

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 078**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/745** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04806160 .0**  
96 Fecha de presentación: **17.12.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1709075**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **Tratamiento de infecciones virales**

30 Prioridad:  
**17.12.2003 GB 0329254**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.10.2012**

73 Titular/es:  
**A12 LIMITED (100.0%)  
MANCHESTER INCUBATOR BUILDING GRAFTON  
STREET  
MANCHESTER M13 9XX, GB**

72 Inventor/es:  
**DOBSON, CURTIS**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 389 078 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Tratamiento de infecciones virales

La presente invención se refiere a polipéptidos y a ácidos nucleicos que los codifican con actividad antiviral. La invención también proporciona el uso de tales polipéptidos o ácidos nucleicos como medicamentos.

- 5 Los agentes antivirales pueden dirigirse a uno de seis estadios del ciclo de replicación viral, siendo estos: 1. unión del virus con la célula; 2. penetración (o fusión de la membrana viral con la membrana celular); 3. ningún recubrimiento del virus; 4. replicación de los ácidos nucleicos virales; 5. maduración de partículas de virus de progenie; y 6. liberación del virus de progenie en fluidos extracelulares.

- 10 De estos seis estadios, la replicación (estadio 4 anterior) es el objeto, que es influenciado de la forma más efectiva por terapias antivirales convencionales. Sin embargo, la unión del virus con la célula es, sin duda, un objetivo más atractivo, dado que el agente no necesita pasar a la célula huésped. Sin embargo, sigue siendo un área en la que se han desarrollado pocas terapias exitosas.

Por ello, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar agentes terapéuticos que modulen la unión viral con las células.

- 15 Las lipoproteínas (LPs) son complejos macromoleculares globulares presentes en suero y otros fluidos extracelulares, que consisten en lípidos y proteínas y están implicadas en el transporte de lípidos alrededor del organismo. Fueron categorizadas de acuerdo con su densidad, siendo las clases principales la lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Sus proteínas se mencionan como apolipoproteínas, y se ha descrito una cantidad de ellas, incluyendo apolipoproteínas A, B, C, D, E, F, G, H y J. Además, se han documentado varios subtipos de apolipoproteínas A, B y C.

- 20 Se han descrito diversas interacciones que ligan las LPs con virus. Éstas principalmente implican la unión de los virus con lipoproteínas, lo cual da como resultado una menor ineffectividad viral o, por el contrario, provee un método de transporte para que el virus ingrese en las células. Adicionalmente, diversos virus hacen uso de receptores celulares para LPs (por ejemplo, el receptor de LDL) como un medio de entrar en las células, a pesar de que estos receptores también pueden ser liberados por células como agentes antivirales endógenos (por ejemplo, una forma soluble del receptor de VLDL es liberada en medio de cultivo por células HeLa e inhibe la infección por rinovirus humano). Por otra parte, también se informó de la unión directa entre ciertas apolipoproteínas y proteínas virales. Por ejemplo: a. la proteína nuclear de virus de hepatitis C se une con la apolipoproteína AII; b. el antígeno de superficie del virus de hepatitis B se une con la apolipoproteína H; y c. la proteína gp32 del virus de inmunodeficiencia de simio (SIV) y la proteína gp41 del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) se une con la apolipoproteína A1.

- 25 El trabajo realizado en el laboratorio del inventor mostró que la presencia de virus herpes simplex latente de tipo 1 (HSV1) en el cerebro y la posición de un alelo particular de un gen específico —el alelo APOE-e4 del gen APOE— aumenta el riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (AD). Tomados con el hallazgo adicional de que los portadores de APOE-e4 sufren más probablemente de herpes en la boca (que son lesiones halladas después de la reactivación de HSV1 en el sistema nervioso periférico), estos resultados sugirieron que es más probable que los portadores de APOE-e4 padezcan de un daño por infecciones de HSV1 y sugieren que puede haber interacciones entre la apolipoproteína E y ciertos virus (a pesar de que estas interacciones no necesariamente incluyen efectos antivirales). Un posible modo de interacción entre HSV1 y apoE se refiere a los hallazgos independientes de que los dos utilizan moléculas de proteoglicano de sulfato de heparano celular (HSPG) como su sitio inicial de unión con células, antes de la posterior unión con receptores secundarios que aumenta la posibilidad de que se produzca esa competencia en estos sitios de HSPG entre HSV1 y apoE con LPs, lo cual podría afectar la entrada viral.

- 35 Se mostró que la apolipoproteína E tiene efectos sobre el sistema inmune (aparentemente, sin relación con su papel en el metabolismo de los lípidos) incluyendo la supresión de la proliferación de linfocitos T. Se han examinado las interacciones entre una cantidad de péptidos derivados de los residuos 130-169 de apoE con linfocitos (Clay et al., Biochemistry, 34: 11142-11151 (1995)). Se pronostica que la región que consiste en residuos apoB 141-149 es particularmente importante. Se han descrito similares interacciones de tales péptidos en líneas celulares neuronales.

- 40 El documento WO 94/04177 revela que la administración de partículas que contienen péptidos helicoidales lipídicos y anfipáticos permite la *clearance* de toxinas producida por microorganismos y puede incrementar la efectividad de fármacos antibacterianos por medio de un efecto sobre las membranas bacterianas. Sin embargo, no se sugiere que este péptido derivado de apoA que contiene partículas se pueda usar como medicamentos antivirales. Tampoco queda claro si la administración de los péptidos en partículas que es un componente clave del desarrollo revelado (si las partículas se forman antes de la administración o de forma endógena) daría como resultado la utilización efectiva de cualquier acción antiviral de cualquier componente de la partícula.

- 55 Se mostró que un péptido helicoidal anfipático derivado de apoA (descrito por Ananatharamiah en Meth. Enz., 128: 627-647 (1986)) previene la fusión de membranas virales con membranas celulares y, por otra parte, previene la fusión de membranas de células infectadas (Srinivas et al. J. Cellular Biochem., 45: 224-237 (1991)). El péptido

también era efectivo en la prevención de la fusión tanto para HSV1 como para HIV (Owens et al., J Clin. Invest., 86: 1142-1150 (1990)). Sin embargo, el péptido no tuvo ningún efecto sobre la unión de HSV1 al menos con las células (Srinivas et al. supra).

5 Azuma et al. informaron que los derivados peptídicos de apoB tienen una fuerte acción antibacteriana, comparable con la de la gentamicina (Peptides, 21: 327-330 (2000)). ApoB 133-162 fue el más efectivo, donde apoE 134-155 tenía un efecto menor.

Owens et al. (1990, J. Clin Invest Vol 86(4) p1142-1150) revela que la apolipoproteína A-1 y sus análogos peptídicos helicoidales anfipáticos inhiben la formación del sincicio inducido por HIV. Itzhaki et al. (1998, Nature Medicine Vol 4(12) p1344) trata interacciones entre Apo E y virus. Corder et al. (1998, Nature Medicine Vol 4(10) p1182-1184) revela que los sujetos infectados con HIV con el alelo E4 para ApoE tienen demencia en exceso y neuropatía periférica.

15 A la luz de la investigación descrita con anterioridad, el inventor realizó experimentos para evaluar si los péptidos derivados de ApoE (que son capaces de formar hélices) tienen una actividad antiviral o no. Halló que una repetición en tándem de un fragmento peptídico de ApoE, apoE<sub>141-149</sub> (es decir, 2x LRKLRKRL - SEQ ID No. 1), tenía de hecho una acción antiviral. Si bien el inventor no desea estar ligado a ninguna hipótesis, cree que este fragmento evita la unión de partículas virales a las células, dando como resultado una reducción de la infectividad de los virus medida por medio de una técnica de ensayo de reducción de placas. El Ejemplo 1 ilustra cómo el péptido es efectivo contra virus tales como HSV1, HSV2 y HIV. Conforme a ello, este péptido puede ser efectivo cuando se aplica a virus directamente o cuando se aplica a virus en presencia de células y, por ello, el péptido se puede usar para inactivar partículas sin virus hasta que alcancen sus células objeto.

A la luz de los datos generados para una repetición en tándem de apoE<sub>141-149</sub> (es decir, 2x LRKLRKRL - SEQ ID No. 1), los inventores decidieron investigar otros fragmentos de apolipoproteínas respecto de la actividad antiviral.

25 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido de SEQ ID No. 2 o una de sus truncaciones, en donde uno o varios de los residuos de leucina (L) de SEQ ID No. 2 están reemplazados por triptófano (W), arginina (R) o lisina (K); en donde el polipéptido o una de sus truncaciones comprende 14-18 aminoácidos; y en donde el polipéptido tiene actividad antiviral.

30 Por "una repetición en tándem de apoE<sub>141-149</sub> de SEQ ID No. 2" se entiende el péptido con la secuencia de aminoácidos: LRKLRKRLLRKLRKRL. La repetición en tándem se menciona en la presente como apoE<sub>141-149dp</sub> o apoE<sub>141-149r</sub>. A este péptido también se le asigna el código GIN 1 o GIN1p (en donde p significa protección N terminal (por ejemplo, por un grupo acetilo) y protección C terminal (por ejemplo, por un grupo amida)).

Por "una de sus truncaciones" se entiende que el 18mero de la SEQ ID No. 2 se reduce en tamaño por medio de eliminación de aminoácidos. La reducción de aminoácidos se puede ser por medio de eliminación de residuos del C o N terminal del péptido o puede ser por medio de supresión de uno o varios aminoácidos de dentro del núcleo del péptido (es decir, aminoácidos 2-17 de SEQ ID No. 2).

35 El inventor realizó exhaustivos experimentos para evaluar la actividad antiviral de péptidos de apolipoproteínas y sus derivados. Los péptidos y derivados de ApoE eran un foco particular. Para sorpresa de los inventores, ellos hallaron que la mayoría de los péptidos ensayados no tenían o tenían un bajo efecto antiviral. Las excepciones sorprendentes eran péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Los ejemplos 2 - 7 ilustran la eficacia de los péptidos de acuerdo con la invención en comparación con una repetición en tándem de apoE<sub>141-149</sub> y otros péptidos derivados de apolipoproteínas.

40 El inventor identificó que el triptófano (W), la arginina (R) o la lisina (K) pueden ser sustituidos por leucina en repeticiones en tándem de apoE<sub>141-149</sub> y que estos péptidos tienen una sorprendente actividad antiviral. El inventor apreció que estos aminoácidos tenían cadenas laterales que comprendían al menos 4 carbonos y también que contenían un átomo de nitrógeno. Conforme a ello, el aminoácido usado para reemplazar la leucina es triptófano (W), arginina (R) o lisina (K) o sus derivados en el péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

45 El inventor halló que los péptidos en los que al menos un L fue sustituido con un W tienen una actividad antiviral particular. Por ende, lo más preferible es que los péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención comprendan un polipéptido, su derivado o análogo que comprenden una repetición en tándem de apoE<sub>141-149</sub> de SBQ ID No 2 o una de sus truncaciones, caracterizado porque al menos un residuo de leucina (L) de SEQ ID No. 2 está reemplazado por un triptófano (W).

55 Durante el trabajo de desarrollo, el inventor observó que se puede esperar que las sustituciones W aumenten la probabilidad de que el péptido forme una hélice alfa y se preguntó si esto podría explicar la eficacia antiviral de los compuestos de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Sin embargo, no cree que esto explique la sorprendente eficacia de los péptidos de acuerdo con la invención. Esto se debe a que se espera que una cantidad de sustituciones alternativas incrementa la formación de una hélice alfa (por ejemplo, ver la Tabla 1 para el cálculo de la probabilidad de diversos péptidos L-sustituidos que forman una hélice alfa). Sin embargo, la probabilidad de

formación de una hélice (tabla 1) no se correlaciona con la actividad antiviral de péptidos de acuerdo con la presente invención (ver el Ejemplo 5).

**Tabla 1.** Proporción predicha de moléculas de diversos péptidos que forman la hélice alfa en tampón acuoso 0,15 M de NaCl a 37 °C (%) (usando el software de predicción de estructuras secundarias AGADIR asequible de [http://www.emblheidelberg.de/ Services/serrano/agadir/agadir-start.html](http://www.emblheidelberg.de/Services/serrano/agadir/agadir-start.html))

Sustitución de aminoácidos	Secuencia de péptido	% de hélice
E, Glu	ERKERKREEERKERKREE	6,24
A, Ala	ARKARKRAAARKARKRAA	1,85
D, Asp	DRKDRKRDDDRKDRKRDD	1,59
W, Trp	WRKWRKRWWWRKWRKRWW	1,47
M, Met	MRKMRKRMMMRKMRKRMM	1,01
Y, Tyr	YRKYRKRYYYRKYRKRY	0,8
F, Phe	FRKFRKRFFFRKFRKRFF	0,79
I, Ile	IRKIRKRIRIRKIRKRIR	0,6
Q, Gln	QRKQRKRQQQRKQRKRQQ	0,55
Sin intercambio		0,51

Los inventores también observaron:

1. El aumento de la sustitución W es muy pequeño (0,51% de moléculas de GIN 1p formarán una hélice, que se incrementa marginalmente hasta 1,47% del péptido sustituido con W); y

2. Una cantidad de otras sustituciones se pronosticarían para incrementar la proporción de moléculas que forman una hélice alfa en cualquier momento. Por ejemplo, la sustitución L por E o A aumenta la probabilidad de formación una hélice alfa más allá de una sustitución W (al 6,24% y 1,87%, respectivamente). Sin embargo, ambas sustituciones de hecho eliminan la actividad antiviral (por ejemplo, ver el péptido GIN39 en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 5).

En consecuencia, no hay correlación entre la probabilidad de formar una hélice alfa y la potencia de la actividad antiviral para péptidos 'L-sustituídos' de acuerdo con la invención.

La eficacia de péptidos de acuerdo con la invención es la más sorprendente porque la sustitución L (leucina) con aminoácidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención hará menos anfipático al péptido. (La Tabla 2 ilustra el orden aceptado de hidrofobicidad de aminoácidos). Un experto en la técnica puede sospechar en realidad que hacer más anfipático a un péptido le conferiría un carácter antiviral. En consecuencia, de forma inesperada, las sustituciones de acuerdo con la invención de SEQ ID No. 2 darán como resultado un aumento significativo en su actividad antiviral.

**Tabla 2**

**Hidrofobicidad de aminoácidos**

**Phe > Leu = He > Tyr = Trp > Val > Met > Pro > Cys > Ala > Gly > Thr > Ser > Lys > Gln > Asn > His > Glu > Asp > Arg**

Tal como se tratará con mayor detalle a continuación, la SEQ ID No. 2 puede ser manipulada de acuerdo con el primer aspecto de la invención con una cantidad de diferentes sustituciones y supresiones para preparar péptidos con actividad antiviral. Sin embargo, se prefiere que el polipéptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención tenga al menos dos sustituciones W, R o K y, con mayor preferencia, tres o más sustituciones W, R o K.

Además de una o varias sustituciones L con W, R o K, se prefiere que al menos otro aminoácido (con preferencia, al menos otro residuo de leucina) se reemplace con asparagina (N), tirosina (Y), cisteína (C), metionina (M), fenilalanina (F), isoleucina (I), glutamina (Q) o histidina (H). Se prefiere en particular que tal sustitución sea Y o C.

El polipéptido sustituido puede comprender 18 aminoácidos (o sus derivados) y corresponde así a la longitud total de la SEQ ID No. 2. Sin embargo, los inventores hallaron sorprendentemente que los péptidos truncados en base a SEQ ID No. 2 también tienen una eficacia como agentes antivirales. Conforme a ello, los péptidos preferidos o sus

derivados pueden tener menos de 18 aminoácidos. Por ejemplo, algunos péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención pueden tener una longitud de 17, 16, 15, 14, aminoácidos.

5 Los péptidos y sus derivados de acuerdo con la presente invención tienen con preferencia una eficacia para inhibir el crecimiento viral de modo que su valor de IC<sub>50</sub> sea de 30 μM o menos. Se prefiere que el valor de IC<sub>50</sub> sea de 20 μM o menos y, con mayor preferencia, que el valor de IC<sub>50</sub> sea de 10 μM o menos.

Los péptidos preferidos tienen valores de IC<sub>50</sub> similares entre las especies virales. Por ejemplo, los péptidos preferidos tienen valores de IC<sub>50</sub> similares para inhibir el crecimiento HSV1, HSV2 y HIV.

10 Se apreciará que los aminoácidos modificados puedan ser sustituidos en la repetición en tándem de apoE<sub>141-149</sub> con una cantidad de variantes de aminoácidos que pueden ser conocidas por los expertos en la técnica. Estos péptidos aún tendrán una actividad antiviral siempre que la modificación no altere de forma significativa sus características químicas. Por ejemplo, los hidrógenos en las aminas de la cadena lateral de R o K se pueden reemplazar con grupos metileno (-NH<sub>2</sub> → -NH(Me) o -N(Me)<sub>2</sub>).

Los péptidos preferidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención tienen la secuencia de aminoácidos:

15 (a) WRKWRKRWWWRKWRKRWW (SEQ ID No. 3). Este péptido corresponde a la repetición en tándem de longitud total con todas las leucinas sustituidas por residuos de triptófano. Este péptido se designa GIN 7 cuando se menciona en la presente.

(b) WRKWRKRWRKWRKR (SEQ ID No. 4). Este péptido corresponde a la repetición en tándem de longitud total con todas las leucinas sustituidas por residuos de triptófano y truncadas por excisión de aminoácidos 9, 10, 17 y 18. Este péptido se designa GIN 32 cuando se menciona en la presente.

20 (c) WRKWRKRWWLRKLRKRL (SEQ ID No. 5). Este péptido corresponde a la repetición en tándem de longitud total con un subgrupo de leucinas sustituidas por residuos de triptófano. Este péptido se designa GIN 34 cuando se menciona en la presente.

(d) WRKWRKRWWWRKWRKRWW (SEQ ID No. 52). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 3 con el residuo W en la posición 9 suprimida. Este péptido se designa MU 58 cuando se menciona en la presente.

25 (e) WRKWRKRWRKWRKRW (SEQ ID No. 53). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 3 con los residuos W en la posición 9, 10 y 18 suprimidas. Este péptido se designa MU 59 cuando se menciona en la presente.

(f) WRKWRKRWWFRKWRKRWW (SEQ ID No. 54). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 3 con el residuo W en la posición 10 sustituida con F. Este péptido se designa MU 60 cuando se menciona en la presente.

30 (g) WRKWRKRWWFRKWRKRFF (SEQ ID No. 55). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 3 con los residuos W en las posiciones 9, 10, 17 y 18 sustituidas con residuos F. Este péptido se designa MU 61 cuando se menciona en la presente.

(h) WRKCRKRCWWWRKCRKRCW (SEQ ID No. 56). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 3 con los residuos W en las posiciones 4, 8, 13 y 17 sustituidas con residuos C. Este péptido se designa MU 68 cuando se menciona en la presente.

35 (i) LRKLRKRLLRKWRKRWW (SEQ ID No. 57). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 2 con los residuos L en las posiciones 10, 13, 17 y 18 sustituidas con residuos W. Este péptido se designa MU 111 cuando se menciona en la presente.

40 (j) LRKLRKRLLRKLRKRWW (SEQ ID No. 58). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 2 con los residuos L en las posiciones 17 y 18 sustituidas con residuos W. Este péptido se designa MU 112 cuando se menciona en la presente.

(k) LRKLRKRLLRKWRKRLL (SEQ ID No. 59). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 2 con los residuos L en las posiciones 10 y 13 sustituidas con residuos W. Este péptido se designa MU 113 cuando se menciona en la presente.

45 (l) WRKWRKRLLLRKLRKRLL (SEQ ID No. 60). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 2 con los residuos L en las posiciones 1 y 4 sustituidas con residuos W. Este péptido se designa MU 114 cuando se menciona en la presente.

(m) WRKLRKRLLRKLRKRLL (SEQ ID No. 61). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 2 con el residuo L en la posición 1 sustituidas con residuos W. Este péptido se designa MU 115 cuando se menciona en la presente.

50 (n) WRKWRKFFFRKWRKRWW (SEQ ID No. 62). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 3 con los residuos W en las posiciones 8, 9 y 10 sustituidas con residuos F y el residuo R en la posición 7 suprimida. Este péptido se designa MU 116 cuando se menciona en la presente.

(o) WRKWRKRWWFRKFRKRFF (SEQ ID No. 63). Este péptido corresponde al SEQ ID No. 3 con los residuos W en las posiciones 10, 13, 17 y 18 sustituidas con residuos F. Este péptido se designa MU 117 cuando se menciona en la presente.

5 (p) RRRKRKRRRRRKRKRRR (SEQ ID No. 64). Este péptido corresponde a la repetición en tándem de longitud total con todas las leucinas sustituidas por residuos de arginina (R). Este péptido se designa MU 16 cuando se menciona en la presente.

(q) KRKKRKRKKRKRKRKK (SEQ ID No. 65). Este péptido corresponde a la repetición en tándem de longitud total con todas las leucinas sustituidas por residuos de lisina (K). Este péptido se designa MU 18 cuando se menciona en la presente.

10 El inventor también apreció que los péptidos se puedan emplear de acuerdo con la invención que comprenden más de sólo una simple repetición en tándem dimérica de ApoE<sub>141-149</sub> o una de sus truncaciones. Por ejemplo, los péptidos que comprenden un trímero o un número mayor de repeticiones se pueden emplear con agentes antivirales.

15 En otra forma de realización de la invención, se pueden sintetizar péptidos antivirales que comprenden un péptido tal como se definió con anterioridad a los que se han añadido otros aminoácidos. Por ejemplo, uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden añadir a los terminales C o N de un péptido derivado de SEQ ID No. 2. De modo alternativo, el péptido puede comprender una repetición en tándem de un péptido que es mayor que los nueve aminoácidos de la SEQ ID No. 1. Estos péptidos pueden tener aminoácidos añadidos al N terminal, C terminal y/o entre los aminoácidos 9 y 10 de la SEQ ID No. 2. Se prefiere más que el aminoácido se añada al C terminal y también entre  
20 los aminoácidos 9 y 10 de la SEQ ID No. 2. Se apreciará que estos péptidos se puedan modificar luego tal como se describió con anterioridad para los péptidos derivados de la SEQ ID No. 2. A modo de ejemplo, WRKWRKRWWWRKWRKRWWWR (SEQ ID No. 66) representa otro péptido preferido de acuerdo con la presente invención. Este péptido corresponde a la repetición en tándem de longitud total de ApoE<sub>141-150</sub> (es decir, una repetición en tándem de LRKLRKLLR) con todas las leucinas sustituidas por residuos de triptófano. Este péptido  
25 se designa como MU 83 cuando se menciona en la presente.

Durante el desarrollo de derivados de repeticiones en tándem de apoE<sub>141-149</sub> de acuerdo con el primer aspecto de la invención, se apreció que las truncaciones de la SEQ ID No. 2 y sus variantes también tenían una sorprenden actividad antiviral. Ellas incluyen:

30 LRKLRKLLLRKLRK (SEQ ID No. 7). Este péptido corresponde a una forma truncada de la repetición en tándem de longitud total con residuos 16, 17 y 18 suprimidos. Este péptido tiene la ventaja de que el péptido es más corto que GIN 1 y, en consecuencia, es más económica su fabricación. Este péptido se designa GIN 4 cuando se menciona en la presente.

35 LRKLRKRLRKLKR (SEQ ID No. 8). Este péptido corresponde a la repetición en tándem de longitud total truncada por excisión de los aminoácidos 9, 10, 17 y 18. Este péptido se designa GIN 8 cuando se menciona en la presente.

LRKLRKLRKLRKLRK (SBQ ID No. 9). Este péptido corresponde a una variación de la repetición en tándem de longitud total que comprende una repetición del motivo LRK. Este péptido se designa GIN 9 cuando se menciona en la presente.

40 Por otra parte, se halló que YRKYRKRYYYRKRYKRY (SEQ ID No. 6) es efectivo como un agente antiviral. Este péptido corresponde a la repetición en tándem de longitud total de apoE<sub>141-149</sub> con todas las leucinas sustituidas por residuos de tirosina. Este péptido se designa GIN 41 cuando se menciona en la presente.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido, de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un péptido de la SEQ ID No. 6, 7, 8 ó 9 para usar como un medicamento.

45 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un polipéptido, de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un péptido de SEQ ID No. 6, 7, 8 ó 9 para la preparación de un medicamento para tratar infecciones virales.

Debido a su mayor actividad biológica, los polipéptidos de acuerdo con los primeros tres aspectos de la invención son de utilidad como agentes antivirales.

50 Los polipéptidos de acuerdo con el primer, el segundo y el tercer aspecto de la invención se pueden usar en el tratamiento de una cantidad de infecciones virales. El virus puede ser cualquier virus y en particular un virus envuelto. Los virus preferidos son poxvirus, iridovirus, togavirus o torovirus. Un virus de mayor preferencia es un filovirus, arenavirus, buniavirus o rhabdovirus. Un virus de mayor preferencia aún es un paramixovirus o un ortomixovirus. Se prevé que el virus pueda incluir preferentemente un hepadnavirus, coronavirus, flavivirus o retrovirus. Con preferencia, el virus incluye un herpesvirus o un lentivirus. En formas de realización preferidas, el

virus puede ser virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus herpes simplex humano de tipo 2 (HSV2) o virus herpes simplex humano de tipo 1 (HSV1).

5 Los polipéptidos de acuerdo con el primer, el segundo y el tercer aspecto de la invención se pueden usar para tratar infecciones virales como una monoterapia (es decir, uso del compuesto solo) o en combinación con otros compuestos o tratamientos usados en la terapia antiviral (por ejemplo, aciclovir, ganciclovir, ribavirina, interferón, medicamentos anti-HIV incluyendo inhibidores de nucleósidos, nucleótidos o no nucleósidos de transcriptasa inversa, inhibidores de proteasa e inhibidores de fusión).

Los polipéptidos se pueden usar como un profiláctico (para evitar el desarrollo de una infección viral) o se pueden usar para tratar infecciones existentes.

10 Los polipéptidos de la invención representan productos que pueden ser expresados ventajosamente por células biológicas.

Así, la presente invención también proporciona, en un quinto aspecto, una secuencia de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

15 Los ácidos nucleicos que codifican apoE<sub>141-149</sub> tiene la secuencia de ADN cttcgtaaactcgtaaactgtcttctt (SEQ ID. No. 10), mientras que GIN tiene la secuencia cttcgtaaactcgtaaactgtcttcttcttcgtaaactcgtaaactgtcttctt (SEQ ID. No. 11).

Los ácidos nucleicos preferidos de acuerdo con el quinto aspecto de la invención que codifican los péptidos identificados en la presente como GIN 4, 7, 8, 9, 32, 34 y 41 tienen las siguientes secuencias respectivas:

cttcgtaaa ttcgtaaact tcgtaaactc cgtaaacttc gtaaactcg taaa (SEQ ID No.16);

tggcgtaaat ggcgtaaacg ttggtgggg cgtaaattggc gtaaactgtg gtgg (SEQ ID No.12);

20 cttcgtaaa ttcgtaaacg tcttcgtaaa cttcgtaaac gt (SEQ ID No. 17);

cttcgtaaac ttcgtaaact tcgtaaactc cgtaaacttc gtaaactcg taaa (SBQ ID No.18);

tggcgtaaat ggcgtaaacg ttggcgtaaa tggcgtaaac gt (SBQ ID No.13);

tggcgtaaat ggcgtaaacg ttggtggctt cgtaaacttc gtaaactgtct tctt, (SEQ ID No. 14); y

tatcgtaaat atcgtaaacg ttattattat cgtaaatac gtaaactgta ttat (SEQ ID No. 15).

25 Un experto en la técnica apreciará que la secuencia de ácidos nucleicos de otros péptidos preferidos de acuerdo con la presente invención se pueda generar de manera simple.

Se apreciará que, debido a la redundancia en el código genético, una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con el quinto aspecto de la invención pueda variar del gen ApoE natural, proporcionando un codón que codifica un polipéptido, de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

30 Se apreciará que los polipéptidos de acuerdo con la invención representen favorables agentes para administrar por medio de técnicas que implican una expresión celular de secuencias de ácidos nucleicos que codifican tales moléculas. Estos métodos de expresión celular son particularmente apropiados para uso médico en donde se requieren los efectos terapéuticos de los polipéptidos durante un período prolongado.

35 Así, de acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con el quinto aspecto de la invención para usar como un medicamento.

El ácido nucleico puede ser preferentemente una secuencia de ácidos nucleicos aislados o purificados. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser preferentemente una secuencia de ADN.

40 La secuencia de ácidos nucleicos también puede comprender elementos capaces de controlar y/o mejorar su expresión. La molécula de ácidos nucleicos puede estar contenida dentro de un vector apropiado para formar un vector recombinante. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, cósmico o fago. Estos vectores recombinantes son muy útiles en los sistemas de suministro de la invención para transformar células con la molécula de ácido nucleico.

45 Los vectores recombinantes también pueden incluir otros elementos funcionales. Por ejemplo, vectores recombinantes se pueden diseñar de modo que el vector se replique de forma autónoma en la célula. En este caso, los elementos que inducen la replicación de ácidos nucleicos se pueden requerir en el vector recombinante. De modo alternativo, el vector recombinante se puede diseñar de modo tal que el vector y la molécula de ácido nucleico recombinante se integre en el genoma de una célula. En este caso, se desean secuencias de ácidos nucleicos que favorecen la integración dirigida (por ejemplo, por recombinación homóloga). Los vectores recombinantes también pueden tener ADN que codifica genes que se pueden usar como marcadores seleccionables en el proceso de clonación.

50

El vector recombinante también puede comprender un promotor o regulador para controlar la expresión del gen según se requiera.

5 La molécula de ácidos nucleicos puede ser (pero no necesariamente) una que se incorpora en el ADN de células del sujeto en tratamiento. Las células no diferenciadas pueden ser establemente transformadas, lo que lleva a la producción de células hija genéticamente modificadas (en cuyo caso, se puede requerir una regulación de la expresión en el sujeto, por ejemplo, con factores de transcripción o activadores de genes específicos). De modo alternativo, el sistema de suministro se puede diseñar para favorecer la transformación inestable o transitoria de células diferenciadas en el sujeto en tratamiento. Cuando este es el caso, la regulación de la expresión puede ser menos importante porque la expresión de la molécula de ADN se detendrá cuando las células transformadas mueren o detienen la expresión de la proteína (idealmente, cuando se ha logrado el efecto terapéutico requerido).

El sistema de suministro puede proporcionar la molécula de ácido nucleico al sujeto sin ser incorporada en un vector. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se puede incorporar dentro de un liposoma o partícula de virus. De modo alternativo, se puede insertar una molécula de ácido nucleico “desnuda” en células de un sujeto por medios apropiados, por ejemplo, captación endocítica directa.

15 La molécula de ácido nucleico se puede transferir a las células de un sujeto por tratar por transfección, infección, microinyección, fusión celular, fusión de protoplastos o bombardeo balístico. Por ejemplo, la transferencia puede ser por transfección balística con partículas de oro revestidas, liposomas que contienen la molécula de ácido nucleico, vectores virales (por ejemplo, adenovirus) y medios de suministro de captación directa de ácido nucleico (por ejemplo, endocitosis) por aplicación de la molécula de ácido nucleico directamente.

20 Se apreciará que los polipéptidos y ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se puedan usar en una monoterapia (es decir, uso de polipéptidos, agentes, ácidos nucleicos o derivados de acuerdo con la invención solos para prevenir y/o tratar una infección viral). De modo alternativo, se pueden usar polipéptidos y ácidos nucleicos de acuerdo con la invención como un coadyuvante o en combinación con terapias conocidas.

25 Los polipéptidos y ácidos nucleicos de acuerdo con la invención se pueden combinar en composiciones que tienen una cantidad de diferentes formas, en particular, según la manera en la que se ha de usar la composición. Así, por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un polvo, comprimido, cápsula, líquido, ungüento, crema, gel, hidrogel, aerosol, spray, micela, parche transdérmico, liposoma o cualquier otra forma apropiada que se puede administrar a una persona o animal. Se apreciará que el vehículo de la composición de la invención sea uno que sea bien tolerado por el sujeto al que se administra, y preferentemente se adapta para permitir el suministro de los polipéptidos o ácidos nucleicos al tejido objeto.

30 Las composiciones que comprenden polipéptidos o ácidos nucleicos de acuerdo con la invención se pueden usar en una cantidad de formas. Por ejemplo, se puede requerir la administración oral, en cuyo caso el compuesto puede estar contenido dentro de una composición que, por ejemplo, se puede ingerir por vía oral en forma de un comprimido, cápsula o líquido. De modo alternativo, la composición se puede administrar por inyección en el torrente sanguíneo. Las inyecciones pueden ser intravenosas (bolo o infusión) o subcutáneas (bolo o infusión). Los compuestos se pueden administrar por inhalación (por ejemplo, por vía intranasal).

35 Las composiciones se pueden formular para uso tópico. Por ejemplo, los ungüentos se pueden aplicar a la piel, áreas en y alrededor de la boca o los genitales para tratar infecciones virales específicas. La aplicación tópica en la piel es particularmente útil para tratar infecciones virales de la piel o como medio de suministro transdérmico a otros tejidos. La administración intravaginal es efectiva para tratar enfermedades de transmisión sexual (incluyendo sida).

40 Los polipéptidos o ácidos nucleicos también se pueden incorporar dentro de un dispositivo de liberación lenta o retardada. Estos dispositivos pueden insertarse, por ejemplo, sobre o debajo de la piel y el compuesto se puede liberar durante semanas o incluso durante meses. Estos dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se requiera un tratamiento prolongado con un polipéptido, agente, ácido nucleico o derivado de acuerdo con la invención y que normalmente requiere una administración frecuente (por ejemplo, al menos inyección diaria).

45 Se apreciará que la cantidad de un polipéptido o ácido nucleico que se requiere se determine por su actividad biológica y su biodisponibilidad que, a su vez, depende del modo de administración, las propiedades fisicoquímicas del polipéptido o ácido nucleico empleado y si el polipéptido o ácido nucleico se está usando como una monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración también será influida por los factores antes mencionados y, en particular, la vida media del polipéptido o ácido nucleico dentro del sujeto en tratamiento.

50 Las dosis óptimas para administrar pueden ser determinadas por los expertos en el arte y variarán con el polipéptido o ácido nucleico particular en uso, la potencia de la preparación, el modo de administración y el avance de la condición patológica. Los factores adicionales que dependen del sujeto particular en tratamiento darán como resultado una necesidad de ajuste de las dosis, incluyendo la edad del sujeto, el peso, el género, la dieta y el tiempo de administración.



Se apreciará que un experto en la técnica sea capaz de calcular las dosis requeridas y las concentraciones óptimas de los péptidos en un tejido objeto, en base a la farmacocinética de los péptidos y, en particular, los valores de IC<sub>50</sub> dados en los Ejemplos.

5 En general, se puede usar una dosis diaria de entre 0,01 µg/kg de peso corporal y 0,5 g/kg de peso corporal de polipéptido o ácidos nucleicos de acuerdo con la invención para la prevención y/o el tratamiento de una infección viral, según lo cual se usa un polipéptido o ácido nucleico específico. Con mayor preferencia, la dosis diaria está entre 0,01 mg/kg de peso corporal y 200 mg/kg de peso corporal y, con máxima preferencia, de entre aproximadamente 1 mg/kg y 100 mg/kg.

10 Los procedimientos conocidos, tales como los empleados de forma convencional por la industria farmacéutica (por ejemplo, experimentación in vivo, ensayos clínicos, etc.), se pueden usar para establecer formulaciones específicas de polipéptidos o ácidos nucleicos de acuerdo con la invención y regímenes terapéuticos precisos (como dosis diarias de los polipéptidos o ácidos nucleicos y la frecuencia de administración).

15 Las dosis diarias se pueden suministrar como una administración única (por ejemplo, una inyección diaria única). De modo alternativo, el polipéptido, el agente, el ácido nucleico o el derivado usados pueden requerir la administración de dos o más veces durante un día. Como ejemplo, se pueden administrar polipéptidos o ácidos nucleicos de acuerdo con la invención como dos dosis diarias (o más según la gravedad de la enfermedad) de entre 25 mg y 7000 mg (es decir, asumiendo un peso corporal de 70 kg). Un paciente que recibe tratamiento puede tomar una primera dosis después de despertar y luego una segunda dosis por la tarde (dado el caso de un régimen de doble dosis) o a intervalos de 3 ó 4 horas. De modo alternativo, se puede usar un dispositivo de liberación lenta para proporcionar dosis óptimas a un paciente sin necesidad de administrar dosis repetidas.

20 Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o ácido nucleico de acuerdo con la invención y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, la cantidad del polipéptido o ácido nucleico es una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 800 mg. En otra forma de realización, la cantidad del polipéptido o ácido nucleico es una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg. En otra forma de realización, la cantidad del polipéptido o ácido nucleico es una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 250 mg. En otra forma de realización, la cantidad del polipéptido o ácido nucleico es una cantidad de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 60 mg. En otra forma de realización, la cantidad del polipéptido o ácido nucleico es una cantidad de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg.

30 Esta invención proporciona un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende la combinación de una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o ácido nucleico de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es cualquier cantidad de un polipéptido o ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención que, cuando se administra a un sujeto, proporciona prevención y/o tratamiento de una infección viral. Un "sujeto" es un vertebrado, mamífero, animal doméstico o ser humano.

35 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se menciona en la presente es cualquier vehículo fisiológico conocido por los expertos en la técnica de utilidad para formular composiciones farmacéuticas.

40 En una forma de realización preferida, el vehículo farmacéutico es un líquido y la composición farmacéutica está en la forma de una solución. En otra forma de realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un sólido y la composición está en la forma de un polvo o comprimido. En otra forma de realización, el vehículo farmacéutico es un gel y la composición está en la forma de una crema o similares.

45 Un vehículo sólido puede incluir una o varias sustancias que también pueden actuar como agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, rellenos, deslizantes, auxiliares de compresión, aglutinantes o agentes disgregantes de comprimidos; también puede ser un material encapsulante. En polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está mezclado con el polipéptido activo, agente, ácido nucleico o derivado finamente dividido. En comprimidos, el polipéptido activo, agente, ácido nucleico o derivado se mezcla con un vehículo que tiene las propiedades necesarias de compresión en proporciones apropiadas y que está compactado en la forma y el tamaño deseados. Los polvos y comprimidos contienen preferentemente hasta el 99% del polipéptido activo o ácido nucleico. Los vehículos sólidos apropiados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidina, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónico.

50 Los vehículos líquidos se usan en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El polipéptido activo o ácido nucleico se puede disolver o suspender en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable tales como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos apropiados tales como solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, endulzantes, agentes saborizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores. Los ejemplos apropiados de vehículos líquidos para administración oral y parenteral incluyen agua (que contienen

parcialmente aditivos como antes, por ejemplo, derivados celulósicos, con preferencia, solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, por ejemplo, glicoles) y sus derivados y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionada y aceite de arachís). Para administración parenteral, el vehículo también puede ser un éster oleoso como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos estériles son de utilidad en composiciones de forma líquida estéril para administración parenteral. El vehículo líquido para composiciones presurizadas puede ser hidrocarburo halogenado u otro propelente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles se pueden utilizar, por ejemplo, por inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intravenosa y particularmente subcutánea, intracerebral o intracerebroventricular. El polipéptido o ácido nucleico se puede preparar como una composición sólida estéril que se puede disolver o suspender al momento de la administración, usando agua estéril, solución fisiológica u otro medio inyectable estéril. Los vehículos pretenden incluir aglutinantes, agentes de suspensión, lubricantes, saborizantes, endulzantes, conservantes, tinturas y revestimientos necesarios e inertes.

Los polipéptidos o ácidos nucleicos de acuerdo con la invención se pueden administrar por vía oral en forma de una solución o suspensión estéril que contiene otros solutos o agentes de suspensión (por ejemplo, suficiente solución fisiológica o glucosa para isotonzar la solución), sales biliares, acacia, gelatina, monooleato de sorbitano, polisorbato 80 (ésteres de oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con óxido de etileno) y similares.

Los polipéptidos o ácidos nucleicos de acuerdo con la invención también se pueden administrar de forma oral ya sea en forma de composición líquida o sólida. Las composiciones apropiadas para administración oral incluyen formas sólidas, tales como píldoras, cápsulas, gránulos, comprimidos y polvos y formas líquidas, tales como soluciones, jarabes, elixires y suspensiones. Las formas de utilidad para la administración parenteral incluyen soluciones, emulsiones y suspensiones estériles.

La invención se describirá también, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes ejemplos y figuras, en los que:

**Figura 1** muestra el efecto de apoE<sub>141-149dp</sub> y apoE<sub>263-286</sub> sobre la infectividad de HSV1 (los puntos se derivan del promedio de hasta cuatro valores) tal como se describe en el Ejemplo 1;

**Figura 2** muestra el efecto de apoE<sub>141-149dp</sub> o apoE<sub>263-286</sub> sobre la infectividad de HSV2 (los puntos se derivan del promedio de hasta cuatro valores) tal como se describe en el Ejemplo 1;

**Figura 3** ilustra la inhibición de la producción de HIV-1 p24, medida por ELISA, por apoE<sub>141-149r</sub> y apoE<sub>263-286</sub> en células U937 agudamente infectadas (los valores son el promedio de tres experimentos) tal como se describe en el Ejemplo I (ApoE<sub>141-149dp</sub> era significativamente activo contra HIV (ANOVA,  $p < 0,001$ ), mientras que la actividad de apoE<sub>263-286</sub> contra HIV no alcanzó una significancia (ANOVA;  $0,06 < p < 0,62$ ));

**Figura 4** ilustra el efecto de 4 péptidos (GIN1, 1p, 2 y 3) sobre la inactividad de HSV1 tal como se describe en el Ejemplo 2;

**Figura 5** ilustra el efecto de 4 péptidos (GIN 4-7) sobre la infectividad de HSV1 tal como se describe en el Ejemplo 2;

**Figura 6** ilustra el efecto de 4 péptidos (GIN 8-11) sobre la infectividad de HSV1 tal como se describe en el Ejemplo 2;

**Figura 7** compara e ilustra el efecto de péptidos GIN 7, GIN 32, GIN 34 y GIN 1p sobre la infectividad de HSV1 tal como se describe en el Ejemplo 2;

**Figura 8** ilustra la acción anti-HIV del péptido GIN7 contra aislado de HIV SF162, cultivado en células de glioma NP-2 que sobreexpresa correceptores de CCR5 tal como se describe en el Ejemplo 4;

**Figura 9** muestra los datos típicos de espectrometría en masa durante GIN7 e ilustra que el péptido tenía una pureza de >95%;

**Figura 10** muestra datos de HPLC típicos para GIN7 e ilustra que el péptido tenía una pureza de >95%.

### Ejemplo 1

Se realizaron experimentos con ApoE<sub>141-149</sub> para establecer si el péptido tenía o no una eficacia como agente antiviral.

#### 1.1 HSV1

La Figura 1 y la tabla 1 muestran resultados típicos para el ensayo de la actividad anti-HSV1. El ensayo implicaba el tratamiento de células Vero confluentes en placas de 24 cavidades con medio que contenía virus y diversas

5 cantidades de péptido durante una hora, seguido de eliminación de su inóculo y adición de medio de recubrimiento viscoso, que contenía 0,2% de carboximetilcelulosa de alta viscosidad. El medio de recubrimiento sólo permite la infección de aquellas células inmediatamente adyacentes a una célula infectada. Después de 2 días de incubación y luego fijación y tinción, son visibles pequeños parches de células infectadas (o 'placas'), que son contados. Cada uno de ellos corresponde a la infección de una célula individual durante una hora de inoculación. ApoE<sub>141-149dp</sub> produjo una reducción del 40% en la cantidad de placas a una concentración de aproximadamente 20 µM. Observar que el péptido sólo estaba presente en el sistema experimental durante 1 hora.

**Tabla 1:** Formación de placas de HSV1 en células Vero después de la inoculación con virus con apoE<sub>141-149dp</sub> o apoE<sub>263-286</sub>. Los valores para cavidades no tratadas están subrayados.

[µM]	<i>ApoE</i> <sub>141-149dp</sub>					<i>ApoE</i> <sub>263-286</sub>				
	1	2	3	4	Promedio ± sd	1	2	3	4	Promedio ± sd
0	<u>96</u>	<u>102</u>	<u>123</u>		<u>107 ± 14,2</u>					
5	129	106	103	100	110 ± 13,2	113	119	122	126	120 ± 5,5
10	73	87	76	89	81 ± 7,9	116	124	102		114 ± 11,1
20	68	67	63	63	65 ± 2,6	148	112	133	114	127 ± 17,0
30	72	71	56		66 ± 9,0	134	109	114	125	121 ± 11,2
40	64	65	53	68	63 ± 6,6	120	113	125	144	126 ± 11,2

10 **1.2 HSV2**

La Figura 2 y la tabla 2 muestran resultados típicos para el ensayo de la actividad anti-HSV2. El ensayo se llevó a cabo como para el ensayo de anti-HSV1, excepto en que se usaron células Hep-2 más que células Vero. ApoE<sub>141-149dp</sub> produjo una reducción del 50% en la cantidad de placas en una concentración de aproximadamente 20 µM. Nuevamente, observar que el péptido sólo estaba presente en el sistema experimental durante 1 hora.

15 **Tabla 2.** Formación de placas HSV2 en células HEp-2 después de la inoculación con virus que contenían apoE<sub>141-149dp</sub> o apoE<sub>263-286</sub>. Los valores para cavidades no tratadas están subrayados.

[µM]	<i>ApoE</i> <sub>141-149dp</sub>					<i>ApoE</i> <sub>263-286</sub>				
	1	2	3	4	Promedio ± sd	1	2	3	4	Promedio ± sd
0	<u>156</u>	<u>137</u>	<u>162</u>	<u>152</u>	<u>152 ± 10,7</u>					
5	160	134	140	130	141 ± 13,3	135	160	161	152	152 ± 12,0
10	125	113	131	132	125 ± 8,7	157	121	151	134	141 ± 16,1
20	82	72	73	81	77 ± 5,2	118	150	182	134	146 ± 27,3
30	76	77	71	72	74 ± 2,9	118	117	103	159	124 ± 24,2
40	51	59	69	49	57 ± 9,1	132	144	125	124	131 ± 24,2

**1.3. HIV**

20 La Figura 3 y la tabla 3 muestran típicos resultados para el ensayo de la actividad anti-HIV. El ensayo se llevó a cabo por incubación de células U937 infectadas con HIV en presencia de diversos niveles de péptido durante 7 días, seguido de ensayo de niveles de proteína HIV p24 en las células, usando una técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). ApoE<sub>141-149dp</sub> produjo una reducción del 95% en infectividad a 20 µM. ApoE<sub>263-286</sub> produjo una reducción del 20% en infectividad a 20 µM que no logró una significancia estadística.

25 El efecto sobre HIV aparece en menores concentraciones de péptido, a pesar de que esto se puede deber al péptido que está en contacto con células durante 7 días, en oposición a sólo 1 hora en ensayos de reducción de placa con herpes virus.

**Tabla 3:** Inhibición de la producción de HIV-1 p24, medida por ELISA, por apoE<sub>141-149dp</sub> y apoE<sub>263-286</sub> en células U937 agudamente infectadas.

[μM]	% de reducción en la producción de HIV p24							
	ApoE <sub>141-149dp</sub>				ApoE <sub>263-286</sub>			
	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Promedio ± sd	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Promedio ± sd
0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	91,66	70,31	89,85	83,94 ± 11,84	31,75	8,50	29,38	23,21 ± 12,79
20	96,87	95,08	93,10	95,02 ± 1,89	7,69	29,71	30,91	22,77 ± 13,07
30	95,94	88,63	87,77	90,78 ± 4,49	37,94	27,83	41,78	35,85 ± 7,21
40	96,80	95,47	95,33	95,87 ± 0,81	23,50	30,08	48,04	38,87 ± 12,70
50	95,73	93,25	95,38	94,79 ± 1,34	33,36	41,45	45,66	40,16 ± 6,25

Los resultados presentes en 1.1 - 1.3 ilustran que ApoE<sub>141-149dp</sub> fue más eficaz que ApoE<sub>263-286</sub>.

5 A la luz de estos resultados, los inventores procedieron a ensayar otros péptidos generados de apolipoproteínas para investigar si estos péptidos tenían o no una actividad antiviral (ver el Ejemplo 2).

## Ejemplo 2

10 Dados los conocimientos obtenidos por los inventores según el trabajo informado en el Ejemplo 1, se realizaron experimentos para evaluar los efectos antivirales de una gran cantidad de péptidos derivados de apolipoproteínas. Sorprendentemente, los inventores hallaron que sólo una menor cantidad de los péptidos ensayados tenía efectos antivirales (ver 2.2). Estos péptidos representan péptidos de acuerdo con la invención.

## 2.1 Materiales y métodos

### 2.1.1 Cultivo celular

15 Se mantuvieron células de riñón de mono verde africano (Vero) en medio esencial mínimo Eagle con sal de Earle (EMEM) y suplementado con 10% de suero fetal de ternero (inactivado con calor), 4 mM de L-glutamina y 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, más penicilina y estreptomycin (100 UI/mg y 100 mg/ml, respectivamente) (medio de mantenimiento mencionado como 10% de EMEM). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de aire con 5% de CO<sub>2</sub>.

20 Al cosechar, las monocapas se lavaron en solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS) y se desprendieron por incubación con tripsina en PBS durante 30 min, antes de inactivar la tripsina por adición de un volumen igual de 10% de EMEM y centrifugar a 500 g (5 min, 4 °C). Los pellets celulares se resuspendieron en 10% de EMEM, antes del recuento celular y la siembra de placas de 24 cavidades. Para ensayos antivirales, se usó medio con contenido de sólo 0,5% de FCS (mencionado como 0,5% de EMEM).

### 2.1.2 Virus

25 Se prepararon tres pasajes separados de virus HSV1 infectando células Vero y preparando suspensiones semipuras de virus de sobrenadante de cultivo tisular y lisados celulares, antes de congelar alícuotas de virus a -85 °C. Se evaluó la infectividad viral llevando a cabo ensayos de placa en diluciones seriales de alícuotas descongeladas (expresada en pfu/ml).

### 2.1.3 Péptidos

30 Se obtuvieron péptidos en forma liofilizada de un proveedor comercial (AltaBioscience, Universidad de Birmingham o Advanced Biomedical) y se produjeron en escala 5 micromolar. Se protegieron N-terminales por adición de un grupo acetilo y los C-terminales se protegieron por adición de un grupo amida.

35 Se confirmó el peso molecular de péptidos por espectrometría de masa por desorción láser usando un analizador de masa en tiempo de vuelo Finnigan LASERMAT 2000 MALDI o un espectrómetro de masa Scientific Analysis Group MALDI-TOF. La purificación por HPLC de péptidos se realizó usando una columna de fase inversa Vidac analytical C-4, usando 0,1% de TFA y 0,1% de TFA / 80% de acetonitrilo como disolventes o para algunos péptidos, una columna en fase inversa ACE C18, usando 0,05% de TFA y 60% de acetonitrilo como disolventes. Los datos de

espectrometría de masa típicos y trazas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (pureza de >95%) para el péptido GIN 7 (SEQ ID No. 3) se muestran en las Figuras 9 y 10.

Se pesaron pequeñas cantidades de péptido en tubos Eppendorf estériles, antes de la adición del 0,5% de EMEM suficiente para producir una solución madre de 1,5 mM, que se congeló a -20 °C en alícuotas.

#### 5 2.1.4 Ensayos de reducción de plgas.

Se sembraron células Vero a 125.000 células por cavidad en 10% de EMEM y se incubaron durante la noche, que resultó en monocapas confluentes. Los péptidos se diluyeron en 0,5% de EMEM para dar 2x de concentración deseada final y se dispusieron alícuotas de 100 µl en placas de 96 cavidades en una disposición para usar en placas de 24 cavidades; también se prepararon cavidades de control que contenía 0,5% de EMEM normal. Se descongelaron las reservas virales (p3) y se diluyeron en 0,5% de EMEM de modo que había aproximadamente 100 pfu en 100 µl. Cada placa de 24 cavidades se inoculó por separado. En primer lugar, se añadieron 100 µl de reserva viral al péptido o medio de control dispuesto en una placa de 96 cavidades. Esto se incubó a 37 °C durante diez minutos antes de la inoculación. El medio se removió de cuatro cavidades de una placa de 24 cavidades que contenían Vero confluyente y 200 µl de inóculo añadido a la cavidad apropiada. Una vez tratadas todas las cavidades, se incubó la placa de 24 cavidades durante otros 60-80 minutos. Finalmente, se removió el inóculo que contenía el péptido y se añadió 1 ml de 1% de EMEM que contenía 1% de carboximetilcelulosa a cada cavidad. Las placas se incubaron durante otras 22 horas o, en algunos experimentos, durante 40 horas, antes de eliminar el recubrimiento y añadir 10% de formaldehído en PBS. Después de otra hora más de incubación, se eliminó el fijador, las monocapas se lavaron varias veces con agua corriente y se tiñeron con carbol fucsina solubilizada en agua. Después de 30 minutos, se removió la tintura y las placas se lavaron varias veces con agua corriente antes de secar al aire. Las placas se contaron usando un Olympus IX70 Inverting Microscope y el efecto antiviral se expresó como un porcentaje del valor de control para cada concentración de péptido. La IC<sub>50</sub> se calculó a partir de gráficos de efecto de inhibición contra la concentración de péptido.

#### 2.1.5 Ensayo de toxicidad

Se sembraron células Vero en placas de 96 cavidades a 30.000 células por cavidad en 10% de EMEM y se incubaron durante la noche, que dio como resultado monocapas confluentes. Los péptidos GIN se diluyeron en 0,5% de EMEM para dar una concentración deseada final y alícuotas de 100 µl se dispusieron en placas de 96 cavidades separadas que no contenían células, antes de tomar las placas Vero de 96 cavidades, eliminar 10% de EMEM y añadir péptidos con 0,5% de EMEM. Después de incubar durante 48 horas, se añadieron 25 µl de 1,5 mg/ml de solución MTT (en 0,5% de EMEM) por cavidad y las placas retornaron a la incubadora durante una hora. Finalmente, el medio se eliminó de las cavidades y los cristales azules de formazano se solubilizaron por adición de 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego se midió la absorbancia de soluciones resultantes a 570 nm y el efecto tóxico se expresó como un porcentaje del valor de control para cada concentración de péptido. De ser posible, la EC<sub>50</sub> se calculó a partir de gráficos del efecto tóxico contra la concentración de péptido. Afortunadamente, no se halló evidencia de toxicidad para la línea celular ensayada, usando péptido a 40 µM expuesto a células durante 2 días.

## 2.2 Resultados

La **Tabla 4** resume los datos obtenidos para 16 péptidos identificados como GIN 1, GIN 1p y GIN 2 -15.

**Tabla 4**

Péptido	SEQ ID No.	IC <sub>50</sub> aparente (µM)	Secuencia	Tamaño
GIN 1	2	16,5	LRKLRKRLLRKLRKRL	18
GIN 1p	2	10	LRKLRKRLLRKLRKRL	18
GIN 2	24	>40	LRKRLLRKLRKRL	15
GIN 3	31	Sin actividad	RLLLRKLRKRL	12
GIN 4	7	29,5	LRKLRKRLLRKLRK	15
GIN 5	25	>40	LRKLRKRLLRK	12
GIN 6	26	>40	ERKERKREEERKERKREE	18
GIN 7	3	<5	WRKWRKRWWWWRKWRKRWW	18
GIN 8	8	13	LRKLRKRLRKLKR	14

Péptido	SEQ ID No.	IC <sub>50</sub> aparente (µM)	Secuencia	Tamaño
GIN 9	9	15,5	LRKLRKLRKLRKLRKLRK	18
GIN 10	22	39	RLLRLLRLLRLLRLLRLL	18
GIN 11	20	36,5	QSTEELRVRLASHLRKLRKRL	22
GIN 12	27	>40	LRKLRKRLLR DADDLQKRLA	20
GIN 13	28	>40	RDADDLQKR RDADDLQKR	20
GIN 14	29	>40	GERLRARMEGERLRARME	18
GIN 15	30	>40	RLRARMEEMRLRARMEEM	18

La **Figura 4** ilustra que ApoE<sub>141-149dp</sub> (rotulado como GIN 1) tenía buena eficacia para reducir la infectividad de HSV1. Un péptido GIN 1p relacionado (GIN 1 con protección N y C terminal) tenía una eficacia similar.

5 Tal como se ilustra en la Tabla 4, los inventores ensayaron una cantidad de otros péptidos relacionados (identificados como GIN 2, GIN 3, GIN 4, GIN 5, GIN 6, GIN 10, GIN 11, GIN 12, GIN 13, GIN 14 y GIN 15) y se halló que no tenían o que tenían baja eficacia para reducir la infectividad viral.

Además, el inventor halló, para su sorpresa, que un subgrupo de péptidos ensayados (que son péptidos de acuerdo con la presente invención) eran efectivos como agentes antivirales.

La **Figura 5** ilustra que el péptido designado como GIN 7 tenía eficacia para reducir la infectividad de HSV-1.

10 La **Figura 6** ilustra que los péptidos designados como GIN 8 y GIN 9 también tenían eficacia para reducir la infectividad de HSV-1.

15 La **Tabla 5** ilustra que una cantidad de péptidos relacionados o similares al péptido ApoE<sub>141-149dp</sub> (identificado como péptidos GIN 17 - 31 en la Tabla 5) no tenían o tenía poca eficacia para reducir la infectividad viral. Los inventores diseñaron racionalmente estas moléculas esperando que pudieran tener una actividad anti-HSV1 y, en base a los datos presentados en la Tabla 4, un experto en la técnica podría esperar que tales péptidos tuvieran una eficacia similar a los reivindicados de acuerdo con la invención. El hecho de que estos péptidos tuvieran poco efecto tornen sorprendente la utilidad de los péptidos reivindicados.

**Tabla 5**

Péptido	SEQ ID No.	IC <sub>50</sub> aparente (µM)	Secuencia	Tamaño
GIN 17	33	NA	RALVDTLKFVTQAEAGAK	17
GIN 18	34	NA	PYLDDFQKKWQEEMELYRQKVB	22
GIN 19	35	NA	PLGEEMRDRARAHVDALRTHLA	22
GIN 20	36	NA	PYSDELQRQLAARLEALKENGG	22
GIN 21	37	NA	ARLAEYHAKATEHLSTLSEKAK	22
GIN 22	19	36	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	18
GIN 23	38	NA	PVLDEFREKLNEELEALKQKMK	22
GIN 24	39	NA	VTDYGKDLMEKVKSPQL	18
GIN 25	40	NA	VTDYGKDLMEKVKEWLNS	18
GIN 26	41	NA	NFHAMFQPFLEMIHEAQQ	28
GIN 27	42	NA	CKNKEKKCKNKEKKC	18
GIN 28	43	NA	LRKEKKRLLLRKEKKRLL	18
GIN 29	21	38,5	HMLDVMQDHFSSRASSIIDEL	20

Péptido	SEQ ID No.	IC <sub>50</sub> aparente (µM)	Secuencia	Tamaño
GIN 30	44	NA	LQVAERLTRKYNELLKSYQ	19
GIN 31	45	NA	KFMETVAEKALQEYRK	16

**Ejemplo 3**

Otro grupo de experimentos se llevó a cabo en una cantidad expandida de péptidos para seguir evaluando el efecto de los péptidos de acuerdo con la invención contra HSV-1. La **Tabla 6** confirma que los péptidos designados como GIN 1p y GIN 7 tenían propiedades anti-HSV-1, mientras que los péptidos designados como GIN 32, 34 y 41 también tenían eficacia. La eficacia de estos péptidos indica sorprendentemente que la mayoría de los péptidos ensayados no tenían o tenían poca actividad.

5

La **Figura 7** compara e ilustra el efecto de los péptidos GIN 7, GIN 32, GIN 34 y GIN 1p sobre la infectividad de HSV1.

**Tabla 6**

<u>Código peptídico</u>	<u>SEQ ID No.</u>	<u>SEQ ID No. de ácido nucleico</u>	<u>Secuencia</u>	<u>IC<sub>50</sub> (µM)</u>
<b>7</b>	SEQ ID No. 3	SEQ ID No. 12	WRKWRKRWWWWRKWRKRWW	<b>3,5</b>
<b>34</b>	SEQ ID No. 5	SEQ ID No. 14	WRKWRKRWWLRKLRKRL	<b>6</b>
<b>32</b>	SEQ ID No. 4	SEQ ID No. 13	WRKWRKRWRKWRKR	<b>10</b>
<b>41</b>	SEQ ID No. 6	SEQ ID No. 15	YRKYRKRYYYRKYRKRY	<b>16</b>
<b>1p</b>	SEQ ID No. 2	SEQ ID No. 11	LRKLRKRLLRKLRKRL	<b>17</b>
<b>actividad baja:</b>				
<b>4</b>	SEQ ID No. 7	SEQ ID No. 16	LRKLRKRLLRKLRK	<b>29,5</b>
<b>22</b>	SEQ ID No. 19	NA	DWLKAFYDKVAEKLKEAF	<b>36</b>
<b>11</b>	SEQ ID No. 20	NA	QSTEELRVRLASHLRKLRKRL	<b>36,5</b>
<b>29</b>	SEQ ID No. 21	NA	HMLDVMQDHFSSRASSIIDEL	<b>38,5</b>
<b>10</b>	SEQ ID No. 22	NA	RLLRLLRLLRLLRLLRLL	<b>39</b>
<b>44</b>	SEQ ID No. 23	NA	LRQLRQRLLLRQLRQRLL	<b>40</b>
<b>2</b>	SEQ ID No. 24	NA	LRKRLLRKLRKRL	<b>&gt;40</b>
<b>5</b>	SEQ ID No. 25	NA	LRKLRKRLLRK	<b>&gt;40</b>
<b>6</b>	SEQ ID No.26	NA	ERKERKREEERKERKREE	<b>&gt;40</b>
<b>actividad baja:</b>				
<b>12</b>	SEQ ID No. 27	NA	LRKLRKRLLR DADDLQKRLA	<b>&gt;40</b>
<b>13</b>	SEQ ID No. 28	NA	RDADDLQKR RDADDLQKR	<b>&gt;40</b>
<b>14</b>	SEQ ID No. 29	NA	GERLRARMEGERLRARME	<b>&gt;40</b>
<b>15</b>	SEQ ID No. 30	NA	RLRARMEEMRLRARMEEM	<b>&gt;40</b>
<b>Sin actividad:</b>				
<b>apoE 141-149</b>	SEQ ID No. 1	SEQ ID No. 10	LRKLRKRL	<b>NA</b>
<b>3</b>	SEQ ID No. 31	NA	RLLRKRKRL	<b>NA</b>

<u>Código peptídico</u>	<u>SEQ ID No.</u>	<u>SEQ ID No. de ácido nucleico</u>	<u>Secuencia</u>	<u>IC<sub>50</sub> (µM)</u>
6	SEQ ID No. 32	NA	ERKERKREEERKERKREE	NA
17	SEQ ID No. 33	NA	RALVDTLKFVTQAEGAK	NA
18	SEQ ID No. 34	NA	PYLDDFQKKWQEEMELYRQKVE	NA
19	SEQ ID No. 35	NA	PLGEEMRDRARAHVDALRTHLA	NA
20	SEQ ID No. 36	NA	PYSDELRLQRLAARLEALKENGG	NA
21	SEQ ID No. 37	NA	ARLAEYHAKATEHLSTLSEKAK	NA
23	SEQ ID No. 38	NA	PVLDEFREKLNEELEALKQKMK	NA
24	SEQ ID No. 39	NA	VTDYGKDLMEKVKSPQLQ	NA
25	SEQ ID No. 40	NA	VTDYGKDLMEKVKEWLNS	NA
26	SEQ ID No. 41	NA	NFHAMFQPFLEMIHEAQQ	NA
27	SEQ ID No. 42	NA	CKNKEKKCKKNKEKCC	NA
28	SEQ ID No. 43	NA	LRKEKKRLLLRKEKKRLL	NA
30	SEQ ID No. 44	NA	LQVAERLTRKYNELLKSYQ	NA
31	SEQ ID No. 45	NA	KFMETVAEKALQEYRK	NA
39	SEQ ID No. 46	NA	ARKARKRAAARKARKRAA	NA
40	SEQ ID No. 47	NA	MRKMRKRMMMRKMRKRMM	NA
42	SEQ ID No. 48	NA	LRWLRWRLLLRWLRWRL	NA
45	SEQ ID No. 49	NA	LWKLWKWLLLWKLWKWLL	NA
46	SEQ ID No. 50	NA	LYKLYKYLLLYKLYKYLL	NA
47	SEQ ID No. 51	NA	LQKLQKQLLLQKLQKQLL	NA

#### Ejemplo 4

Se realizaron similares experimentos a los descritos en el Ejemplo 2 para ensayar la eficacia de los péptidos de acuerdo con la invención contra infección por HIV.

5 La línea celular de glioma NP2 que sobreexpresa tanto CD4 como el apropiado correceptor (CCR5 o CXCR4) se mantuvo en DMEM suplementado con 10% de FCS.  $2 \times 10^4$  células se plaquearon por cavidad de una placa de 48 cavidades 24 h antes de la infección y crecimiento a 37 °C. Las células luego se lavaron y se incubaron en DMEM/FCS con concentraciones de péptido que iban de 0,1 a 10 micromoles, a 37 °C durante 30 minutos. Luego se añadieron unidades formadoras de 200 focos de reservas de HIV-1 a cada cavidad y las células se incubaron a 37 °C durante otras 2 horas. Las células luego se lavaron dos veces en PBS y el medio fresco se reemplazó. Después de 3 días de crecimiento, las células se fijaron en metanol frío:acetona y se tiñeron in situ para expresión de HIV-1 p24 usando anti-p24 monoclonal seguido de un conjugado secundario antirratón de beta-galactosidasa. La expresión se visualizó por tinción de X-Gal y se enumeraron los focos infecciosos por microscopio óptico.

Se halló que los péptidos de acuerdo con la invención tenían una eficacia similar contra HSV-1 y HIV.

15 La **Figura 8** ilustra la acción anti-HIV del péptido GIN 7 contra aislado de HIV SF162, crecido en células NP-2 de glioma que sobreexpresan correceptores de CCR5.

Se generaron datos similares para otras cepas de HIV y en otros tipos de células huésped. Notablemente, GIN 1p (apoEdp) no tenía una actividad anti-HIV detectable en una combinación de cepa de HIV y tipo celular contra lo cual se ensayó este péptido y en las concentraciones usadas aquí (hasta 10 µM). Esto sugeriría que los péptidos sustituidos W de acuerdo con la presente invención son más potentes contra HIV que GIN 1p (apoE<sub>141-149</sub> dp).

#### 20 Ejemplo 5



Se realizaron otros experimentos para evaluar la eficacia de los péptidos de acuerdo con la presente invención contra HSV1.

### 5.1 Métodos

5 Los métodos empleados eran tal como se describió en los Ejemplos 1 – 4. Los péptidos esperados se prepararon como reservas de 400 µM en solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS).

### 5.2 Resultados

#### 5.2.1 Efecto de sustitución completa de leucina

10 Se realizaron experimentos para investigar el efecto de sustitución total de residuos L en la repetición en tándem de apoE<sub>141-149</sub> con un único aminoácido. La Tabla 7 ilustra que los péptidos de acuerdo con la presente invención tienen eficacia para inhibir el crecimiento de HSV1 (es decir, sustitución W, R o K). Los péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención tienen, sorprendentemente, mayor eficacia que la repetición en tándem de apoE (GIN 1/MU 10).

15 Es interesante observar que la sustitución con M, Y, F, I, Q, H o N tenía cierta eficacia (comparable con la repetición en tándem de apoE) y como tales otras sustituciones de acuerdo con la invención, pueden comprender estos aminoácidos.

Las sustituciones con E, A, D, S, V, T, G o P dieron como resultado una actividad antiviral suprimida.

20 A pesar de que los inventores no desean quedar ligados por hipótesis alguna, observaron que la sustitución con aminoácidos con pequeñas cadenas laterales tiene a suprimir la actividad antiviral, mientras que los aminoácidos con cadenas laterales más grandes mantienen los efectos antivirales. Sin embargo, la sustitución L con aminoácidos tal como se define por el primer aspecto de la invención confiere una sorprendente actividad antiviral.

**Tabla 7**

Código peptídico	SEQ ID No.	Secuencia	IC <sub>50</sub> de HSV1 (µM)
MU 1 (GIN 6)	67	ERKERKREEERKERKREE	NA
MU 2 (GIN 39)	68	ARKARKRAAARKARKRAA	NA
MU 3	69	DRKDRKRDDDRKDRKRDD	NA
MU 4 (GIN 7)	3	WRKWRKRWWWWRKWRKRWW	3,5
MU 5 (GIN 40)	70	MRKMRKRMMMRKMRKRMM	>30
MU 6 (GIN 41)	6	YRKYRKRYYYRKYRKRY	>30
MU 7	71	FRKFRKRFFFRKFRKRFF	>30
MU 8	72	IRKIRKRIIRKIRKRRI	>30
MU 9	73	QRKQRKRQQQRKQRKRQQ	>30
MU 10 (GIN 1p)	2.	LRKLRKLLLLRKLKRLL	30
MU 10 (GIN 1)	2.	LRKLRKLLLLRKLKRLL (sin protección N C)	16,5
MU 11	74	NRKNRKRNNNRKNRKRNN	27,5
MU 13	75	SRKSRKRSSSRKSRKRSS	NA
MU 14	76	VRKVRKRVVVRKVRKRVV	NA
MU 15	77	TRKTRKRTRTRKTRKRTR	NA
MU 16	64	RRKRRKRRRRRKRRKR	7,5
MU 17	78	GRKGRKRGGGRKGRKRGG	NA
MU 18	65	KRKKRKRKKRKKRKRKK	7,5
MU 19	79	HRKHRKRHHHRKHRKRHH	NA
MU 20	80	PRKPRKRPPPRKPRKRPP	NA

**5.2.2 Ensayo de otros péptidos derivados de apoE**

El inventor construyó una biblioteca expandida de péptidos para evaluar qué derivados de péptido apoE pueden tener actividad antiviral.

5 La Tabla 8 ilustra que una cantidad de péptidos, que se basaban en la SEQ ID No. 2 pero que entran fuera de la definición de péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención, no tenían o tenían poca actividad antiviral (por ejemplo, MU 24-46). Es interesante observar que MU 43 y MU 44 corresponden a repeticiones en tándem de los equivalentes murino y bovino a apoE<sub>141-149</sub>, respectivamente, mientras que MU 46 corresponde a apoE<sub>141-149</sub> (SEQ ID No. 1).

10 Los datos presentados en la Tabla 8 para MU 58 -117 demuestran que cada uno de estos péptidos, que son péptidos de acuerdo con la presente invención, tiene una buena actividad antiviral que es sorprendentemente superior a la de apoE<sub>141-149</sub> dp (SEQ ID No. 2).

**Tabla 8**

Código peptídico	SEQ ID No.	Secuencia	IC <sub>50</sub> de HSV1 (µM)
MU 24	81	LLRKRLKRLLRKRLKRL	40
MU 38	82	LRRLRRRLLRRLRRRL	>30
MU 39	83	LKKLKKKLLKLLKLLKLL	30
MU 40	84	LHHLHHHLLHHLHHHLL	NA
MU 41	85	LDDLDDDLLDDLDDDLL	NA
MU 42	86	LEELEEEELLEEELLEEEL	NA
MU 43	87	MRKLRKRLMMRKLRLKRLM	NA
MU 44	88	LRKLPKRLLRKLPKRL	>30
MU 45	89	WRKWRKRWW	NA
MU 46	1	LRKLRKRL	NA
MU 58	52	WRKWRKRWWWRKWRKRWW	4,25
MU 59	53	WRKWRKRWRKWRKRW	9,75
MU 60	54	WRKWRKRWWFRKWRKRWW	4
MU 61	55	WRKWRKRFFWRKWRKRFF	4,75
MU 68	56	WRKCRKRCWWRKCRKRCW	4,25
MU 83	66	WRKWRKRWWWRKWRKRW WR	2,5
MU 111	57	LRKLRKRLLRKWRKRWW	12,5
MU 112	58	LRKLRKRLLRKLRKRWW	>20
MU 113	59	LRKLRKRLLRKWRKRLL	18,5
MU 114	60	WRKWRKRLLLRKLRKRLL	16
MU 115	61	WRKLRKRLLRKLRKRLL	17,5
MU 116	62	WRKWRKRFFFRKWRKRWW	3,3
MU 117	63	WRKWRKRWWFRKFRKRFF	3,3

**EJEMPLO 6**

15 Otros experimentos se realizaron para evaluar la eficacia de los péptidos de acuerdo con la presente invención contra HSV2.

**6.1 Métodos**

Se realizaron ensayos de placa. La metodología era la descrita en los Ejemplos previos para los ensayos de placa de HSV1 (incluyendo el uso de células Vero) excepto en que se usaron en lugar de ellos aislados clínicos de HSV2 (proporcionados por Prof. Anthony Hart de la Universidad de Liverpool).

## 6.2 Resultados

- 5 También se ensayó contra HSV2 una cantidad de péptidos que tenían eficacia contra HSV1. La Tabla 9 ilustra que los péptidos de acuerdo con la presente invención eran efectivos tanto contra HSV1 como contra HSV2. Esto ilustra que los péptidos tendrán un amplio espectro de actividad contra virus.

**Tabla 9**

Código peptídico	SEQ ID No.	Secuencia	IC <sub>50</sub> de HSV2 (µM)
GIN 34	5	WRKWRKRWWLRKLRKLL	< 3,3
GIN 32	4	WRKWRKRWRKWRKR	6,25
MU 4 (GIN 7)	3	WRKWRKRWWWWRKWRKRWW	< 3,3
MU 59	53	WRKWRKRWRKWRKRW	10
MU 83	66	WRKWRKRWWWWRKWRKRWWR	< 3,3
MU 111	57	LRKLRKLLWRKWRKRWW	6,5
MU 112	58	LRKLRKLLLRKLRKRWW	16
MU 113	59	LRKLRKLLWRKWRKLL	11,75
MU 114	60	WRKWRKRLLLRKLRKLL	9

### Ejemplo 7

- 10 Se realizaron otros experimentos para ensayar la eficacia de péptidos de acuerdo con la presente invención contra virus de inmunodeficiencia humana (HIV). El efecto de un péptido de acuerdo con la presente invención se ensayó contra una cepa diferente de HIV a la ensayada en el Ejemplo 4.

#### 7.1 Métodos

- 15 Se diluyeron péptidos (preparados tal como se describió previamente) en alícuotas de 50 µl y se mezclaron con células T (C8166) a 40.000 células por cavidad. A continuación, se añadió HIV-1 111B en una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 y la mezcla se incubó durante 5 días a 37 °C. Se evaluó visualmente la formación de sincicios usando un microscopio de inversión y niveles de gp120 virales en sobrenadantes evaluados por un gp120 ELISA usando GNA para captura de antígenos. Se lavaron placas de 96 cavidades recubiertas con 50 µl de GNA (Galantus nivalis), luego se trataron con 100 µl de RPMI (10% de suero fetal de ternero) y se dejaron durante una hora. Después de otro lavado, se añadieron 25 µl de sobrenadantes de muestra de ensayo a las cavidades, junto con diluciones de muestras de control infectadas. Después de lisis por 3 h de tratamiento con 0,5% de Empigen (detergente usado para lisis de virus) a todas las cavidades y lavado, se añadieron 50 µl de suero humano anti-HIV y las placas se incubaron durante la noche. Después de seguir lavando, se añadieron 50 µl de una dilución 1000x de conjugado de Ig peroxidasa anti-humana y las placas se incubaron a 37 °C durante 90 min. Después de un lavado final, se añadieron 50 µl de sustrato de peroxidasa a cada cavidad y las placas se incubaron durante 10-30 min. La reacción se detuvo con 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M y se midió A450.

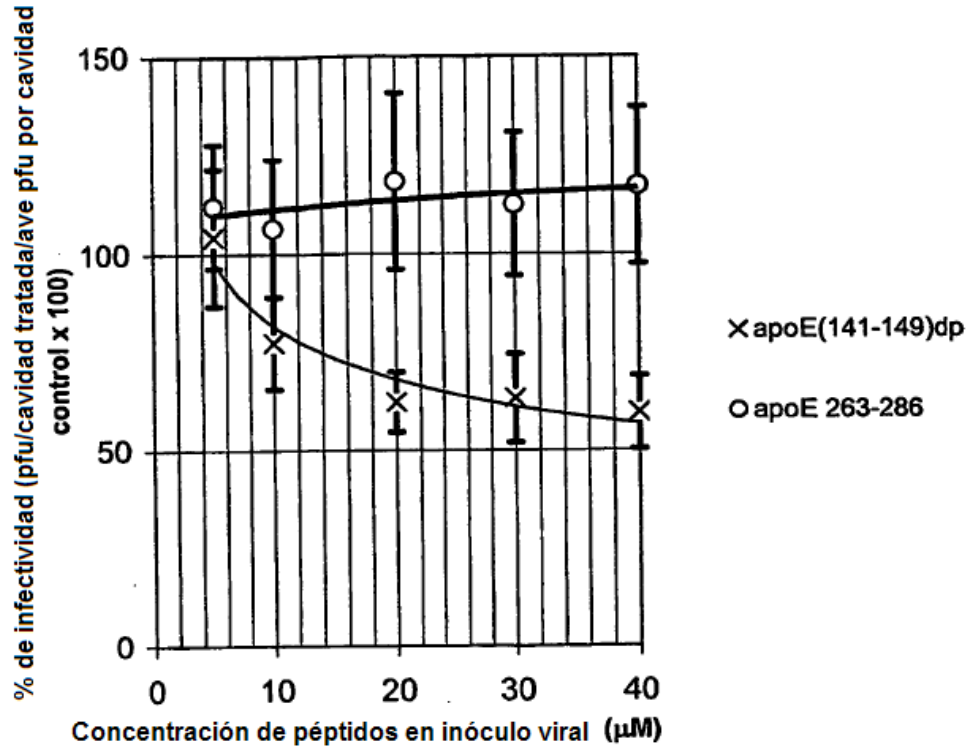
#### 7.2 Resultados

- Se realizaron otros ensayos para sustentar los datos presentados en el Ejemplo 4 que ilustran que los péptidos de acuerdo con la presente invención eran efectivos contra HIV, así como HSV1 y HSV2.
- 30 GIN 32 (SEQ ID No. 4) tenía una IC<sub>50</sub> de 7,5 µM para inhibir el crecimiento de HIV-1. La eficacia de él era similar en HSV1, HSV2 y HIV. Esto confirma que los péptidos de acuerdo con la presente invención tienen amplios efectos antivirales.



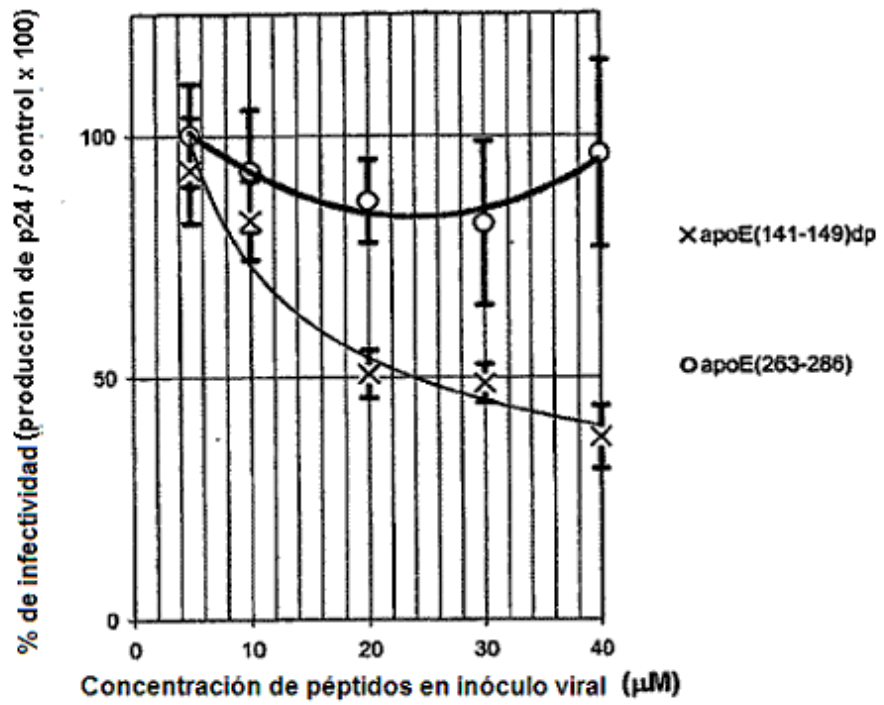
**FIG. 1**

Reducción en la infectividad de HSV1 después del tratamiento con diversas concentraciones de péptidos derivados de apoE



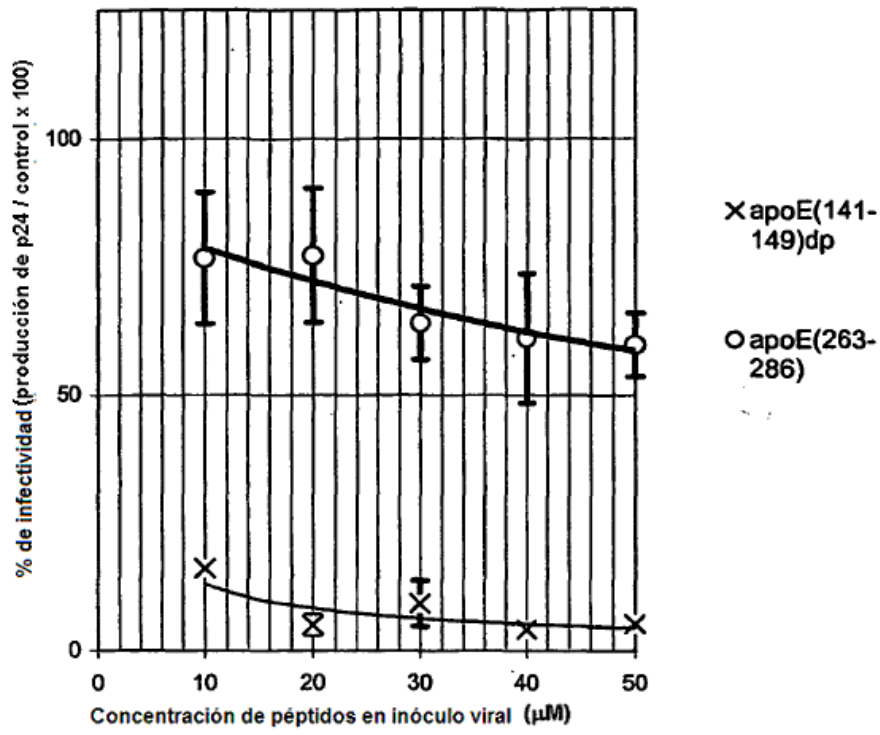
**FIG. 2**

Reducción en la infectividad de HSV2 después del tratamiento con diversas concentraciones de péptidos derivados de apoE



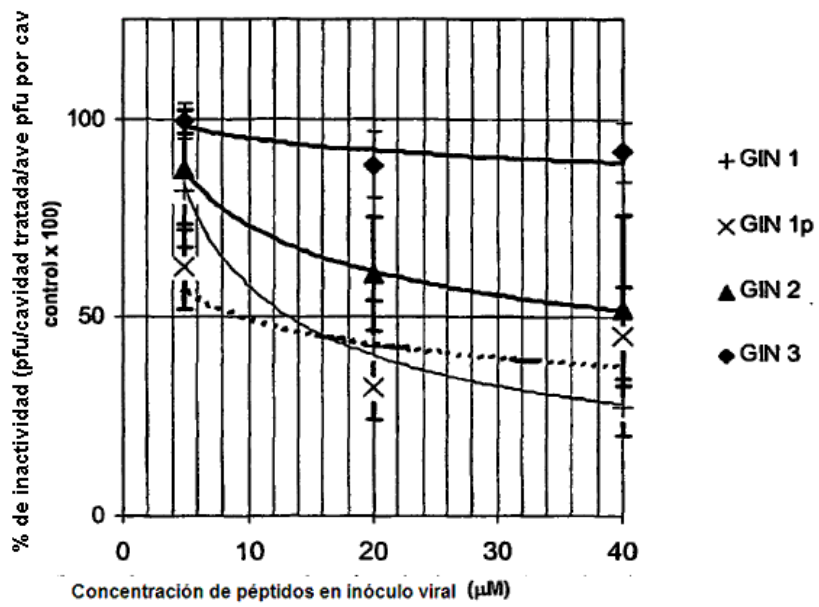
**FIG. 3**

Reducción en la infectividad de **HIV** después del tratamiento con diversas concentraciones de péptidos derivados de apoE



**FIG. 4**

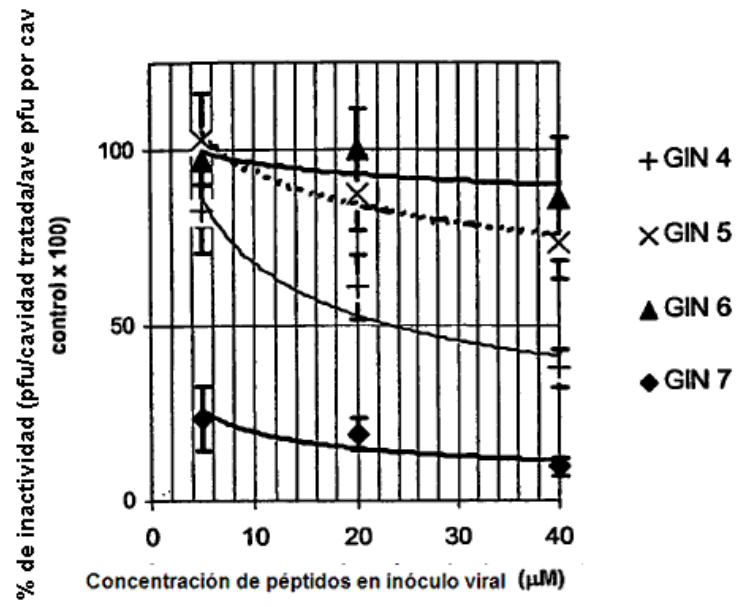
Reducción en la infectividad de **HSV1** después del tratamiento con diversas concentraciones de péptidos derivados de apoE





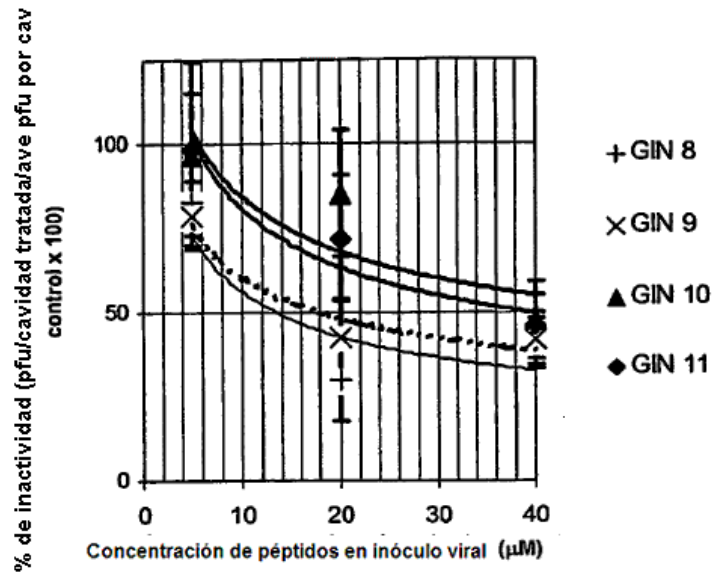
**FIG. 5**

Reducción en la infectividad de **HSV1** después del tratamiento con diversas concentraciones de péptidos derivados de apoE



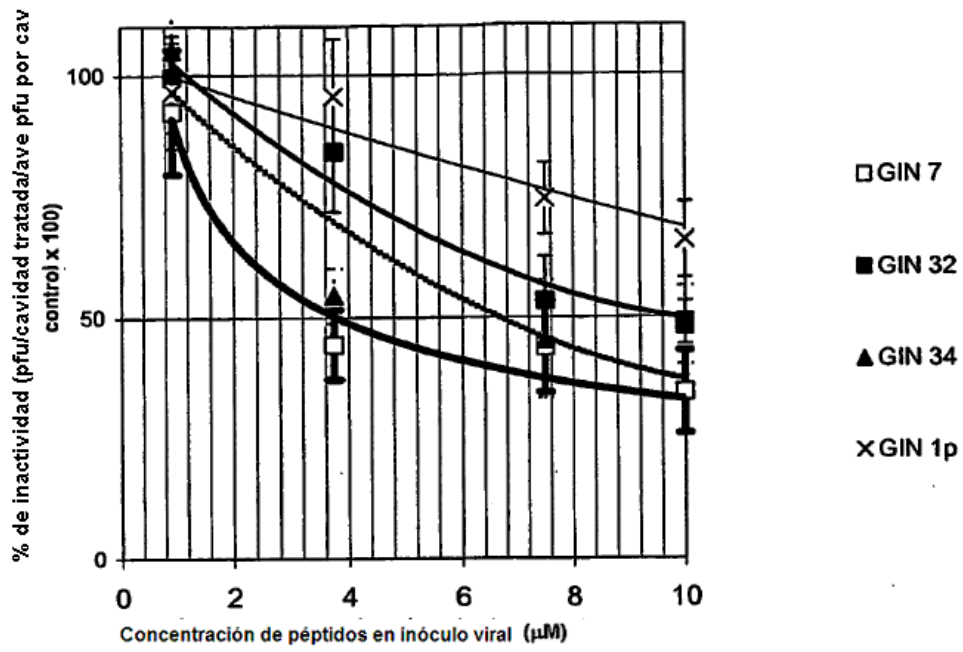
**FIG. 6**

Reducción en la infectividad de **HSV1** después del tratamiento con diversas concentraciones de péptidos derivados de apoE



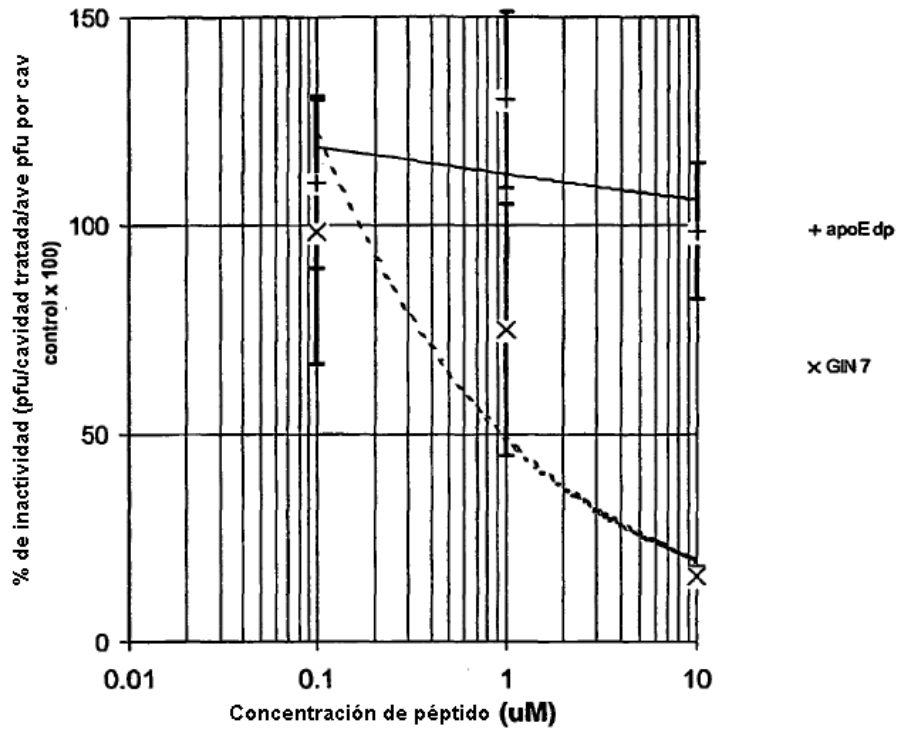
**FIG. 7**

Reducción en la infectividad de **HSV1** después del tratamiento con diversas concentraciones de péptidos **GIN**



**FIG. 8**

Reducción en infectividad de HIV después del tratamiento de células de glioma NP2 con diversas concentraciones de péptidos GIN



**FIG. 9**

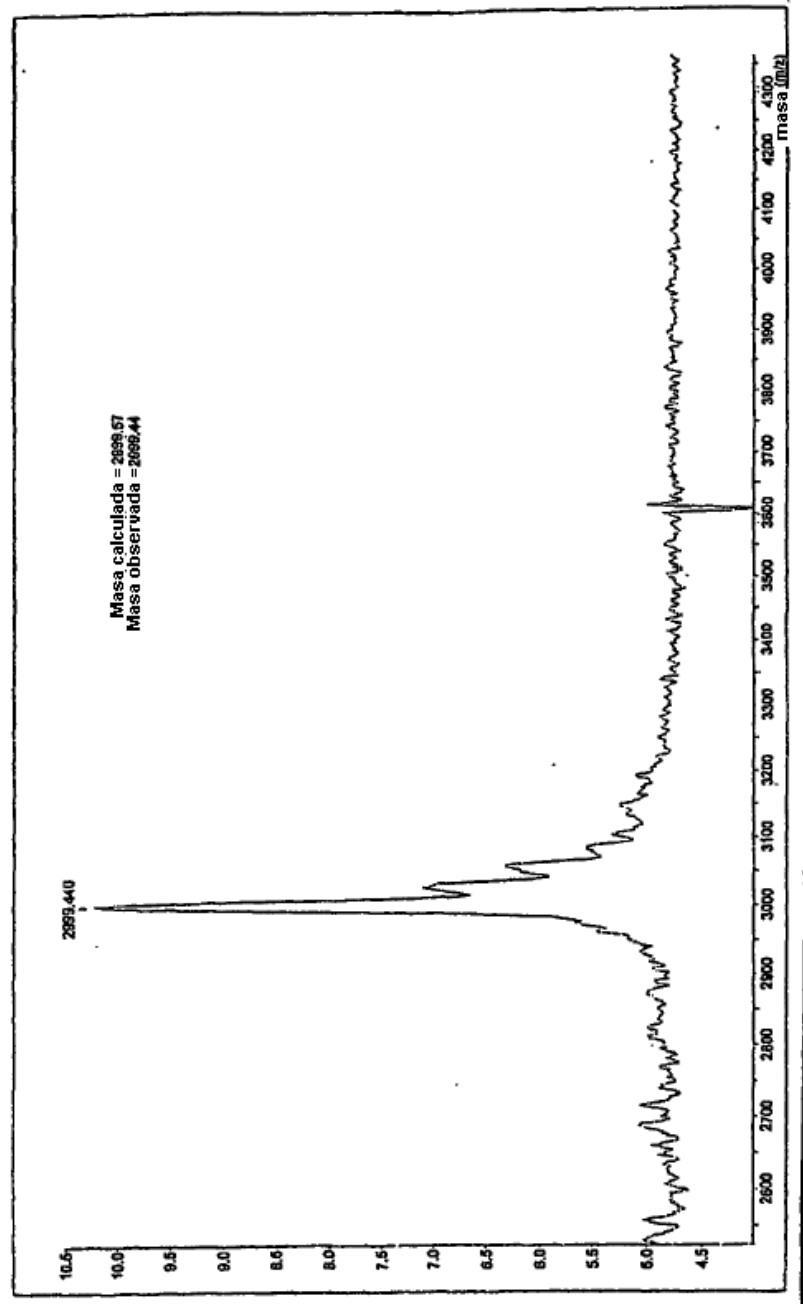
Espectro de masa por desorción láser

LaserMat 2000

Advanced Biomedical Ltd

Muestra: GIN 7

0.521254  
6 disparos



**Fig. 10**

