pad software v.5*). En paralelo, el efecto de la toxicidad en las células TZM-bl de la concentración de cada péptido fue analizado usando el ensayo MTT descrito más adelante. Una modificación de este procedimiento fue analizado para descartar si el efecto inhibitorio de los péptidos era debido a la interacción directa con el receptor o correceptor de la entrada viral. En este caso, las células TZM-bl fueron incubadas con los péptidos, durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂, y lavadas 3 veces con PBS antes de llevar a cabo la adsorción viral durante 2 horas. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces e incubadas durante 72 horas en la ausencia de péptidos y analizadas como ha sido descrito más arriba.

3.2.2. Ensayo de susceptibilidad en las células PBMCs

Se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la susceptibilidad del virus VIH-1 basado en el antígeno p24 de VIH-1. Dicho análisis se llevó a cabo infectando células PBMCs con VIH-1HXB2 y VIH-1BaL, para confirmar el efecto inhibitorio del virus VIH-1 de los péptidos de la presente invención. Las células PBMCs fueron obtenidas de capas de leucocitos de donantes sanos por medio de gradiente de centrifugación (ACCUSPIN *System-Histopaque-1077*, *Sigma Diagnostics*) y activados con 5 μ g/mL de fitohemaglutinina (PHA, *Sigma-Aldrich*) en medio RPMI-1640 (Lonza-

BioWithaker) y 10% de FBS, durante 24 a 72 horas antes de la infección viral.

Concentraciones serieles de péptidos fueron preparadas (0 -125 μ M) en
5 medio RPMI-1640 complementado con 10% de FBS y 10 U/mL de interleukina-2 recombinante (rIL-2, *Roche Diagnostic Systems*) y preincubadas con un volumen predeterminado de VIH-1HXB2 o VIH-1BaL, durante 2 horas a 37°C y 5% of CO₂. Posteriormente, $8 \cdot 10^5$ células PBMCs activadas fueron añadidas e incubadas durante 2 horas
10 adicionales para conseguir la adsorción viral. Finalmente las células infectadas fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 7 días, junto con la correspondiente concentración de péptido, en placas de 96 pocillos conteniendo $200 \cdot 10^3$ células PBMC en 200 μ L de RPMI-1640, 20% de FBS y 10 U/mL de rIL-2 en ausencia de péptidos. El m.o.i. final para
15 cada cepa viral fue 0.001. La liberación de los virus fue analizada por ELISA VIH-1 p24 y ELISA Antigen-HIV-1 p24 (Ag HIV, *Innogenetics* # K1048).

3.3. Ensayo de viabilidad celular MTT.

20

La toxicidad celular de los péptidos E2 fue analizada en HeLa, TZM-bl y PBMCs usando un ensayo (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Las células fueron cultivadas con DMEM (15.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos e incubadas con diluciones
25 seriadas de cada péptido a 37°C durante 72 h. Posteriormente, fue añadido MTT hasta una concentración final de 7.5 mg/mL e incubado durante 2 h a 37°C. El medio fue eliminado y se añadieron

100 μ L of DMSO para disolver el precipitado de formazan. La absorbancia
30 fue medida a 570 nm después de 45 minutos. La viabilidad celular fue determinada mediante el cociente entre el valor de absorbancia de las

células tratadas y las células no tratadas. La concentración citotóxica (CC50) fue analizada por regresión no-lineal.

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 dicho péptido además es capaz de interaccionar con un fragmento de la proteína gp41 del virus VIH.
5. Uso de al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el virus VIH es del tipo VIH-1.
6. Uso de al menos un péptido según la reivindicación 5, donde el fragmento de la proteína gp41 es la secuencia SEQ ID NO: 2 del virus VIH-1.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el péptido tiene entre 15 y 20 aminoácidos.

8. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la inhibición de la actividad del virus VIH se produce por impedir la entrada del material genético del mismo en la célula huésped.
- 5
9. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 8, donde la entrada del material genético a la célula huésped se impide por la inhibición de la fusión celular.
- 10
10. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 9, 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: 4-8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13-14 o SEQ ID NO: 15.
- 15
11. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 10, donde el péptido, o cualquiera de sus combinaciones, se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 4-5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15-23, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 o SEQ
- 20
- ID NO: 41.
12. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 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.
- 25
13. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde la inhibición de la función de un fragmento de la proteína gp41 del virus VIH se lleva a cabo por medio de una composición
- 30
- farmacéutica que comprende al menos un péptido contenido en

cualquiera de los fragmentos aminoacídicos SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12-14.

- 5 14. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 13, donde el péptido, o cualquiera de sus combinaciones, se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 24-40.
- 10 15. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la inhibición de la actividad del virus VIH se produce por inhibir la replicación del material genético del virus.
- 15 16. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 15, donde la inhibición de la replicación 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: 3-11, SEQ ID NO: 13-14.
- 20 17. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 16 donde el péptido, o cualquiera de sus combinaciones, se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 3-5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10-11, SEQ ID NO: 16-24, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 41.
- 25 18. 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.

19. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, donde la secuencia aminoacídica tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1.
- 5 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1.
- 10 21. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde además al menos un péptido, o derivado del mismo, es capaz de interaccionar con un fragmento de la proteína gp41 del virus VIH.
- 15 22. Composición farmacéutica según la reivindicación 21, donde el fragmento de la proteína gp41 es la secuencia SEQ ID NO: 2 del virus VIH-1.
23. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, donde el péptido tiene entre 15 y 20 aminoácidos.
- 20 24. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, que además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25 25. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, que además comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
26. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, que además comprende otra sustancia activa.
- 30 27. Método para la fabricación de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26 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.

5

28. Método para la fabricación de la composición farmacéutica según la reivindicación 27, donde el péptido se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 3-5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10-11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16-41.

10

15

20

25

30

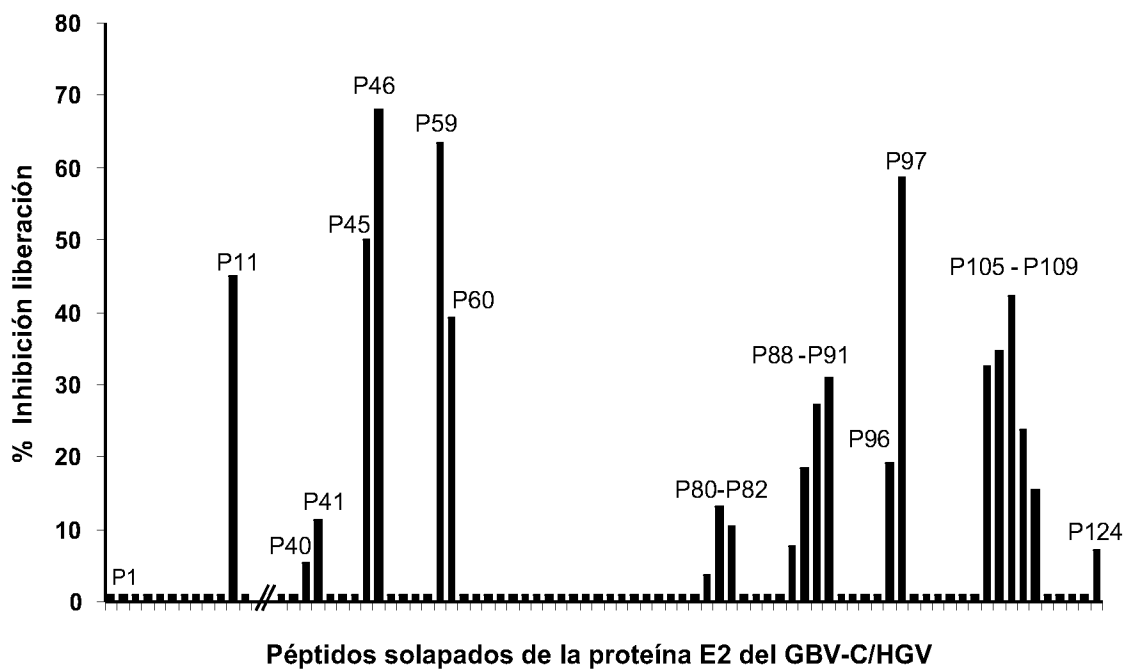


FIG. 1

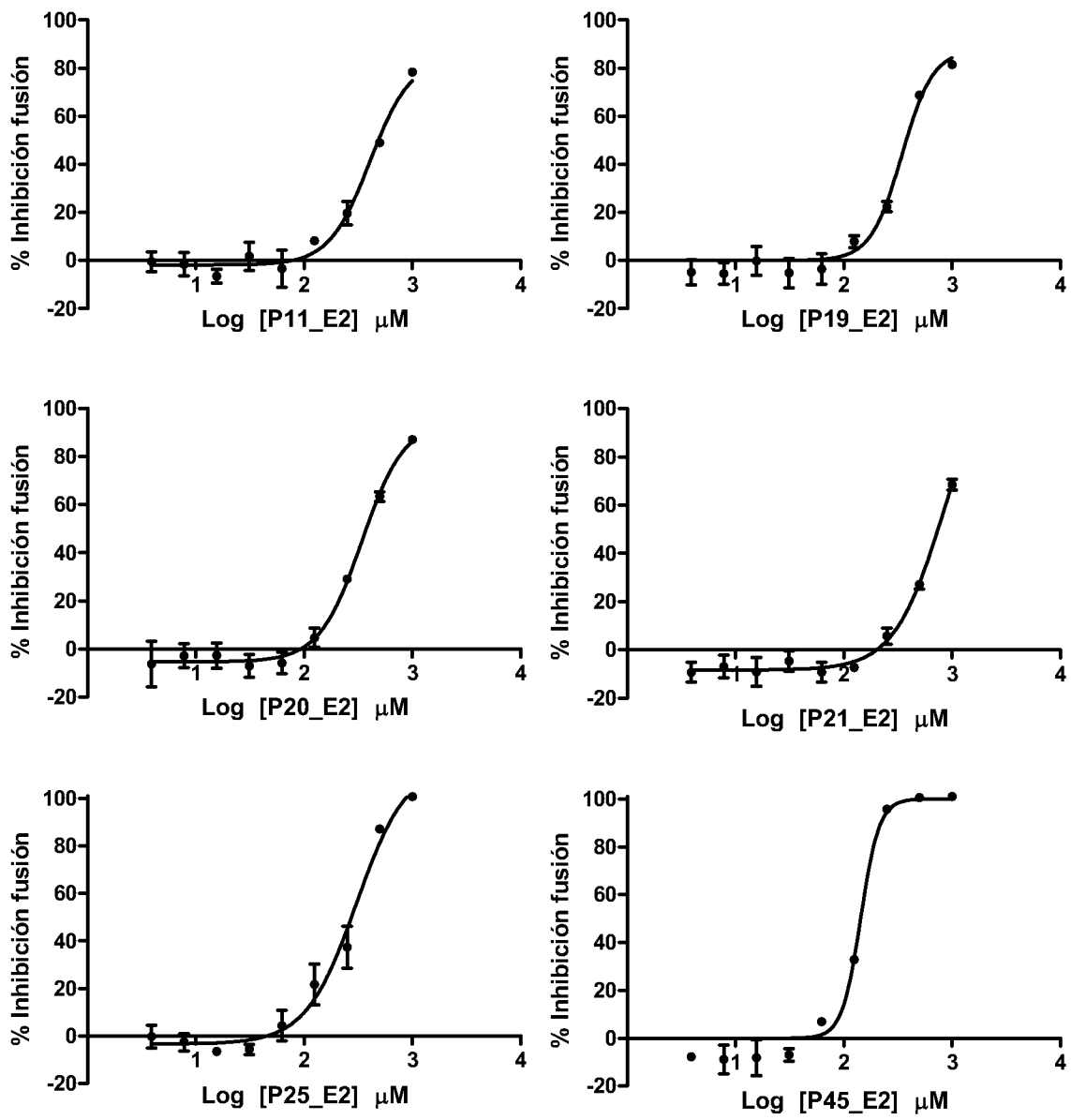


FIG. 2

3/5

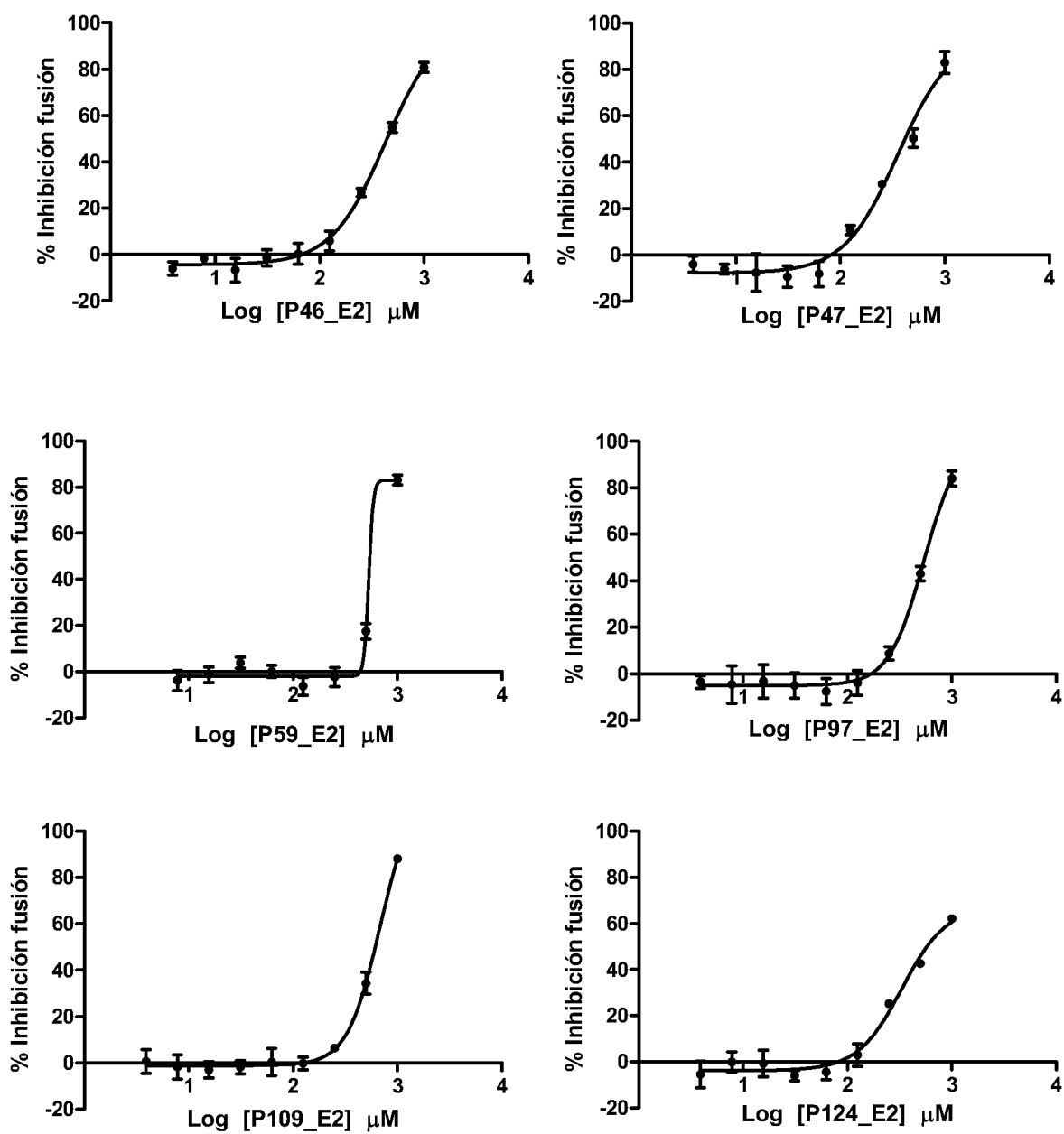


FIG. 2 (Cont.)

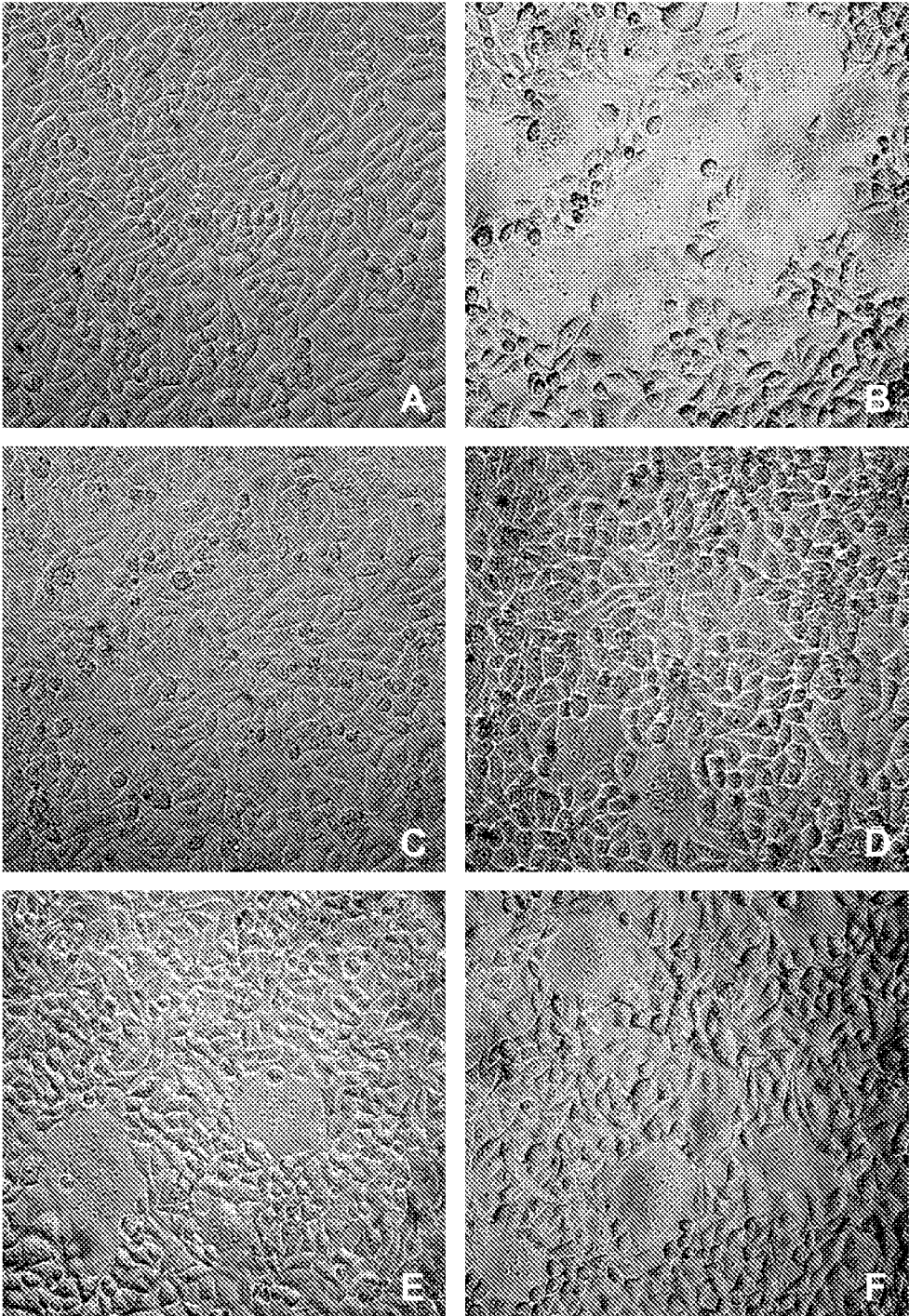


FIG. 3

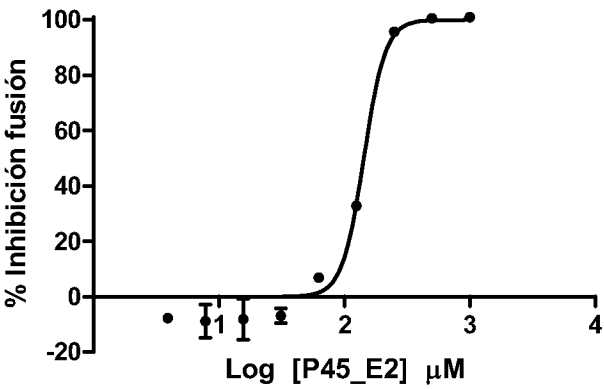


FIG. 4

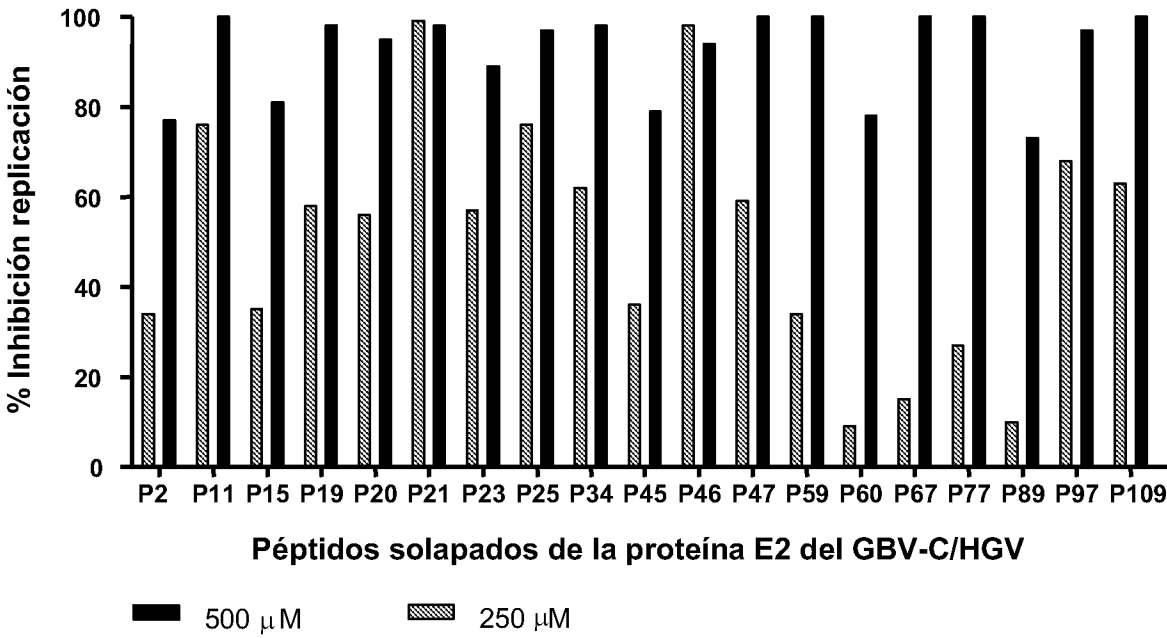


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/070209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	HERRERA, E., GOMARA , M. J. MAZZINI, S. et al. Synthetic peptides of hepatitis G virus (GBV-C/HGV) in the selection of putative peptide inhibitors of the HIV-1 fusion peptide. The Journal of Physical Chemistry. B. May, 2009, Vol. 113, N° 20, pages 7383-7391. ISSN 1520-6106.	1-3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 16-20, 23-28
X	JUNG, S., EICHENMÜLLER, M., DONHAUSER, N. et al. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. AIDS. March 2007, Vol. 21, N° 5, pages 645-647. ISSN 0269-9370. <DOI:10.1097/QAD.0b013e32803277c7>	1-3, 5, 7, 18-20, 23- 27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29.June.2010 (24.06.2010)

Date of mailing of the international search report

(01/07/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

E. Relaño Reyes

Telephone No. +34 91 349 85 04

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070209

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUNG, S., MUELLER, R., EICHENMULLER, M. et al Unknown HIV entry inhibitor induced by GBV-C E2-Fc fusion protein. 4th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Sydney, July 2007. Abstract N° MOPEA087. [online][retrieved on 23.06.2010] Retrieved from Internet: < http://www.aegis.com/conferences/iashivpt/2007/MOPEA087.pdf >	1-3, 5, 7, 18-20, 23-27
X	JUNG, S., EICHENMUELLER, M., DONHAUSER, N. et al. HIV replication is inhibited by the GB virus C envelope glycoprotein E2. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Colorado, February 2006. Abstract N° 282. [online][retrieved on 23.06.2010] Retrieved from Internet: < http://www.aegis.com/conferences/croi/2006/282.html >	1-3, 5, 7, 18-20, 23-27
X	NATTERMANN, J., NISCHALKE, H.-D., KUPFER, B. et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. AIDS. July 2003, Vol. 17, N° 10, pages 1457-1462. ISSN 0269-9370. <DOI:10.1097/00002030-200307040-00006>	1-3, 5, 7, 18-20, 23-27
A	FERNÁNDEZ-VIDAL, M., ROJO, N., HERRERA, E. et al. Liposome destabilization induced by synthetic lipopeptides corresponding to envelope and non-structural domains of GBV-C/HGV virus. Conformational requirements for leakage. Biophysical Chemistry. October 2008, Vol. 132, N° 1, pages 55-63. ISSN 0301-4622. <DOI:10.1016/j.bpc.2007.10.009>	7, 10, 11, 16, 17, 23, 28
A	LARIOS, C., CASAS, J., ALSINA, M. A., et al. Characterization of a putative fusogenic sequence in the E2 hepatitis G virus protein. Archives of Biochemistry and Biophysics. October 2005, Vol. 442, N° 2, pages 149-159. ISSN 0003-9861. <DOI: 10.1016/j.abb.2005.06.027>	7, 13, 14, 23, 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070209

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 4, 6, 8, 9, 12, 15, 21, 22
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 4, 6, 21 and 22. The action mechanism defined in these claims does not allow a person skilled in the art to determine the technical features needed to realise the subject matter of these claims.

Claims 8, 9, 12 and 15 are unclear, since they do not define the use of the pharmaceutical composition

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/070209

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2010/070209

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones N°s: 4, 6, 8, 9, 12, 15, 21, 22
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
Reivindicaciones 4, 6, 21 y 22. El mecanismo de acción definido en estas reivindicaciones, no permite al experto en la materia determinar qué características técnicas son necesarias para conseguir el objeto de las mismas.
Las reivindicaciones 8, 9, 12 y 15 no son claras, ya que no alcanzan a definir el uso de la composición farmacéutica.
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podríán serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2010/070209

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
P,X	HERRERA, E., GOMARA , M. J. MAZZINI, S. et al. Synthetic peptides of hepatitis G virus (GBV-C/HGV) in the selection of putative peptide inhibitors of the HIV-1 fusion peptide. The Journal of Physical Chemistry. B. Mayo, 2009, Vol. 113, N° 20, páginas 7383-7391. ISSN 1520-6106.	1-3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 16-20, 23-28
X	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, N° 5, páginas 645-647. ISSN 0269-9370. <DOI:10.1097/QAD.0b013e32803277c7>	1-3, 5, 7, 18-20, 23-27

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

29.Junio.2010 (24.06.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

01-JULIO-2010 (01/07/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

N° de teléfono +34 91 349 85 04

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2010/070209

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	JUNG, S., MUELLER, R., EICHENMULLER, M. et al Unknown HIV entry inhibitor induced by GBV-C E2-Fc fusion protein. 4th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Sydney, Julio 2007. Resumen N° MOPEA087. [en línea][recuperado el 23.06.2010] Recuperado de Internet:< http://www.aegis.com/conferences/iashivpt/2007/MOPEA087.pdf >	1-3, 5, 7, 18-20, 23-27
X	JUNG, S., EICHENMUELLER, M., DONHAUSER, N. et al. HIV replication is inhibited by the GB virus C envelope glycoprotein E2. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Colorado, Febrero 2006. Resumen N° 282. [en línea][recuperado el 23.06.2010] Recuperado de Internet: < http://www.aegis.com/conferences/croi/2006/282.html >	1-3, 5, 7, 18-20, 23-27
X	NATTERMANN, J., NISCHALKE, H.-D., KUPFER, B. et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. AIDS. Julio 2003, Vol. 17, N° 10, páginas 1457-1462. ISSN 0269-9370. <DOI:10.1097/00002030-200307040-00006>	1-3, 5, 7, 18-20, 23-27
A	FERNÁNDEZ-VIDAL, M., ROJO, N., HERRERA, E. et al. Liposome destabilization induced by synthetic lipopeptides corresponding to envelope and non-structural domains of GBV-C/HGV virus. Conformational requirements for leakage. Biophysical Chemistry. Octubre 2008, Vol. 132, N° 1, páginas 55-63. ISSN 0301-4622. <DOI:10.1016/j.bpc.2007.10.009>	7, 10, 11, 16, 17, 23, 28
A	LARIOS, C., CASAS, J., ALSINA, M. A., et al. Characterization of a putative fusogenic sequence in the E2 hepatitis G virus protein. Archives of Biochemistry and Biophysics. Octubre 2005, Vol. 442, N° 2, páginas 149-159. ISSN 0003-9861. <DOI: 10.1016/j.abb.2005.06.027>	7, 13, 14, 23, 28

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)