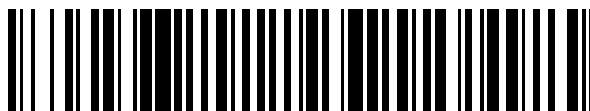


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 456**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2004 E 10182018 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2261375**

54 Título: **Procedimiento de prevención de la fusión virus célula inhibiendo la función de la región de iniciación de fusión en virus de ARN que tienen proteínas de envoltura fusogénicas de membrana de clase I**

30 Prioridad:

04.11.2003 US 517181 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.04.2013

73 Titular/es:

**THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND (50.0%)
1430 Tulane Avenue
New Orleans, LA 70112-2699, US y
AUTOIMMUNE TECHNOLOGIES, LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GARRY, ROBERT F y
WILSON, RUSSELL B**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 400 456 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

Procedimiento de prevención de la fusión virus célula inhibiendo la función de la región de iniciación de fusión en virus de ARN que tienen proteínas de envoltura fusogénicas de membrana de clase I

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos número 60/517181 presentada el 4 de noviembre de 2003.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos para su uso en la prevención o inhibición de la infección vírica por un coronavirus de una célula (previniendo de este modo la liberación del genoma vírico dentro del citoplasma celular, etapa requerida para la infección vírica). La presente invención proporciona composiciones y usos de las mismas para prevenir la infección por un virus coronavirus de tipo 1, interfiriendo con su región de iniciación de fusión (FIR, por sus siglas en inglés).

Introducción

Todos los virus deben unirse a sus células diana e invadirlas para replicarse. Para los virus animales con envoltura, incluyendo virus de ARN que tienen proteínas de fusión de membrana de clase I (virus de tipo I), el proceso implica: a) unión del virión a la célula diana, b) fusión de la envoltura del virus con la membrana plasmática o con una membrana celular interna, c) desestabilización de la envoltura vírica y de la membrana celular en el área de fusión para crear un poro de fusión, d) transferencia del ARN vírico a través del poro y e) modificación de la función celular por el ARN vírico.

La fusión de la membrana vírica y de la envuelta celular, etapas b) y c) anteriores, está mediada por la interacción de una glucoproteína transmembrana vírica (proteína de fusión) con las proteínas de superficie y las membranas de la célula diana. Estas interacciones causan cambios conformacionales en la proteína de fusión que dan lugar a la inserción de un péptido de fusión vírico en la membrana de la célula diana. Esta inserción va seguida de cambios conformacionales adicionales dentro de la proteína de fusión que acercan la envoltura vírica y las membranas celulares y dan lugar a la fusión de las dos bicapas de la membrana.

Un virus es incapaz de extenderse y propagarse dentro de su huésped si se interrumpe este proceso de fusión. Puede lograrse la interrupción intencionada de este proceso de fusión dirigiendo péptidos y homólogos que mimetizan a péptidos hacia secuencias de la proteína de fusión, anticuerpos que reconocen la proteína de fusión y otros factores que actúan frente a la proteína de fusión.

Antecedentes de la invención

Similitudes estructurales entre las proteínas de fusión de los virus de ARN de clase I.

La hemaglutinina 2 (HA2) del virus de la gripe, un ortomixovirus, es el prototipo de proteína de fusión de los virus de ARN de clase I y contiene un dominio hidrófobo amino terminal denominado como péptido de fusión, que se expone durante la escisión de la proteína precursora de la hemaglutinina. Las proteínas de fusión de membrana de los virus de ARN de diversas familias, como arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus y retrovirus, comparten algunas características estructurales comunes con HA2 y se ha denominado proteínas de fusión vírica de clase I. Se ha observado que la proteína de fusión del VIH-1, la glucoproteína de transmembrana y otras proteínas de transmembrana retrovíricas, como las de ortomixovirus y paramixovirus, poseen un dominio de péptido de fusión hidrófobo expuesto durante la escisión de un precursor (gp160) (Gallagher, 1987; Gonzalez-Scarano y col., 1987). En base a estas similitudes y a algoritmos informáticos que predicen la configuración de las proteínas, se ha sugerido (Gallagher y col., 1989) que la porción externa (ectodominio, extremo amino terminal) de la proteína de transmembrana del VIH-1 y las proteínas de transmembrana de otros retrovirus, pueden coincidir todas ellas con el esqueleto de la estructura de HA2 como se determina mediante cristalografía de rayos X (Wilson, Skehal y Wiley, 1981).

En base a estas observaciones, se ha previsto que las proteínas de transmembrana retrovíricas contienen varias características estructurales además del péptido de fusión en común con la estructura conocida de HA2, que incluyen una hélice en el extremo amino terminal extendida (hélice N normalmente una "héptada repetida" o "cremallera de leucina"), una hélice en el extremo carboxilo terminal (hélice C) y un motivo aromático próximo al dominio de transmembrana. La presencia de al menos cuatro de estos cinco dominios define a una proteína de la envoltura vírica como una proteína de fusión de clase I. Este modelo de proteína de transmembrana retrovírica se confirmó mediante determinaciones estructurales y análisis mutacional posteriores (Chan y col., 1997; Kowalski y col., 1991; Weissenhorn y col., 1997). Los motivos estructurales comunes están presentes no solo en las proteínas de fusión de ortomixovirus y retrovirus sino también en las de paramixovirus, filovirus (como el virus del Ébola, EboV) (Gallagher, 1996) y arenavirus (Gallagher, DiSimone y Buchmeier, 2001). El modelo estructural de Gallagher de la proteína de fusión de EboV (GP2) también se ha confirmado mediante procedimientos de cristalografía de rayos X

(Malashkevich y col., 1999; Weissenhorn y col., 1998).

En la figura 1 se muestran los cinco dominios descritos previamente de las proteínas de fusión de las seis familias de virus de tipo 1. Las proteínas de fusión se originan en un péptido de fusión hidrófobo, terminan en un péptido de anclaje e incorporan una hélice alfa en el extremo aminoterminal extendida (hélice N, normalmente una "héptada repetida" o una "cremallera de leucina"), una hélice alfa en el extremo carboxilo terminal (hélice C) (Carr y Kim, 1993; Suarez y col., 2000; Wilson, Skehel y Wiley, 1981) y algunas veces un motivo aromático próximo a la envoltura del virión. También se muestra el sexto dominio, la región de iniciación de fusión (FIR), descrita por los presentes inventores. Se han descrito la clonación, la expresión y la caracterización de la totalidad y diversos fragmentos solubles de la glicoproteína S de SARS-CoV (aislado de Tor2) (Xiao et al., 2003). También se han descrito la síntesis y la actividad inhibitoria contra una infección de dos grupos de péptidos correspondientes a las secuencias de las regiones HR1 y HR2 de la proteína espicular de SARS-CoV (Liu et al., 2004).

Inhibición de la fusión en virus de tipo I

Los intentos previos de los presentes inventores (Garry) y otros laboratorios para diseñar péptidos y miméticos de péptido, anticuerpos y otros factores que inhiban la fusión en los virus de tipo I se han centrado en el péptido de fusión, la hélice N y la hélice C de las proteínas de fusión. En el caso de los péptidos de fusión, se ha encontrado que análogos de los dominios de péptidos de fusión de ortomixovirus y paramixovirus (Richardson, Scheid y Choppin, 1980) y VIH-1 (Gallaher y col., 1992; Owens y col., 1990; Silburn y col., 1998) bloquean la infección vírica, presumiblemente formando heteroagregados inactivos. También se ha encontrado que los péptidos correspondientes a las porciones de la hélice N y la hélice C son eficaces inhibiendo la infección vírica tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, un péptido de 17 aminoácidos correspondiente a la porción carboxilo terminal de la hélice N de la proteína de fusión de VIH-1, definida como la región CS3, bloqueaba la infección por VIH (Qureshi y col., 1990). Además, se ha desarrollado otros péptidos inhibidores de la hélice N y la hélice C en base al modelo estructural de la proteína de fusión (Wild, Greenwell y Matthews, 1993; Wild y col., 1992), incluyendo el fármaco peptídico anti-hélice C del VIH-1 DP178 (T-20 o FUZEON®). DP178 se solapa con la hélice C y el dominio proximal aromático de anclaje, e inhibe la fusión virión VIH-1: célula a concentraciones muy bajas (inhibición del 50 % a 1,7 nM) alcanzables *in vivo* tras la inyección. En un ensayo clínico, 100 mg/día de DP178 producían una reducción de aproximadamente 100 veces de la carga de VIH-1 en el plasma de los individuos infectados (Kilby y col., 1998). Este resultado ha motivado en gran medida la búsqueda de otros péptidos inhibidores de VIH-1 en base a la estructura de la proteína de transmembrana (Pozniak, 2001; Sodroski, 1999). También se ha demostrado que inhibidores peptídicos de paramixovirus inhiben la replicación vírica (Lambert y col., 1996, Young y col., 1999). Los estudios realizados por Watanabe y colaboradores sugieren que una estrategia similar dirigida hacia la hélice N y la hélice C de GP2 de EboV puede también llevar a descubrir inhibidores útiles (Watanabe y col., 2000). También se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a dominios de proteínas de fusión inhiben la fusión virión: célula.

Observaciones realizadas en VIH-1

Una gran parte del estudio se ha dedicado a la inhibición de la fusión en el virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1, uno de los virus de ARN de tipo I. Bolognesi y col. (documento 5.464.933) y los actuales inventores (Garry, documento USPN 5.567.805) nos muestran cómo puede inhibirse la muerte celular mediada por VIH introduciendo péptidos que se unen a porciones de la proteína de fusión de transmembrana del virión de VIH-1. La región de unión de DP178 de Bolognesi, marcado como FUZEON® en la figura 7, está principalmente dentro de la hélice C y está fuera de lo que en la presente solicitud se describe como la región de iniciación de fusión (FIR). Bolognesi demuestra la inhibición pero no presenta ningún procedimiento de inhibición. Los actuales inventores (Garry) mostraron previamente la inhibición en la región CS3 de TM del VIH-1, marcado como CS3 en la figura 7, pero no identificaron procedimiento de inhibición, lo que sugiere que sólo se inhibe la interacción CS3: receptor de CS3. El descubrimiento inesperado de la región FIR por los actuales inventores (como se describe actualmente en este documento) y el hecho de que las secuencias CS3 estén dentro de FIR indica que la unión CS3: receptor de CS3 descrita en el documento USPN 5.567.805 es de hecho una unión que se produce entre la porción CS3 de la FIR y porciones de la membrana celular por las cuales tiene afinidad la porción CS3 de FIR. Además, aunque Melikyan, Watanabe, Bewley y otros autores han descrito inhibición de la fusión con los péptidos introducidos, no han explicado los mecanismos mediante los cuales se produce la inhibición. Por consiguiente, la localización del péptido FUZEON® está alejado de la región FIR, lo que sugiere con fuerza que funcionan otros elementos del proceso de fusión en la región FUZEON®.

En referencia a lo anterior, está claro que existe la necesidad en la técnica de un medio más eficaz para identificar aquellas regiones de los virus que están implicadas en el proceso de infección y de composiciones eficaces para prevenir o inhibir la infección vírica. La invención descrita y divulgada en este documento proporciona una solución eficaz para estas necesidades.

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un péptido inhibidor de la fusión vírica aislado para utilizar

en el tratamiento de una infección por coronavirus, seleccionando el péptido entre el grupo compuesto por:

a) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta por la SEC ID n.º 2, y

5 b) un péptido que tiene una secuencia de aminoácido compuesta por 8 a 40 restos de aminoácidos contiguos de la SEC ID n.º 2.

10 El péptido puede ser un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º 24 o SEC ID n.º 25. Estos péptidos pueden incluir un grupo acetilo, un grupo carbobenzoxilo, un grupo dansilo, un grupo t-butiloxicarbonilo, un grupo hidrófobo o un grupo macromolecular en el extremo amino terminal del péptido. Adicionalmente, estos péptidos pueden incluir un grupo amido, un grupo hidrófobo o un grupo macromolecular en el extremo carboxilo terminal del péptido. La infección por coronavirus puede ser una infección por el virus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS).

15 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de un péptido como se define en el primer aspecto de la invención para la preparación de un medicamento para tratar una infección por coronavirus en un paciente. La infección por coronavirus puede ser una infección por el virus de SARS.

20 Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ADN recombinante que codifica un péptido definido en el primer aspecto anterior.

25 Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ADN recombinante que permite, o estimula, la producción en un paciente del péptido definido en el primer aspecto anterior para el tratamiento de una infección por coronavirus en un paciente. Este aspecto incluye el uso de una molécula de ADN recombinante que permite, o estimula, la producción en un paciente del péptido definido en el primer aspecto anterior para la preparación de un medicamento para tratar una infección por coronavirus en un paciente.

30 Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona un agente que inhibe la fusión vírica que comprende un péptido con una secuencia de aminoácidos compuesta por 8 a 50 restos de aminoácidos para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus en el que el péptido comprende una secuencia de aminoácidos de un péptido del primer aspecto anterior. El agente inhibidor de la fusión vírica puede incluir un grupo acetilo, un grupo carbobenzoxilo, un grupo dansilo, un grupo t-butiloxicarbonilo, un grupo hidrófobo o un grupo macromolecular en el extremo amino terminal del mismo. Adicionalmente, el agente inhibidor de la fusión vírica puede incluir un grupo amido, un grupo hidrófobo o un grupo macromolecular en el extremo carboxilo terminal del mismo. Este aspecto incluye el uso de un agente inhibidor de la fusión vírica de este aspecto para la preparación de un medicamento para tratar una infección por coronavirus en un paciente.

Realizaciones ilustrativas de la invención

40 El sexto dominio de los virus de ARN que tienen proteínas de fusión de membrana de clase I

45 Los arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus y retrovirus son las seis familias de virus de ARN actualmente identificados que tienen proteínas de la envoltura de fusión de membrana de clase I. Los actuales inventores (Garry) así como otros investigadores han mostrado previamente que las proteínas de fusión de estos virus de tipo I incorporan cinco motivos conservados o dominios (Carr y Kim, 1993; Gallaher y col., 1989; Suarez y col., 2000; Wilson, Skehel y Wiley, 1981). Estos dominios comprenden un péptido de fusión, una hélice H, una hélice C y un motivo aromático, todos ellos ectodominios, y un péptido de anclaje que es un endodominio.

50 Usando análisis por ordenador, modelos de estructura secundaria, cálculos de hidrofobicidad interfacial y otras técnicas, los actuales inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de un sexto dominio muy conservado que está presente en las proteínas de fusión de una amplia variedad de virus (en este documento se describe este sexto dominio). Los virus que poseen este dominio están incluidos en la lista anterior, aunque no necesariamente se limita a estas seis clases de virus de ARN. Para resaltar la función crítica de este dominio recientemente identificado, que es un ectodominio, el dominio se denomina en este documento como la región de iniciación de la fusión (FIR) de los virus.

Según se usa en este documento, el termino hélice alfa "extendida" se refiere a una hélice alfa que tiene más de cuatro "vueltas de hélice alfa" (especialmente, más de 14 aminoácidos).

60 En otras realizaciones se proporcionan "factores" que los inventores han encontrado de forma inesperado son eficaces en la prevención e inhibición de la infección vírica y/o de la fusión virus: célula.

65 Según se usa en este documento, el término "factores" incluye, pero sin limitaciones, péptidos aislados o segmentos peptídicos funcionales (o péptidos análogos de los mismos) de los dominios de la región de iniciación de fusión (FIR) descritos recientemente, péptidos miméticos ("péptido mimético" se refiere a cualquier compuesto o sustancia que podría servir como sustituto de un péptido que interacciona con la FIR, que es cualquier compuesto que mimetiza las

propiedades de un segmento funcional de la FIR), anticuerpos específicos para los dominios de FIR funcionales (es decir, anticuerpos idiotipo y antiidiotipo) y otros compuestos moleculares que interfieren con la unión y/o fusión virus: célula.

5 Según se usa en este documento el término "segmento funcional" o "fragmento funcional" de una región de iniciación de fusión (FIR) se refiere a un fragmento capaz de inhibir la fusión virus: célula, inhibiendo la infectividad vírica, capaz de inducir un anticuerpo capaz de reconocer y unirse específicamente a la FIR y/o interferir con la infección celular mediada por FIR.

10 Según se usa en este documento, un "análogo de péptido" o "péptido modificado" se define preferiblemente como un péptido de FIR modificado para contener un grupo amino, un grupo acetilo, un grupo hidrófobo (por ejemplo, carbobenzoxilo, dansilo o t-butiloxicarbonilo) y un grupo portador macromolecular (por ejemplo, conjugado lípido, polietilenglicol, un hidrato de carbono o una proteína) en el extremo amino terminal. Una clase adicional de análogos de péptidos de FIR contiene un grupo carboxilo, un grupo amido, un grupo hidrófobo o un grupo portador macromolecular en el extremo carboxilo terminal. Otros análogos de péptidos se definen como péptidos de FIR en los que al menos un enlace que se une a restos aminoacídicos adyacentes es un enlace no peptídico (por ejemplo, un enlace imido, éster, hidrazina, semicarbazoido o azo), un péptido en el que al menos un resto de aminoácido está en configuración de isómero D o un péptido en el que se ha invertido el orden de los aminoácidos. Análogos de péptidos adicionales son péptidos de FIR que comprenden al menos una sustitución de aminoácido en el que un primer resto aminoacídico se sustituye por un segundo resto aminoacídico diferente (la sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservada o una sustitución no conservada). Según se usa en este documento, dichos análogos de péptido puede comprender secuencias de aminoácidos análogas en las que las secuencias análogas contienen una mayoría de aminoácidos idénticos o químicamente similares en el mismo orden que las secuencias principales.

25 Según se usa en este documento, el término "región de iniciación de fusión" (FIR) generalmente se refiere a una región de una proteína de fusión vírica implicada en la etapa o etapas iniciales de la infección vírica y/o fusión con una célula huésped.

30 Según se usa en este documento, el término "péptido mimético" incluye, pero sin limitaciones, compuestos orgánicos u otros compuestos químicos que mimetizan la estructura o función del péptido de FIR. Entre los ejemplos de péptidos miméticos se incluyen, pero sin limitaciones, compuestos orgánicos que comprenden los grupos laterales funcionales de un aminoácido o péptido pero carecen de la estructura carbono/nitrógeno o de enlaces peptídicos. Péptido mimético también se refiere a compuestos que mimetizan la acción de estos grupos laterales funcionales con otros restos.

35 Otras moléculas, como anticuerpos idiotipo o antiidiotipo o proteínas seleccionadas mediante procedimientos de despliegue de fagos, que se unen a los péptidos, análogos de péptidos o miméticos de péptidos descritos en la presente solicitud también pueden funcionar con inhibidores de la infección vírica y/o fusión virus: célula. La presente invención también contempla plásmidos, o virus recombinantes, u otras moléculas o compuestos que permiten o estimulan al paciente a producir un análogo de los compuestos inhibidores. Por ejemplo, una proteína recombinante, producido en una bacteria, hongo o célula de mamífero genéticamente modificada puede usarse para producir un análogo inmunogénico de la FIR de una proteína de fusión vírica. De forma similar, podría inducirse una respuesta antiidiotipo en el individuo usando una proteína genéticamente modificada que comprende una secuencia que se corresponde con el sitio de unión de un anticuerpo específico de FIR.

40 Según se usa en este documento, el término "péptido de fusión" preferiblemente se refiere a una secuencia hidrófoba en el extremo amino terminal, o próximo, de una proteína de fusión vírica de clase I (véase, Gallaher y col., 1987; 1992).

50 Según se usa en este documento el término péptido o análogo de péptido "sustancialmente purificado" se refiere preferiblemente a un péptido o análogo de péptido que está puro a más del 80 %. Más preferiblemente, "sustancialmente purificado" se refiere a un péptido o análogo de péptido que está puro a más de aproximadamente el 90 % o puro a más del 95 %. Más preferiblemente, se refiere a un péptido o análogo de péptido que está puro a más del 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Funcionalmente, "sustancialmente purificado" significa que está libre de contaminantes a un nivel que lo hace adecuado para los fines proporcionados en este documento. Los procedimientos para evaluar la pureza son bien conocidos por los expertos en la materia. Entre los procedimientos adecuados se incluyen, pero sin limitaciones, cromatografía de gas (CG) unida a espectrofotometría de masas, análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y ensayos funcionales en sistemas de cultivo celular en los que, entre otros, se evalúa la citotoxicidad.

Según se usa en este documento el término "análogo estable" se refiere a un péptido que tiene una semivida farmacológicamente activa en sistemas biológicos. Se contemplan semividas biológicas superiores a los 60 minutos.

65 Según se usa en este documento, el término "derivado peptídico" se refiere a un péptido que tiene aminoácidos sustituidos diferentes a los de la secuencia FIR de una proteína de fusión vírica. En el que las sustituciones no

hacen que el péptido sea inútil para la presente invención.

Según diversos aspectos de la presente realización de la invención los péptidos, las secuencias de ácido nucleico aisladas o los anticuerpos pueden producirse por cualquier sistema conocido en la materia, pero sin limitaciones, de síntesis química, procedimientos de ADN recombinante y combinaciones de los mismos.

Según se define en este documento, la presente invención proporciona composiciones y usos para tratar o prevenir la infección por un coronavirus. Un posible mecanismo por el cual la presente invención puede prevenir y/o inhibir la infección es mediante la interferencia con la fusión virus: célula mediada por FIR.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se muestran los dominios de las proteínas de fusión de un miembro de cada una de estas seis familias víricas (en concreto, coronavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus y retrovirus). Los círculos en la figura 1 muestran la localización aproximada de la FIR en cada virus mostrado.

En las figuras 2 a 7 se muestran las secuencias de aminoácidos de estas proteínas de fusión (correspondientes a las SEC ID n.º 16 – 21, respectivamente) y una representación esquemática de su estructura ectópica. Específicamente, se muestran los cinco dominios descritos previamente que constituyen el péptido de fusión, es decir la hélice N, la hélice C, el motivo aromático (si está presente) y el péptido de anclaje. También se identifica el sexto dominio recién descubierto, la región de iniciación de fusión o FIR. Cada FIR se incide con un polígono en las figuras 2 a 7.

El área rodeada con un círculo detrás de las proteínas de fusión en cada una de las figuras 2 – 7 representa la proteína de unión virus: célula (PUVC) principal del virus. La PUVC normalmente interacciona con la porción de la proteína de fusión que está más alejada de la membrana del virus y, por tanto, se muestra en esta posición en las figuras. A diferencia de la proteína de fusión altamente conservada, la PUVC de cada familia de virus es más divergente. Normalmente es la PUVC la que dicta la gama de huéspedes del virus y determina qué tipos de células del huésped son objetivo para la infección. La PUVC actúa en su capacidad para reconocer y unirse con proteínas específicas de la superficie celular. La unión de la PUVC a las proteínas celulares objetivo se produce antes y típicamente es un requisito previo para la fusión virus: célula.

Figura 8: inhibición de la infectividad de los coronavirus mediante péptidos de la región de iniciación de fusión. Entre 50 y 100 UFP de la cepa A59 del virus de la hepatitis de ratón o de la cepa Urbani del coronavirus del SARS se incubaron previamente con o sin el péptido indicado (~ 100 µM) en DMEM sin suero durante 1 h. A continuación, las células se expusieron al inóculo tratado con el péptido o a un control del vehículo (no peptídico). Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino 1x y éstas se recubrieron con DMEM que contenía SFT al 10 % y agarosa al 0,5 %. A las 48 horas de la infección, las monocapas infectadas se fijaron y tiñeron con cristal violeta para determinar el número de placas.

Figura 9: inhibición de la infectividad del virus de Lassa mediante péptidos de la región de iniciación de fusión. Se incubaron previamente entre 50 y 100 UFC del virus de Lassa con o sin los péptidos indicados (~ 100 µM) en BME sin suero durante 1 h. A continuación, las células se expusieron al inóculo tratado con el péptido o el control del vehículo (sin péptido). Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino 1x y éstas se recubrieron con BME que contenía SFT al 5 %, HEPES 10 Mm y agarosa al 0,5 %. Cuatro días después de la infección, se aplicó un segundo recubrimiento que contenía rojo neutro al 5 % y las placas se contaron 24 horas después.

Las seis familias de virus de ARN en las que hoy en día se sabe que tienen proteínas de fusión de membrana de clase I (virus de tipo I) y los miembros representativos de cada familia son los siguientes:

Virus de ARN representativos que tienen proteínas de fusión de membrana de clase I (virus de tipo I)

Familia	Virus representativo	Mostrado en las figuras
Arenavirus	Virus de Lassa	Sí
	Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)	No
	Virus de Junín	No
	Virus de Machupo	No
	Virus de Guanarito	No
	Virus de Sabia	No
Coronavirus	Virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS)	Sí

	Virus de la hepatitis murina (VHM)	No
	Coronavirus bovino	No
	Coronavirus canino	No
	Virus de la peritonitis infecciosa felina	No
Filovirus	Virus del Ébola	Sí
	Virus de Marburgo	No
Ortomixovirus	Virus de la gripe A	Sí
	Virus de la gripe B	No
	Virus de la gripe C	No
Paramixovirus	Virus del sarampión	Sí
	Virus de las paperas	No
	Virus del moquillo	No
	Virus de la enfermedad de Newcastle	No
Retrovirus	Virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1)	Sí
	Virus de la inmunodeficiencia humana 2 (VIH-2)	No
	Virus linfotrófico de células T humanas 1 (HTLV-1)	No
	Virus linfotrófico de células T humanas 2 (HTLV-2)	No
	Partícula de tipo A intracisternal humana 1 (HIAP-1)	No
	Partícula de tipo A intracisternal humana 2 (HIAP-2)	No

Los virus mostrados en las figuras son los siguientes:

Ejemplos de virus de ARN que tienen proteínas de fusión de membrana de clase I (virus de tipo I)

5

Figura	Familia	Virus mostrado	Proteína mostrada
Figura 2	Arenavirus	Virus de Lassa	GP2
Figura 3	Coronavirus	Virus del SARS	S
Figura 4	Filovirus	Virus del Ébola	GP2
Figura 5	Ortomixovirus	Virus de la gripe A	HA2
Figura 6	Paramixovirus	Virus del sarampión	F1
Figura 7	Retrovirus	VIH-1	TM

Listado de secuencias de los ejemplos de proteínas de fusión de membrana de clase I (virus de tipo I)

GP2 de LASSA (Número de acceso a Genbank: A43492, aminoácidos 257 – 490)

10

```

LLGT FTWTLSDSEG NETPGGYCLT RWMLIEAELK CFGNTAVAKC
NEKHDEBFCD MLRLDFDNKQ AIRRLKTEAQ MSIQLINKAV NALINDQLIM
KNHLRDIMGI PYCNYSRYWY LNHTSTGKTS LPRCWLISNG SYLNETKFS
DIEQQADNMI TEMPLQKEYID RQKTPGLLV DLFVFSFSFY LISIFLHLVK
IPTHRHIIVGK PCPKPHRLNH MGICSCGLYK QPGVPVRWKR (SEQ ID NO:16)
    
```

S del SARS (Número de acceso a Genbank: AAQ9406, aminoácidos 864 – 1256)

WTF GAGAALQIPF AMQMAYRFNG IGVTQNVLYE NQKQIANQFN
 KAISQIQESL TTTSTALGKL QDVVNQNAQA LNTLVKQLSS NFGAISSVLN
 DILSRLDKVE AEVQIDRLIT GRLQSLQTYV TQQLIRAAEI RASANLAATK
 MSECVLGQSK RVDFCGKGYH LMSFPQAAPH GVVFLHVTYV PSQERNPTTA
 PAICHBGKAY FPREGVFVFN GTSWFITORN FFSPQIITD NTFVSGNCDV
 VIGIINNTVY DPLQPELDSF KEELDKYFKN HTSPDVDLGD ISGINASVVN
 IQKEIDRLNE VAKNLNESLI DLQELGKYEQ YIKWPWYVWL GFIAGLIAIV
 MVTILLCCMT SCCSCLKGAC SCGSCCKFDE DDSEPVKGV KLHYT (SEQ ID NO:17)

GP2 del ÉBOLA (Número de acceso a Genbank: AAM76034, aminoácidos 502 – 676)

EAIVNAQPK CNPNLHYWTF QDEGAAIGLA WIPYFGPAAE GIYTEGLMHN
 QDGLICGLRQ LANETTQALQ LFLRATTEL RFSILNRKAI DFLLRQWGGT
 CHILGPDCCI EPHDWTKNIT DKIDQIIHDF VDKTLPDQGD NDNWNTGWRQ
 WIPAGIGVTG VIIAVIALFC ICKFVF (SEQ ID NO:18)

HA2 de la GRIPE (Número de acceso a Genbank: P03437, aminoácidos 346 – 566)

GLFGA IAGFIENGWE GMIDGWYGFR HQNSEGTGQA ADLKSTQAAI
 DQINGKLN RV IEKTNEKFKHQ IEKEFSEVEG RIQDLEKYVE DTKIDLWSYN
 AELLVALENQ HTIDLFDSEM NKLFEKTRRQ LRENAEMGN GCFKIYHKCD
 NACIESIRNG TYDHDVYRDE ALNRFQIKG VELKSGYKDW RCNICI (SEQ ID
 NO:19)

F1 del SARAMPIÓN (Número de acceso a Genbank: VGNZMV, aminoácidos 116 – 553),

FAGVV LAGAALGVAT AAQITAGIAL HQSMLNSQAI DNLRASLETT
 NQAIRAIRQA GQEMILAVQG VQDYINNELI PSMNQLSCDL IGQKLGKLL
 RYYTEILSLF GPSLRDPISA BISIQALSVA LGGDINKVLE KLGYSGGDLL
 GILESRGIKA RITHVDTESY FIVLSIAYPT LSEIKGVIVH RLEGVSYNIG
 SQEWYTTVPK YVATQGYLIS NFDSSCTFM PEGTVCSQNA LYPMSPLLQE
 CLRGSTKSCA RTLVSQSGFGN RFILSQGNLI ANCASILCKC YTTGTIINQD
 PDKILTYYIAA DHCPVVEVNG VTIQVGSRRY PDAVYLHRID LGPPISLERL
 DVGTNLGNAI AKLEDAKELL BSSDQILRSM KGLSSTSIVY ILIAVCLGGL
 IGIPALICCC RGRCNKKGEQ VGMSRPGLKP DLTGTSKSYV RSL (SEQ ID NO:20)

TM del VIH (Número de acceso a Genbank: AAB50262, aminoácidos 512 – 710)

AVGIGALFL GFLGAAGSTM GAASMTLTVQ ARQLLSGIVQ QQNNLLRAIE
 AQQHLLQLTV WGIKQLQARI LAVERYLKDQ QLLGIWCSG KLICTTAVPW
 NASWSNKSLE QIWNHTTWME WDREINNYTS LIHSLIEESQ NQOEKNEQEL
 LELDKWASLW NWFNITNWLW YIKLFIMIVG GLVGLRIVFA VLSIVNRVRQ (SEQ ID
 NO:21)

Procedimiento de identificación de la región FIR

Con fines de referencia, se describe el siguiente procedimiento para identificar dentro de las proteínas de fusión de virus un motivo conservado. El motivo conservado de las regiones FIR de diferentes virus tendrá una estructura y función similares. Adicionalmente, las regiones FIR de los virus relacionados pueden tener, aunque no necesariamente, secuencias primarias de aminoácidos muy similares.

Como se describe anteriormente, la presente invención proporciona composiciones útiles para prevenir o inhibir la infección vírica por coronavirus usando péptidos, anticuerpos o ácidos nucleicos aislados dirigidos frente a la FIR específica de coronavirus y que interfieren con la función de dicha FIR.

La FIR de una proteína de fusión vírica puede identificarse mediante un procedimiento como el siguiente que comprende las siguientes etapas:

- 5 1) La secuencia de la proteína de fusión se puede identificar mediante un método como el que se describe a continuación, en el que se hace coincidir primero con la estructura de la proteína de fusión de membrana de VIH, que comprende la hélice N, la hélice C y otros dominios previamente descritos, para identificar la hélice N y la hélice C en la proteína de fusión en cuestión. Este proceso de coincidencia se facilita mediante la búsqueda de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína para dos o más cisteínas que sean propensas a formar al menos un lazo unido covalentemente, que estará presente en la mayoría de estas secuencias, pero no en todas. A continuación la hélice N puede identificarse en la región que precede a este lazo de cisteína examinado en dicha región la presencia de aminoácidos cargados y de otros aminoácidos que tienen la propensión a formar una hélice alfa (por ejemplo, glutamina (Q), alanina (A), triptófano (W), lisina (K) y leucina (L)).
- 10
- 15 2) A continuación, se identifica el extremo amino terminal de la FIR en la hélice N. Este extremo normalmente estará dentro de los 10 a 20 aminoácidos finales de la hélice N y tendrá un núcleo compuesto típicamente por tres o cuatro aminoácidos hidrófobos (como leucina (L) o alanina (A)), un aminoácido cargado positivamente (como lisina (K) o arginina (R)), un aminoácido cargado negativamente (como glutamato (E)) y un aminoácido aromático (como tirosina (Y)).
- 20
- 3) A continuación se identifica el extremo carboxilo terminal de la FIR. En el caso de todas las familias, excepto los coronavirus y los paramixovirus, este extremo terminal es el extremo carboxilo terminal de la primera secuencia peptídica con hidrofobicidad interfacial positiva que se encuentra más allá de la hélice N. Este extremo terminal se localiza normalmente más allá del lazo de cisteína, si este último está presente y, en ocasiones, solapa con la hélice C o está colocado en la hélice C. Las secuencias de hidrofobicidad interfacial positiva tienen un alto porcentaje de aminoácidos aromáticos (como triptófano (W), fenilalanina (F) y tirosina (Y)) y de aminoácidos hidrófobos pequeños (como glicina (G)). El grado de hidrofobicidad interfacial de estas secuencias puede determinarse usando la escala de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White, preferiblemente con un programa de ordenador como el programa MPEX que incorpora esta escala (la "hidrofobicidad interfacial" es una medida de la capacidad del péptido para transferirse de una solución acuosa a la interfaz de la bicapa de la membrana y se basa en la escala hidrofobicidad del residuo completo de Wimley-White determinada experimentalmente (Jaysinghe, Hristova y White, 2000)). Los programas de ordenador que usan esta escala pueden identificar una secuencia peptídica de una cadena peptídica que tiene puntuaciones de hidrofobicidad interfacial positivas y, por tanto, el que se asocia con mayor probabilidad a la superficie de las membranas). Véase el ejemplo 1 como ejemplo de la aplicación de este procedimiento a la identificación de la FIR en el virus del Ébola.
- 25
- 30
- 35

En el caso de los coronavirus, que tienen hélices alfa más largas y una escala generalmente mayor y de los paramixovirus en los que la FIR es discontinua debido a una inserción de secuencia no FIR, el extremo carboxilo terminal de la FIR es el extremo carboxilo terminal de la segunda secuencia peptídica con hidrofobicidad interfacial positiva que se encuentra más allá de la hélice N. La secuencia entre la hélice N y la hélice C en la proteína F1 de los paramixovirus es más larga que las secuencias interhelicoidales de otros virus con proteínas de fusión vírica de clase I. La proteína F2 de los paramixovirus, que cumple una función de unión al receptor es, por consiguiente, más corta. Tras la inspección de modelos de ordenador, es obvio para los expertos en la materia que la proteína F1 contiene una secuencia insertada entre la hélice N y la hélice C. Por consiguiente, la FIR de paramixovirus contiene dos lazos de cisteína y dos secuencias de alta hidrofobicidad interfacial, y es discontinua debido a aminoácidos adicionales que son característicos sólo de los paramixovirus y aparecen entre la hélice N y la primera secuencia de hidrofobicidad interfacial alta está excluida de la región FIR.

50 SECUENCIAS FIR

La secuencia de la proteína de fusión y de FIR para cada uno de los seis virus representativos mostrados en las figuras 2 a 7 se recoge en la figura respectiva y en el listado de secuencias proporcionado a continuación (Las SEC ID n.º 16 a SEC ID n.º 21 proporcionan las respectivas proteínas de fusión y las SEC ID n.º 1 a SEC ID n.º 7 proporcionan las respectivas FIR). Aunque existen algunas variaciones de secuencia menores entre los virus hermanos dentro de cada una de estas seis familias, la FIR de cualquier virus de tipo I puede identificarse fácilmente usando la secuencia representativa proporcionada en la figura apropiada.

Procedimientos de inhibición de la fusión en estos virus

60 La presente invención proporciona composiciones según se define en las reivindicaciones que inhiben la fusión virus: célula interfiriendo en la función de la FIR. Diversos aspectos de estas realizaciones incluyen dirigirse hacia las regiones FIR con péptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos aislados según se define en este documento para interferir en la fusión virus: célula. En la presente invención los péptidos constan de una secuencia SEC ID n.º 2 o una secuencia de 8 a 40 residuos aminoacídicos contiguos de la SEC ID n.º 2 de esta longitud ya que es necesario proporcionar una inhibición eficaz de la infección vírica por coronavirus. Según se usa en este documento, el término "de una longitud necesaria para proporcionar una inhibición eficaz" del virus se refiere preferiblemente a una

longitud suficiente para proporcionar una reducción de 5 veces o superior en la infectividad vírica cuando se usa según la presente invención. Los procedimientos para cuantificar la reducción de la infectividad vírica son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las reducciones de la actividad vírica pueden determinarse mediante reducción de placa, inhibición de la unión, ensayos de reducción del valor o mediante estudios de estimulación en animales.

Los péptidos de FIR de la SEC ID n.º 2 o fragmentos de la misma, contempladas como parte de la presente invención son como se define en las reivindicaciones. Las secuencias siguientes se muestran a fines de comparación con la SEC ID n.º 2.

LASSA

X-LIMKNHLRDIMGIPYCNYSRYWYLNHTSTGKTLPRCWLI-Z (SEC ID n.º 1)

SARS

**X-LIRAAETRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPH
GVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVFNQTSWFITQRNFFS-Z (SEQ ID
NO:2)**

ÉBOLA

X-LRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCI-Z (SEC ID n.º 3)

GRIPE

X-IQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTSEMKNLF-Z (SEC ID n.º 4)

SARAMPIÓN

X-LGLKLLRYYTRILSLFG-Z (SEQ ID NO:5)

**X-WYTTVPKYVATQGYLISNFEDESSCIFMPEGTVCSQNALYFMSPLLQE
CLRGSTKSCARTLVSGSFGNRFILSQGNLIANCASILCKCYTTGTII-Z (SEQ ID NO:6)**

("---" indica que la FIR del virus del sarampión es discontinua).

VIH

**X-LQARILAVERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLE
QIWNHITWMEWD-Z (SEQ ID NO:7)**

En cada una de las secuencias anteriores la "X" y la "Z" designan respectivamente los extremos amino o carboxilo terminales del péptido o un resto adicional, como se describe a continuación.

Los péptidos de la SEC ID n.º 2 proporcionados por la presente invención tienen la secuencia de una región FIR. La región FIR es de un virus que pertenece a la familia vírica de los coronavirus en la que se incluyen el virus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS), virus de la hepatitis murina (MHV), el coronavirus bovino, el coronavirus canino y el virus de la peritonitis infecciosa felina.

Otros aspectos de esta realización de la invención es proporcionar las secuencias SEQ ID n.º 24 o 25 que comprenden un fragmento funcional de una secuencia FIR o secuencias análogas a la misma en un virus que pertenece a la familia vírica de los coronavirus en la que se incluyen el virus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS), virus de la hepatitis murina (MHV), el coronavirus bovino, el coronavirus canino y el virus de la peritonitis infecciosa felina.

Los péptidos derivados pueden comprender secuencias alteradas en las que restos de aminoácidos funcionalmente

equivalentes se sustituyen por restos dentro de la secuencia lo que tiene como resultado un cambio sinónimo. Por ejemplo, pueden sustituirse en la secuencia uno o más restos de aminoácidos por cualquier otro aminoácido de polaridad similar, que actúan como equivalente funcional, dando lugar a una alteración sinónima (por ejemplo sustitución de leucina por isoleucina). Los sustitutos para un aminoácido de la secuencia pueden seleccionarse entre otros miembros de la clase de aminoácidos a la que pertenece. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) son alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Entre los aminoácidos polares neutros se incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) son arginina, lisina e histidina. Entre los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) se incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. A modo de ejemplo adicional, y no como limitación, estos péptidos pueden también comprender aminoácidos D y/o pueden comprender una proteína portadora no eficaz o ninguna clase de proteína portadora.

Los péptidos FIR pueden comprender péptidos en los que "X" comprende un grupo amino, un grupo acetilo, un grupo hidrófobo o un grupo portador macromolecular y/o "Z" comprende un grupo carboxilo, un grupo amido, un grupo hidrófobo o un grupo portador macromolecular. El resto "X" también puede seleccionarse entre el grupo compuesto por un resto hidrófobo, un resto carbobenzoxilo, un resto dansilo y un resto t-butiloxicarbonilo. El resto "Z" puede seleccionarse entre el grupo compuesto por un resto hidrófobo y un resto t-butiloxicarbonilo.

El resto "X" puede comprender un grupo portador macromolecular. Este grupo portador macromolecular puede seleccionarse entre el grupo compuesto, pero sin limitaciones, por un conjugado lipídico, un resto de polietilenglicol o un resto de hidrato de carbono. De forma similar, la "Z" también puede comprender un grupo transportador macromolecular, donde dicho transportador macromolecular se selecciona entre el grupo compuesto por, pero sin limitaciones, un conjugado lipídico, un resto de polietilenglicol o un resto de hidrato de carbono.

Uno o más de los enlaces moleculares que unen restos de aminoácidos adyacentes pueden ser enlaces no peptídicos. Estos enlaces no peptídicos incluyen, pero sin limitaciones, enlaces imido, éster, hidrazina, semicarbazoido y azo.

El péptido puede comprender uno o más restos de aminoácidos que estén en un aminoácido isómero D.

El péptido puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos en las que un primer resto de aminoácido se sustituye por un segundo resto de aminoácido diferente en las secuencias proporcionadas anteriormente (o un segmento funcional de las mismas). En diversos aspectos de esta realización, la sustitución de aminoácido es una sustitución conservadora. En otros aspectos de esta realización, la sustitución de aminoácido es una sustitución no conservadora. Aún en otros aspectos de esta realización de la invención se proporcionan péptidos como se describe anteriormente excepto porque se han eliminado uno o más restos de aminoácidos.

En diversos aspectos preferidos de las actuales realizaciones, los péptidos FIR de la invención comprenden de 8 a 40 restos contiguos de una FIR. Según se usa en este documento, el término "péptidos inhibidores de FIR" se refiere preferiblemente a un péptido o péptidos que tienen la secuencia de una FIR (o segmento funcional de la misma) y a dichos péptidos FIR o segmentos funcionales en los que uno o más aminoácidos están sustituidos por aminoácidos funcionalmente equivalentes o químicamente similares (véase a continuación). También se refiere a derivados de estos péptidos incluyendo pero sin limitaciones, derivados benzilados, derivados glucosilados y péptidos que incluyen enantiómeros de aminoácidos naturales. En un aspecto preferido de esta realización, los péptidos tienen la secuencia de SEC ID n.º 24 o 25.

Aún en otros aspectos de esta realización de la invención, los péptidos FIR pueden estar unidos a una molécula transportadora como una proteína incluyendo, pero sin limitaciones, albúmina de suero humano (HSA).

Además, la presente invención contempla moléculas que comprenden cualquier combinación de los restos X y Z y/o las modificaciones de otros péptidos descritas anteriormente.

Los péptidos según la presente invención pueden producirse a partir de proteínas víricas naturales o recombinantes. También pueden producirse usando técnicas convencionales de ADN recombinante (por ejemplo, la expresión del péptido mediante un microorganismo que contiene la molécula de ácido nucleico recombinante que codifica el péptido deseado, expresada bajo el control de un promotor transcripcional adecuado y la recogida del péptido deseado a partir de dicho microorganismo). En un aspecto preferido de la invención, puede prepararse cualquiera de los péptidos de la invención usando cualquier metodología de síntesis química conocida en la materia incluyendo, pero sin limitaciones, la síntesis en fase sólida de Merrifield (Clark-Lewis y col., 1986, Science 231: 134 – 139).

Las realizaciones de la presente invención también proporcionan anticuerpos útiles para tratar o prevenir la infección de una célula por un virus. Los anticuerpos incluyen fragmentos activos de los mismos, lo que significa porciones de anticuerpos capaces de reconocer específicamente una región FIR o un segmento funcional de la misma. Los anticuerpos reconocen específicamente una FIR, o fragmento antigénico de la misma, para prevenir o reducir la infección de la célula por el virus. Los anticuerpos según estas realizaciones de la invención pueden ser monoclonales o policlonales.

Los procedimientos generales para producir anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos para producir anticuerpos según la presente invención comprenden las etapas de (i) proporcionar un antígeno que comprende una FIR o un fragmento antigénico de la misma (este antígeno puede ser un péptido no modificado o un derivado de péptido); (ii) exponer el sistema inmunitario de un animal al antígeno de modo que se induzca una respuesta inmunitaria, (iii) recoger los anticuerpos del animal e identificar aquellos anticuerpos que reconocen específicamente una FIR (o fragmento funcional de la misma) y/o son capaces de inhibir o reducir la infección virus: célula en forma de respuesta a dosis en ensayos en los que se mide la infectividad vírica.

Según diversos aspectos de la presente invención, los péptidos y/o anticuerpos de la presente invención útiles para tratar o prevenir la infección vírica de una célula pueden estar dirigidos frente a los aminoácidos de alrededor o del interior del lazo de cisteínas de FIR, la porción distal de la hélice N de FIR, cualquiera de las regiones de hidrofobicidad interfacial de la FIR, otras áreas de la FIR o cualquier combinación de las mismas. Estos anticuerpos o péptidos (colectivamente compuestos) pueden usarse individualmente; de forma alternativa pueden usarse combinaciones de dos o más para prevenir o inhibir la infección de la célula por el virus. Entre los procedimientos para prevenir o inhibir la infección vírica de la célula interfiriendo con la función de las FIR proporcionada en la presente invención también se incluye el uso de anticuerpos neutralizantes, producidos exógena o endógenamente, frente a toda o partes de la región FIR. El objetivo de este uso es interferir con la función de la FIR, inhibiendo así la infección vírica de la célula y/o la fusión virus: membrana celular.

Otras realizaciones de la presente invención proporcionan composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas que comprenden alguno y todos los péptidos (incluyendo derivados de los mismos) o anticuerpos. Esto incluye, pero sin limitaciones, composiciones que contienen cualquier molécula que comprende, esencialmente consta o consta de una FIR de SEC ID n.º 2 o un segmento funcional de una FIR. Esto incluye además, pero sin limitaciones, composiciones que comprenden cualquier compuesto que específicamente reconoce, se une o interfiere con la función de una FIR vírica. Según se usa en este documento, la frase “que interfiere con la función de la FIR” significa que un compuesto interacciona con la FIR o con la proteína celular que sirve como el receptor que reconoce la FIR, de modo que previene o reduce la infección de la célula por el virus. Adicionalmente, se contempla que las composiciones puedan comprender cualquiera de las moléculas descritas o mezclas de una o más de estas moléculas.

Realizaciones adicionales de la presente invención proporcionan usos de compuestos de la invención para tratar o prevenir la infección de una célula por un coronavirus. Diversos aspectos de esta realización de la invención proporcionan una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento para su uso en la administración a un paciente que se sospecha ha estado expuesto a un coronavirus (o que tiene la posibilidad de verse expuesto a un coronavirus). En diversos aspectos de la invención, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo que reconoce específicamente y se une a una FIR de SEC ID n.º 2 (o un segmento funcional de una FIR) o un fragmento de dicho anticuerpo que reconoce específicamente y se une a una FIR, o a un segmento funcional de una FIR.

Aún otros aspectos de esta realización de la invención como se define en las reivindicaciones proporcionan una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una molécula de ADN recombinantes, en la que el ADN codifica una FIR de SEC ID n.º 2 (o un segmento funcional de la misma) de modo que se previene o reduce la infección por un coronavirus. En un aspecto preferido de esta realización la molécula de ADN recombinante y/o la composición farmacéutica demás comprenden los elementos necesarios para que la proteína codificado por la molécula de ADN se exprese en una célula humana. A modo de ejemplo no exclusivo, en determinados aspectos de esta realización de la invención, la molécula de ADN es parte de un plásmido recombinante o de un virus recombinante.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de la FIR en el virus del Ébola

El procedimiento para identificar la FIR de las proteínas de fusión vírica de clase I puede ilustrarse mediante dos ejemplos. El primer ejemplo es la identificación de la FIR en la proteína de fusión de clase I mínima glucoproteína 2 (GP2) del virus del Ébola, un filovirus. Los límites de la hélice N y de la hélice C de la GP2 del virus del Ébola se han determinado mediante procedimientos de cristalografía de rayos X (Malashkevich y col., 1999). Los aminoácidos terminales de la hélice N contienen la secuencia ILNRKAIDF (SEC ID n.º 8) que coincide con la secuencia consenso de un núcleo que comprende tres o cuatro aminoácidos hidrófobos, un aminoácido cargado positivamente, un aminoácido cargado negativamente y un aminoácido aromático. Entre estas dos hélices hay dos cisteínas en la secuencia CHILGPDC (SEC ID n.º 9). Definiendo los extremos de la FIR de la GP2 del virus del Ébola está la secuencia FLLQRWGGTCHILGPDCI (SEC ID n.º 10), que tiene una puntuación de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White de 2,59 según se determina por el programa MPEX (Jaysinghe y col., 2002). Por tanto, la FIR de la GP2 del virus del Ébola abarca los aminoácidos 579 a 610.

Ejemplo 2: Identificación de la FIR en el virus del sarampión

El ejemplo segundo es una proteína de fusión de clase I compleja, la proteína F1 del virus del sarampión, un paramixovirus. Las hélices N y C de F1 del virus del sarampión pueden identificarse examinando la secuencia primaria en busca de aminoácidos con propensión a formar hélices. El alineamiento de la secuencia principal de F1 del virus del sarampión con la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína F1 de otro paramixovirus, F1 del virus de la enfermedad de Newcastle, también puede ayudar a la identificación de los límites de la hélice. La estructura de la proteína F1 del virus de la enfermedad de Newcastle se ha determinado mediante procedimientos de cristalografía de rayos X (Chen y col., 2001). Por tanto, puede predecirse que límites de las hélices H y C son los aminoácidos 131 – 217 y 455 – 491, respectivamente. Al contrario que la GP2 del virus del Ébola y la mayoría de las proteínas de fusión víricas de clase I, la secuencia primaria entre las hélices N y C en el virus del sarampión es mayor de 100 aminoácidos. La región FIR de la F1 del virus del sarampión contiene una inserción que, tras la inspección de modelos de ordenador, es obvia para los expertos en la materia y, por tanto, la estructura de la región FIR está formada por un ordenamiento secundario que une dos partes de la secuencia primaria. La secuencia insertada forma un lazo externo a la FIR. Los aminoácidos terminales de la hélice N contienen la secuencia LKLLRYYTE (SEC ID n.º 11) que coincide con la secuencia consenso de un núcleo que comprende tres o cuatro aminoácidos hidrófobos, un aminoácido cargado positivamente, un aminoácido cargado negativamente y un aminoácido aromático. En la F1 del virus del sarampión hay ocho restos de cisteína entre las hélices N y C. En base al alineamiento con F1 del virus de la enfermedad de Newcastle, puede determinarse que las primeras dos cisteínas y las dos siguientes forman lazos unidos mediante puentes disulfuro. El primer par de cisteínas en la secuencia, CTFMPEGTVC (SEC ID n.º 12), es parte de la FIR ya que está unido mediante una secuencia WYTTVPKYVATQGYLISNF (SEC ID n.º 13) con una puntuación de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White de 3,36 según se determina mediante el programa MPEX. El segundo par de cisteínas en la secuencia, CLRGSTKSC (SEC ID n.º 14), también es parte de la FIR ya que es adyacente a la secuencia TLVSGSFGNRFILSQGNLIANCASILCKCYTTGTII (SEC ID n.º 15) con una puntuación de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White de 2,54 según se determina mediante el programa MPEX. Por tanto, la FIR de la F1 del virus del sarampión abarca de los aminoácidos 205 a 407, representando los aminoácidos 221 a 314 una inserción de no participa en la función de FIR.

Ejemplo 3: Identificación de péptidos inhibidores de la fusión del coronavirus.

Antecedentes

El síndrome respiratorio agudo severo (SARS) es una enfermedad recién reconocida que se extendió desde el sur de China entre finales de 2002 y principio de 2003 a varios países de Asia, Europa y Norteamérica (Guan y col., 2004), el SARS normalmente empieza con fiebre superior a 38 °C. Entre los síntomas iniciales también pueden incluirse cefalea, malestar general y síntomas respiratorios leves. Entre dos días y una semana, los pacientes con SARS pueden desarrollar tos seca y tener problemas para respirar. Los pacientes en estadios más avanzados del SARS desarrollan neumonía o síndrome de dificultad respiratoria. En el brote inicial se detectaron 8098 casos en todo el mundo, con una mortalidad global del 9,6 %. Se ha demostrado que un coronavirus no identificado previamente (CoV) es la causa de la nueva enfermedad (Poutanen y col., 2003; Peiris y col., 2003; Drosten y col., 2003; Rota y col., 2003; Mara y col., 2003). Las intervenciones en salud pública, como vigilancia, restricciones en los viajes y cuarentenas, contuvieron la propagación original del CoV del SARS en 2003, y de nuevo se detuvo la propagación del SARS tras la aparición de algunos casos nuevos en 2004. Sin embargo, se desconoce si estas medidas draconianas de contención pueden mantenerse en cada aparición del CoV del SARS en humanos. Adicionalmente, es obvio el potencial de este nuevo y, en ocasiones, letal CoV como amenaza bioterrorista.

Los coronavirus son virus de ARN de cadena positiva larga típicamente con una amplia gama de huéspedes. Al igual que otros virus con envuelta, CoV entra en las células diana mediante fusión entre las membranas del virus y las celulares, proceso mediado por la proteína vírica espicular (S). Las proteínas S de CoV, caracterizadas hasta la fecha parecen constar de dos subunidades asociada no covalentemente, S1 y S2. Usando análisis por ordenador, Carry y Gallaher (2003) propusieron por primera vez que la porción de la proteína S de SARS-CoV que se corresponde con la subunidad S2 coincide con el modelo prototípico de una proteína de fusión vírica de clase I en base a la presencia de dos regiones de hélice alfa predichas en las regiones N y C terminales de S2 (hélice N y hélice C) y una región rica en aminoácidos aromáticos justo antes del dominio de anclaje transmembrana.

Materiales y procedimientos

Las células L2 o las células Vero E6 se mantuvieron como monocapas en medio completo de Eagle modificado por Dulbecco (DEEM) que contenía HCO_3^- al 0,15 % suplementado con suero fetal de ternera (SFT) al 10 %, penicilina G (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml) y L-glutamina 2 mM a 37 °C en un incubador de CO_2 al 5 %. La cepa A59 del virus de la hepatitis murina (VHM), la cepa Urbani o HK del CoV del SARS o HK se propagaron en células L2. Para los ensayos de placa, las células L2 o las células Vero E6 se sembraron a una densidad de 1×10^6 células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. De 50 a 100 unidades formadora de placa (ufp) de VHM o CoV del SARS se incubaron previamente con o sin 100 $\mu\text{g/ml}$ aproximadamente de péptidos en DMEM sin suero durante 1 h. A continuación, las células se infectaron con inóculo tratado con el péptido o inóculo control del vehículo. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino 1x y se recubrieron con

DMEM/SFT al 10 % que contenía agarosa SEAPLAQUE® al 0,5 % (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME). Las monocapas se fijaron con formalina al 3,7 % y se tiñeron con violeta cristal 1X 2 días después de la infección y se determinó el número de placas mediante microscopía óptica.

5 Resultados y discusión

Los péptidos sintéticos correspondientes a los dominios FIR de la proteína S del VHM o del CoV del SARS se analizaron para comprobar su capacidad para inhibir la infección por estos coronavirus. La capacidad para inhibir la formación de placas en las monocapas de células es la prueba más estricta *in vivo* de un fármaco inhibidor de la posible infección. Dos péptidos (GNHILSLVQNAPYGLYFIHFSW, SEC ID n.º 22 y GYFVQDDGEWKFTGSSYYY, SEC ID n.º 23) de la FIR del VHM pueden inhibir la formación de placas por VHM, aunque el primer péptido FIR de VHM es más eficaz (véase la figura 8A). Dos péptidos de la FIR del CoV del SARS (GYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTY, SEC ID n.º 24 y GVFVFNQTSWIFITQRNFFS, SEC ID n.º 25) inhibían la formación de placa por este coronavirus (véase la figura 8B). También se observó una reducción significativa (~ 50 %) en el diámetro medio de las placas residuales. Estos resultados sugieren que este péptido inhibe tanto la entrada como la propagación del VHM. Se obtuvieron resultados similares con estos péptidos inhibidores en experimentos independientes, con una inhibición de placa del 50 % observada a concentraciones de < 5 µM. Es poco probable que estos resultados se expliquen por los efectos citotóxicos no específicos de los péptidos. Excepto por las placas, las células en las monocapas estaban intactas y eran viables. El número bajo de placas crecidas era similar en tamaño a las placas control. Los péptidos de otras regiones también inhibían la infección por estos virus aunque en menor grado que los péptidos FIR más activos (figura 8). Por ejemplo, los péptidos de la región del péptido de fusión y de la hélice carboxilo terminal (hélice C) de la S de VHM y de la S del CoV del SARS proporcionaban cierta inhibición (péptido de fusión S del VHM = MFPPWSAAAGVPFSLSVQY, SEC ID n.º 26; hélice C de S del VHM = QDAIKKLNBSYTNLKEVGYEMYVKW, SEC ID n.º 27; péptido de fusión del CoV del SARS = MYKTPTLKYFGGFNFSQTL, SEC ID n.º 28; hélice C de S del CoV del SARS = AACEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKW, SEC ID n.º 29). Actividades inhibidoras en la gama de µM se han notificado recientemente con péptidos de hélice C de coronavirus por Bosch y col., (2003) y otros (Bosch y col., 2004; Lui y col., 2004; Yuan y col., 2004; Zhu y col., 2004)). Sin embargo, no se han notificado péptidos inhibidores de la región FIR de coronavirus. No obstante, a la vista de la presente invención, las referencias actuales de forma colectiva proporcionan apoyo para las enormes ventajas de las invenciones actualmente descritas y reivindicadas. Es decir, estas referencias coinciden con la afirmación de los inventores de que los procedimientos de la presente invención pueden usarse con ventaja para identificar péptidos sintéticos que inhiben la fusión/infectividad por miembros de la familia *Coronaviridae*.

35 Ejemplo 4: Identificación de péptidos inhibidores de la fusión de arenavirus.

Antecedentes

La fiebre de Lassa es una enfermedad hemorrágica a menudo mortal denominada así por el pueblo del valle del río Yedseram de Nigeria en el que se describieron los primeros casos ocurridos en 1969 (Buckley y Casals, 1970). Zonas de Guinea, Sierra Leona, Nigeria y Liberia son endémicas para el agente etiológico, el virus de Lassa (LasV). El impacto sobre la salud pública de LasV en las áreas endémicas es inmenso. Los centros para el control y prevención de enfermedades (CDC) han estimado que se producen 100.000 – 300.000 casos de Lassa al año en el oeste de África y 5.000 muertes. En algunas zonas de Sierra Leona, del 10 % – 15 % de todos los pacientes admitidos en los hospitales tienen fiebre de Lassa. Las tasas de letalidad de la fiebre de Lassa típicamente son del 15 % al 20 %, aunque en casos de epidemia la mortalidad total puede ser de hasta el 45 %. La tasa de mortalidad en mujeres durante el último mes de embarazo es siempre alto, ~ 90 %, y la infección por LasV causa tasas altas de muerte fetal en todas las etapas de la gestación. Las tasas de mortalidad por Lassa son más altas en no africanos, lo cual es preocupante ya que Lassa es la fiebre hemorrágica que se exporta con más frecuencia. Debido a la alta tasa de letalidad y a la capacidad para propagarse fácilmente mediante contacto entre humanos, el virus LasV se clasifica como nivel 4 de seguridad biológica y agente de categoría A de bioseguridad NIAD.

LasV es miembro de la familia *Arenaviridae*. El genoma de los arenavirus consta de dos segmentos de ARN ambisentido de cadena sencilla. Cuando se observan al microscopio electrónico de transmisión, los viriones esféricos con envoltura (diámetro: 110 nm – 130 nm) muestran partículas granulosas que son ribosomas adquiridos de las células huésped (Murphy y Whitfield, 1975). De aquí el uso de la palabra latina "arena" para el nombre de la familia. Además de LasV, otros arenavirus que causan enfermedades en humanos son el virus de Junín (fiebre hemorrágica argentina), virus de Machupo (fiebre hemorrágica boliviana), virus de Guanarito (fiebre hemorrágica venezolana) y virus de Sabia (fiebre hemorrágica brasileña). Los arenavirus son zoonóticos; cada virus se asocia con una especie específica de roedor (Bowen, Peters y Nichol, 1997). El reservorio de LasV es la "rata de múltiples mamas" del género *Mastomys* (Monath y col., 1974). La amplia distribución de *Mastomys* en África hace que la erradicación de este reservorio de roedores sea poco práctica y ecológicamente no deseable.

Los signos y síntomas de la fiebre de Lassa, que aparecen 1 – 3 semanas después de la exposición al virus, son altamente variables aunque pueden incluir fiebre, dolor retroesternal, de espalda o abdominal, dolor de garganta, tos, vómitos, diarrea, hiperemia conjuntival e hinchazón facial. LasV infecta a células endoteliales, lo que da lugar a

un aumento de la permeabilidad capilar, disminución del volumen circulante eficaz, shock y fallo multiorgánico. La hemorragia externa, normalmente de la mucosa (encías, etc.) tiene lugar en menos de un tercio de los casos, pero confiere un mal diagnóstico. También se han descrito problemas neurológicos, como pérdida de audición, temblores y encefalitis. Los pacientes que sobreviven empiezan la defervescencia 2 – 3 semanas después del inicio de la enfermedad. La complicación más frecuente de la fiebre de Lassa es la sordera. La sordera unilateral o bilateral temporal o permanente se producen en ~ 30 % de los pacientes con fiebre de Lassa durante la convalecencia y no se asocia con la intensidad de la enfermedad aguda. El fármaco antiviral ribavirina es eficaz en el tratamiento de la fiebre de Lassa, aunque sólo si se administra al inicio (antes de 6 días) del transcurso de la enfermedad (Johnson y col., 1987; McCormick y col., 1986). No se sabe si la ribavirina es eficaz frente a otros arenavirus, como los virus de Junín, Machupo, Guanarito o Sabia. Actualmente no ha disponible vacuna para el LasV.

Materiales y procedimientos

Las células Vero se mantuvieron como monocapas en medio basal de Eagle (BME) que contenía HEPES 10mM y SFT al 5 %. El virus de Lassa (cepa Josiah) se propagó en células Vero. Para los ensayos de placa, las células Vero se sembraron a una densidad de 1×10^6 células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Se incubaron previamente de 50 a 100 ufp de LasV con o sin péptido en BME sin suero durante 1 h. A continuación, las células se infectaron con inóculo tratado con el péptido o con inóculo control del vehículo. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino 1x y se recubrieron con 2 ml de agarosa al 0,5 % en BME que contenía HEPES 10 Mm y SFT al 5 %, y se incubaron durante 4 días. Se aplicó un segundo recubrimiento que contenía rojo neutro al 5 % y las placas se contaron 24 h después.

Resultados y discusión

Se comprobó la capacidad de los péptidos sintéticos correspondientes a los dominios FIR de la glucoproteína 2 (GP2) de LasV para inhibir la infección por este arenavirus. Un péptido (NYSKYWYLNHTTTGR, SEC ID n.º 30) análogo a la secuencia NYSRYWYLNHTSTGK de la SEC ID n.º 1 (FIR de LASSA) puede inhibir la formación de placa por LasV (figura 9). Un péptido análogo a otra región de GP2, el péptido de fusión (GTFTWTLS DSEGKDTPGGY, SEC ID n.º 31) también inhibía la infección por LasV, aunque en menor grado (figura 9). No se han notificado péptidos inhibidores de arenavirus. De forma colectiva, estos resultados sugieren que nuestras técnicas pueden identificar péptidos sintéticos que inhiben la fusión/infectividad por miembros de la familia *Arenaviridae*. Estos resultados, junto con nuestros resultados con péptidos inhibidores de la FIR de coronavirus, establecen la prueba del principio de que los péptidos de las regiones FIR pueden funcionar como inhibidores víricos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bolognesi y col. patente de EE.UU. n.º 5.464.933
- Bosch, y col. (2004). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 101: 8455 – 8460.
- Bosch, y col. (2003) J Virol 77: 8801 – 8811.
- Bowen, y col. (1997). Mol Phylogenet Evol 8 (3), 301 – 16.
- Buckley, S. M. y Casals, J. (1970). Am J Trop Med Hyg 19 (4), 680 – 91.
- Carr, C. M. y Kim, P. S. (1993). Cell 73 (4), 823 – 32.
- Chan y col. (1997). Cell 89 (2), 263 – 73.
- Chen y col. (2001). Structure 9 (3), 255 – 266.
- Clark – Lewis y col. (1986) Science. 231: 134 – 9.
- Drosten, y col. (2003). New England J Med 348, 1967 – 76.
- Gallaher y col. (1992). Adv. Membrane Fluidity 6,113 – 142.
- Gallaher, W. R. (1987). Cell 50 (3), 327 – 8.
- Gallaher, W. R. (1996). Cell 85, 1 – 2.
- Gallaher, y col. (1989). AIDS Res Human Retroviruses 5 (4), 431 – 40.
- Gallaher, y col. (2001). BMC Microbiol 1 (1), 1.

- Gallaher, W. R. y Garry, R. F. (2003). < www.virology.net/Articles/sars/s2model.html > 1 de mayo de 2003.
- 5 Gelder, y col. (1995). *J. Virol* 69, 7497 – 7506
- Gonzalez-Scarano y col. (1987). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 3 (3), 245 – 52.
- Guan y col. (2004). *Lancet* 363,99 – 104.
- 10 Guan y col. (2003). *Science* 302,276 – 278.
- Henderson, Coy y Garry, patente de EE.UU. n.º 5.567.805.
- Jaysinghe y col. (2000). *Membrane Protein Explorer*. www.blanco.biomol.cui.edu.mplex.
- 15 Johnson y col. (1987). *J Infect Dis* 155 (3), 456 – 64.
- Kilby, y col. (1998). *Nat Med* 4 (11), 1302 – 7.
- 20 Kowalski, y col. (1991). *J. Virol*. 65,281 – 291.
- Ksiazek, y col. (2003). *N Engl J Med* 348, 1953 – 66.
- Lambert, y col. (1996). *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (5), 2186 – 91.
- 25 Liu y col. (2004). *Lancet* 363: 938 – 947.
- Malashkevich, y col. (1999). *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (6), 2662 – 7.
- 30 Marra, y col. (2003). *Science* 300,1399 – 1404.
- McCormick, y col. (1986), *N Engl J Med* 314 (1), 20 – 6.
- Monath y col. (1974). *Science* 185 (147), 263 – 5.
- 35 Murphy, F. A. y Whitfield, S. G. (1975). *Bull World Health Organ* 52 (4 – 6), 409 – 19.
- Owens y col. (1990). *AIDS Res Hum Retroviruses* 6 (11), 1289 – 96.
- 40 Peiris, y col. (2003). *Lancet* 361,1319 – 25.
- Pozniak, A. (2001). *J HIV Ther* 6 (4), 91 – 4.
- Poutanen y col. (2003). *New England J Med* 348, 1995 – 2005.
- 45 Qureshi, y col. (1990) *AIDS* 4, 553 – 558.
- Richardson, y col. (1980). *Virology* 105 (1), 205 – 22.
- 50 Rota, y col. (2003). *Science*, 300,1394 – 1399.
- Silburn, y col. (1998). *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 (5), 385 – 92.
- Sodroski, y col. (1999). *Cell* 99 (3), 243 – 6.
- 55 Suarez, y col. (2000). *J Virol* 74 (17), 8038 – 47.
- Watanabe, y col. (2000). *J Virol* 74 (21), 10194 – 201.
- 60 Weissenhorn, W. (1998). *Mol Cell* 2 (5), 605 – 16.
- Weissenhorn, y col. (1997). *Nature* 387 (6631), 426 – 30.
- Wild y col. (1993). *AIDS Research & Human Retroviruses* 9 (11), 1051 – 3.
- 65 Wild y col. (1992). *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (21), 10537 – 41.

Wilson y col. (1981). Nature 289 (5796), 366 – 73.

Xiao y col. (2003). Biochem. Biophys. Res. Commun. 312: 1159 - 1164

Young y col. (1999). J Virol 73 (7), 5945 – 56.

Yuan y col. (2004). Biochem. Biophys. Res. Commun. 319: 746 – 752.

Zhu y col. (2004). Biochem. Biophys. Res. Commun. 319: 283 – 288.

LISTADO DE SECUENCIAS

< 110 > Garry, Jr., Robert F. Wilson, Russell B.

< 120 > PROCEDIMIENTO DE PREVENCIÓN DE LA FUSIÓN VIRUS: CÉLULA INHIBIENDO LA FUNCIÓN DE LA REGIÓN DE INICIACIÓN DE FUSIÓN EN VIRUS DE ARN QUE TIENEN PROTEÍNAS DE ENVOLTURA FUSOGÉNICAS DE MEMBRANA DE CLASE I

< 130 > 12920.0013.00PC00

< 150 > US 60/517.181

< 151 > 04-11-2003

< 160 > 31

< 170 > PatentIn versión 3.3

< 210 > 1

< 211 > 39

< 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > Péptido sintético

< 400 > 1

Leu Ile Met Lys Asn His Leu Arg Asp Ile Met Gly Ile Pro Tyr Cys
1 5 10 15

Asn Tyr Ser Arg Tyr Trp Tyr Leu Asn His Thr Ser Thr Gly Lys Thr
20 25 30

Leu Pro Arg Cys Trp Leu Ile
35

< 210 > 2

< 211 > 100

< 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > Péptido sintético

ES 2 400 456 T3

< 400 > 2

Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala Thr
 1 5 10 15

Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys
 20 25 30

Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala Pro His Gly
 35 40 45

Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln Glu Arg Asn Phe
 50 55 60

Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro Arg
 65 70 75 80

Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln Arg
 85 90 95

Asn Phe Phe Ser
 100

5 < 210 > 3

< 211 > 32

< 212 > PROT

10

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

15 < 223 > Péptido sintético

< 400 > 3

Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys Cys Ile
 20 25 30

20

< 210 > 4

< 211 > 43

25 < 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

30

< 223 > Péptido sintético

< 400 > 4

ES 2 400 456 T3

Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp
 1 5 10 15
 Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile
 20 25 30
 Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
 35 40

< 210 > 5

5 < 211 > 17

< 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

10 < 220 >

< 223 > Péptido sintético

15 < 400 > 5

Leu Gly Leu Lys Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Glu Ile Leu Ser Leu Phe
 1 5 10 15

Gly

< 210 > 6

20 < 211 > 94

< 212 > PROT

25 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > Péptido sintético

30 < 400 > 6

Trp Tyr Thr Thr Val Pro Lys Tyr Val Ala Thr Gln Gly Tyr Leu Ile
 1 5 10 15

Ser Asn Phe Asp Glu Ser Ser Cys Thr Phe Met Pro Glu Gly Thr Val
 20 25 30

Cys Ser Gln Asn Ala Leu Tyr Pro Met Ser Pro Leu Leu Gln Glu Cys
 35 40 45

Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser Cys Ala Arg Thr Leu Val Ser Gly Ser
 50 55 60

Phe Gly Asn Arg Phe Ile Leu Ser Gln Gly Asn Leu Ile Ala Asn Cys
 65 70 75 80

Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys Tyr Thr Thr Gly Thr Ile Ile
 85 90

35 < 210 > 7

< 211 > 57

< 212 > PROT

5

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Péptido sintético

< 400 > 7

Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala
 20 25 30

Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp
 35 40 45

Asn His Thr Thr Trp Met Glu Trp Asp
 50 55

15

< 210 > 8

< 211 > 9

20 < 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

25

< 223 > Péptido sintético

< 400 > 8

Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe
 1 5

30

< 210 > 9

< 211 > 8

35

< 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

40

< 223 > Péptido sintético

< 400 > 9

45

Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys
 1 5

< 210 > 10

50 < 211 > 19

< 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

5 < 220 >

< 223 > Péptido sintético

< 400 > 10

10 **Phe Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp**
1 5 10 15

Cys Cys Ile

< 210 > 11

15 < 211 > 9

< 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

20 < 220 >

< 223 > Péptido sintético

25 < 400 > 11

Leu Lys Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Glu
1 5

< 210 > 12

30 < 211 > 10

< 212 > PROT

35 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > Péptido sintético

40 < 400 > 12

Cys Thr Phe Met Pro Glu Gly Thr Val Cys
1 5 10

45 < 210 > 13

< 211 > 19

< 212 > PROT

50 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >

55 < 223 > Péptido sintético

< 400 > 13

Trp Tyr Thr Thr Val Pro Lys Tyr Val Ala Thr Gln Gly Tyr Leu Ile
 1 5 10 15

Ser Asn Phe

< 210 > 14

5 < 211 > 9

< 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

10 < 220 >

< 223 > Péptido sintético

15 < 400 > 14

Cys Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser Cys
 1 5

< 210 > 15

20 < 211 > 36

< 212 > PROT

25 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > Péptido sintético

30 < 400 > 15

Thr Leu Val Ser Gly Ser Phe Gly Asn Arg Phe Ile Leu Ser Gln Gly
 1 5 10 15

Asn Leu Ile Ala Asn Cys Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys Tyr Thr Thr
 20 25 30

Gly Thr Ile Ile
 35

35 < 210 > 16

< 211 > 234

< 212 > PROT

40 < 213 > VIRUS DE LASSA

< 400 > 16

Leu Leu Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu Ser Asp Ser Glu Gly Asn Glu
 1 5 10 15
 Thr Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Thr Arg Trp Met Leu Ile Glu Ala Glu
 20 25 30
 Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val Ala Lys Cys Asn Glu Lys His
 35 40 45
 Asp Glu Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg Leu Phe Asp Phe Asn Lys Gln
 50 55 60
 Ala Ile Arg Arg Leu Lys Thr Glu Ala Gln Met Ser Ile Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Asn Lys Ala Val Asn Ala Leu Ile Asn Asp Gln Leu Ile Met Lys Asn
 85 90 95
 His Leu Arg Asp Ile Met Gly Ile Pro Tyr Cys Asn Tyr Ser Arg Tyr
 100 105 110
 Trp Tyr Leu Asn His Thr Ser Thr Gly Lys Thr Ser Leu Pro Arg Cys

115

120

125

Trp Leu Ile Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Glu Thr Lys Phe Ser Asp
 130 135 140
 Asp Ile Glu Gln Gln Ala Asp Asn Met Ile Thr Glu Met Leu Gln Lys
 145 150 155 160
 Glu Tyr Ile Asp Arg Gln Gly Lys Thr Pro Leu Gly Leu Val Asp Leu
 165 170 175
 Phe Val Phe Ser Thr Ser Phe Tyr Leu Ile Ser Ile Phe Leu His Leu
 180 185 190
 Val Lys Ile Pro Thr His Arg His Ile Val Gly Lys Pro Cys Pro Lys
 195 200 205
 Pro His Arg Leu Asn His Met Gly Ile Cys Ser Cys Gly Leu Tyr Lys
 210 215 220
 Gln Pro Gly Val Pro Val Arg Trp Lys Arg
 225 230

< 210 > 17

5 < 211 > 388

< 212 > PROT

< 213 > VIRUS DEL SARS

10

< 400 > 17

Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe Ala Met Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn Val Leu Tyr
 20 25 30
 Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala Ile Ser Gln
 35 40 45
 Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly Lys Leu Gln
 50 55 60
 Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu Val Lys Gln
 65 70 75 80
 Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn Asp Ile Leu
 85 90 95
 Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp Arg Leu Ile
 100 105 110
 Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln Gln Leu Ile
 115 120 125
 Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala Thr Lys Met
 130 135 140
 Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys
 145 150 155 160
 Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala Pro His Gly Val Val
 165 170 175

ES 2 400 456 T3

Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln Glu Arg Asn Phe Thr Thr
 180 185 190

Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly
 195 200 205

Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe
 210 215 220

Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn
 225 230 235 240

Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu
 245 250 255

Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys
 260 265 270

Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn
 275 280 285

Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val
 290 295 300

Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys
 305 310 315 320

Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu Gly Phe Ile
 325 330 335

Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Leu Leu Cys Cys Met
 340 345 350

Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Ala Cys Ser Cys Gly Ser Cys
 355 360 365

Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys Gly Val Lys
 370 375 380

Leu His Tyr Thr
 385

< 210 > 18

5 < 211 > 175

< 212 > PROT

< 213 > VIRUS DEL ÉBOLA

10

< 400 > 18

ES 2 400 456 T3

Glu Ala Ile Val Asn Ala Gln Pro Lys Cys Asn Pro Asn Leu His Tyr
 1 5 10 15
 Trp Thr Thr Gln Asp Glu Gly Ala Ala Ile Gly Leu Ala Trp Ile Pro
 20 25 30
 Tyr Phe Gly Pro Ala Ala Glu Gly Ile Tyr Thr Glu Gly Leu Met His
 35 40 45
 Asn Gln Asp Gly Leu Ile Cys Gly Leu Arg Gln Leu Ala Asn Glu Thr
 50 55 60
 Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr Thr Glu Leu Arg Thr
 65 70 75 80

 Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe Leu Leu Gln Arg Trp
 85 90 95
 Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys Cys Ile Glu Pro His
 100 105 110
 Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp Gln Ile Ile His Asp
 115 120 125
 Phe Val Asp Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly Asp Asn Asp Asn Trp Trp
 130 135 140
 Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile Gly Val Thr Gly Val
 145 150 155 160
 Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu Phe Cys Ile Cys Lys Phe Val Phe
 165 170 175

< 210 > 19

5 < 211 > 191

< 212 > PROT

< 213 > VIRUS DE LA GRIPE

10

< 400 > 19

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15
Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr
20 25 30
Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile
35 40 45
Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His
50 55 60
Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu
65 70 75 80
Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala
85 90 95
Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp
100 105 110
Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu
115 120 125
Asn Ala Glu Glu Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys
130 135 140
Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp
145 150 155 160
Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val
165 170 175
Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Arg Cys Asn Ile Cys Ile
180 185 190

< 210 > 20

5 < 211 > 438

< 212 > PROT

< 213 > VIRUS DEL SARAMPIÓN

10

< 400 > 20

Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Met Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gln Ala Ile Asp Asn Leu Arg Ala Ser Leu Glu Thr Thr Asn Gln Ala
 35 40 45
 Ile Glu Ala Ile Arg Gln Ala Gly Gln Glu Met Ile Leu Ala Val Gln
 50 55 60
 Gly Val Gln Asp Tyr Ile Asn Asn Glu Leu Ile Pro Ser Met Asn Gln
 65 70 75 80
 Leu Ser Cys Asp Leu Ile Gly Gln Lys Leu Gly Leu Lys Leu Leu Arg
 85 90 95
 Tyr Tyr Thr Glu Ile Leu Ser Leu Phe Gly Pro Ser Leu Arg Asp Pro
 100 105 110
 Ile Ser Ala Glu Ile Ser Ile Gln Ala Leu Ser Tyr Ala Leu Gly Gly
 115 120 125
 Asp Ile Asn Lys Val Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Leu
 130 135 140
 Leu Gly Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Ala Arg Ile Thr His Val
 145 150 155 160
 Asp Thr Glu Ser Tyr Phe Ile Val Leu Ser Ile Ala Tyr Pro Thr Leu
 165 170 175
 Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val Ser Tyr
 180 185 190
 Asn Ile Gly Ser Gln Glu Trp Tyr Thr Thr Val Pro Lys Tyr Val Ala
 195 200 205
 Thr Gln Gly Tyr Leu Ile Ser Asn Phe Asp Glu Ser Ser Cys Thr Phe
 210 215 220
 Met Pro Glu Gly Thr Val Cys Ser Gln Asn Ala Leu Tyr Pro Met Ser
 225 230 235 240
 Pro Leu Leu Gln Glu Cys Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser Cys Ala Arg
 245 250 255
 Thr Leu Val Ser Gly Ser Phe Gly Asn Arg Phe Ile Leu Ser Gln Gly
 260 265 270
 Asn Leu Ile Ala Asn Cys Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys Tyr Thr Thr
 275 280 285
 Gly Thr Ile Ile Asn Gln Asp Pro Asp Lys Ile Leu Thr Tyr Ile Ala
 290 295 300

ES 2 400 456 T3

Ala Asp His Cys Pro Val Val Glu Val Asn Gly Val Thr Ile Gln Val
 305 310 315 320

Gly Ser Arg Arg Tyr Pro Asp Ala Val Tyr Leu His Arg Ile Asp Leu
 325 330 335

Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly
 340 345 350

Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp Ala Lys Glu Leu Leu Glu Ser Ser
 355 360 365

Asp Gln Ile Leu Arg Ser Met Lys Gly Leu Ser Ser Thr Ser Ile Val
 370 375 380

Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly Ile Pro Ala
 385 390 395 400

Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly Glu Gln Val
 405 410 415

Gly Met Ser Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ser Lys
 420 425 430

Ser Tyr Val Arg Ser Leu
 435

< 210 > 21

5 < 211 > 199

< 212 > PROT

< 213 > VIH

10

< 400 > 21

Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 20 25 30
 Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile
 35 40 45
 Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln
 50 55 60
 Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln
 65 70 75 80
 Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala
 85 90 95
 Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp
 100 105 110
 Asn His Thr Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr
 115 120 125
 Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
 130 135 140
 Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
 145 150 155 160
 Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Leu Phe Ile Met
 165 170 175
 Ile Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser
 180 185 190
 Ile Val Asn Arg Val Arg Gln
 195

< 210 > 22

5 < 211 > 22

< 212 > PROT

< 213 > Secuencia artificial

10 < 220 >

< 223 > Péptido sintético

15 < 400 > 22

Gly Asn His Ile Leu Ser Leu Val Gln Asn Ala Pro Tyr Gly Leu Tyr
 1 5 10 15
 Phe Ile His Phe Ser Trp
 20

< 210 > 23
 < 211 > 19
 5 < 212 > PROT
 < 213 > Secuencia artificial
 10 < 220 >
 < 223 > Péptido sintético
 < 400 > 23
 15 **Gly Tyr Phe Val Gln Asp Asp Gly Glu Trp Lys Phe Thr Gly Ser Ser**
1 5 10 15
Tyr Tyr Tyr
 < 210 > 24
 20 < 211 > 22
 < 212 > PROT
 < 213 > Secuencia artificial
 25 < 220 >
 < 223 > Péptido sintético
 30 < 400 > 24
Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala Pro His Gly Val Val
1 5 10 15
Phe Leu His Val Thr Tyr
20
 < 210 > 25
 35 < 211 > 19
 < 212 > PROT
 40 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Péptido sintético
 45 < 400 > 25
Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn
1 5 10 15
Phe Phe Ser
 50 < 210 > 26
 < 211 > 19

< 212 > PROT
 < 213 > Secuencia artificial
 5 < 220 >
 < 223 > Péptido sintético
 10 < 400 > 26

Met Phe Pro Pro Trp Ser Ala Ala Ala Gly Val Pro Phe Ser Leu Ser
1 5 10 15

Val Gln Tyr

 < 210 > 27
 15 < 211 > 26
 < 212 > PROT
 20 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Péptido sintético
 25 < 400 > 27

Gln Asp Ala Ile Lys Lys Leu Asn Glu Ser Tyr Ile Asn Leu Lys Glu
1 5 10 15

Val Gly Thr Tyr Glu Met Tyr Val Lys Trp
20 25

 30 < 210 > 28
 < 211 > 19
 < 212 > PROT
 35 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 40 < 223 > Péptido sintético
 < 400 > 28

Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe Ser
1 5 10 15

Gln Ile Leu
 45 < 210 > 29
 < 211 > 28
 50 < 212 > PROT
 < 213 > Secuencia artificial

ES 2 400 456 T3

< 220 >

< 223 > Péptido sintético

5 < 400 > 29

Ala Ala Cys Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu
1 5 10 15
Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp
20 25

< 210 > 30

10

< 211 > 15

< 212 > PROT

15 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > Péptido sintético

20

< 400 > 30

Asn Tyr Ser Lys Tyr Trp Tyr Leu Asn His Thr Thr Thr Gly Arg
1 5 10 15

25 < 210 > 31

< 211 > 19

< 212 > PROT

30

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

35 < 223 > Péptido sintético

< 400 > 31

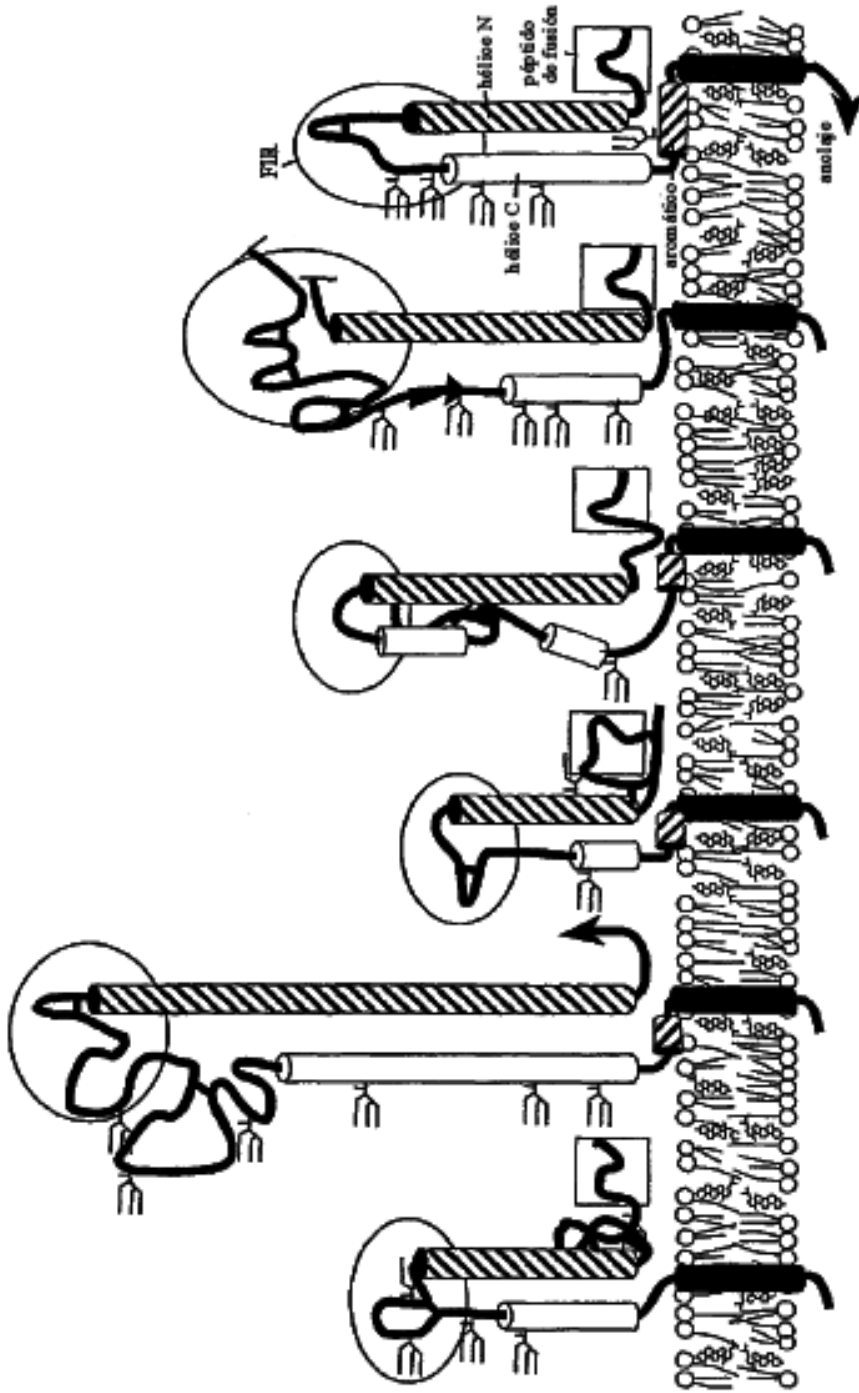
Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu Ser Asp Ser Glu Gly Lys Asp Thr Pro
1 5 10 15

Gly Gly Tyr

40

REIVINDICACIONES

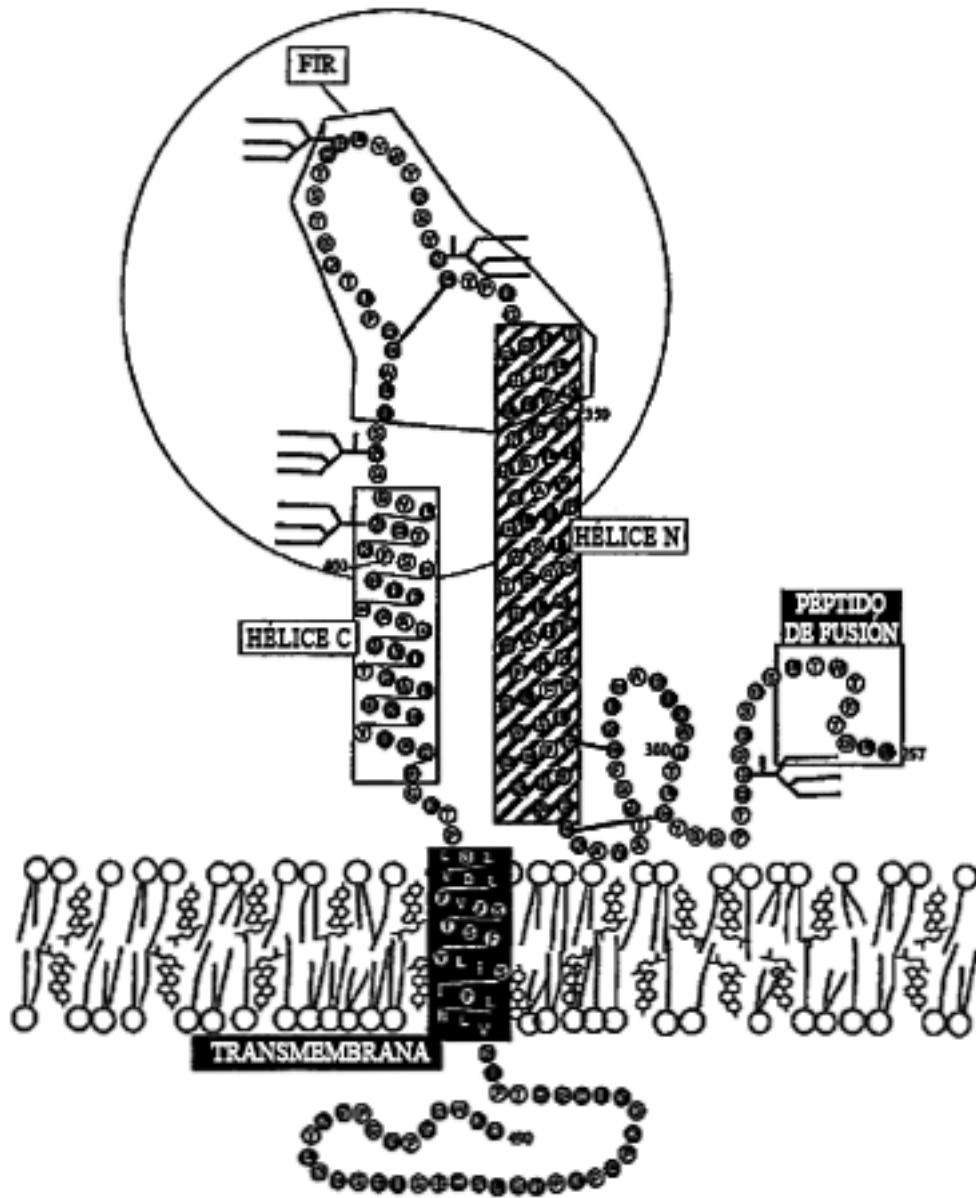
- 5 1. Un péptido inhibidor de la fusión vírica aislado para utilizar en el tratamiento de una infección por coronavirus, seleccionando el péptido entre el grupo compuesto por:
- a) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesto por la SEC ID n.º 2, y
- b) un péptido que tiene una secuencia de aminoácido compuesto por 8 a 40 restos de aminoácidos contiguos de la SEC ID n.º 2.
- 10 2. El péptido de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus en el que el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º 24 o de la SEC ID n.º 25.
- 15 3. Un péptido según se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus que incluye un grupo acetilo, un grupo carbobenzoxilo, un grupo dansilo, un grupo t-butiloxicarbonilo, un grupo hidrófobo o un grupo macromolecular en el extremo amino terminal del péptido.
- 20 4. Un péptido según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus que incluye un grupo amido, un grupo hidrófobo o un grupo macromolecular en el extremo carboxilo terminal del péptido.
- 25 5. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus en donde la infección por coronavirus es una infección por el virus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS).
- 30 6. Uso de un péptido según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para tratar una infección por coronavirus en un paciente.
- 35 7. El uso de la reivindicación 6 en el que la infección por coronavirus es una infección por el virus de SARS.
- 40 8. Una molécula de ADN recombinante que codifica un péptido definido en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2 para utilizar en el tratamiento de una infección por coronavirus.
- 45 9. Una molécula de ADN recombinante que permite o estimula a un paciente a producir el péptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus en un paciente.
- 50 10. Uso de una molécula de ADN recombinante que permite o estimula a un paciente a producir el péptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 para la preparación de un medicamento para tratar una infección por coronavirus en un paciente.
- 55 11. Un agente que inhibe la fusión vírica que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta por 8 a 50 restos de aminoácidos para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus, en el que el péptido comprende una secuencia de aminoácidos de un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
12. El agente inhibidor de la fusión vírica según se define en la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus que incluye un grupo acetilo, un grupo carbobenzoxilo, un grupo dansilo, un grupo t-butiloxicarbonilo, un grupo hidrófobo o un grupo macromolecular en el extremo amino terminal del mismo.
13. El agente inhibidor de la fusión vírica según se define en la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus que incluye un grupo amido, un grupo hidrófobo o un grupo macromolecular en el extremo carboxilo terminal del mismo.
14. Uso de un agente inhibidor de la fusión vírica de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 para la preparación de un medicamento para tratar una infección por coronavirus en un paciente.



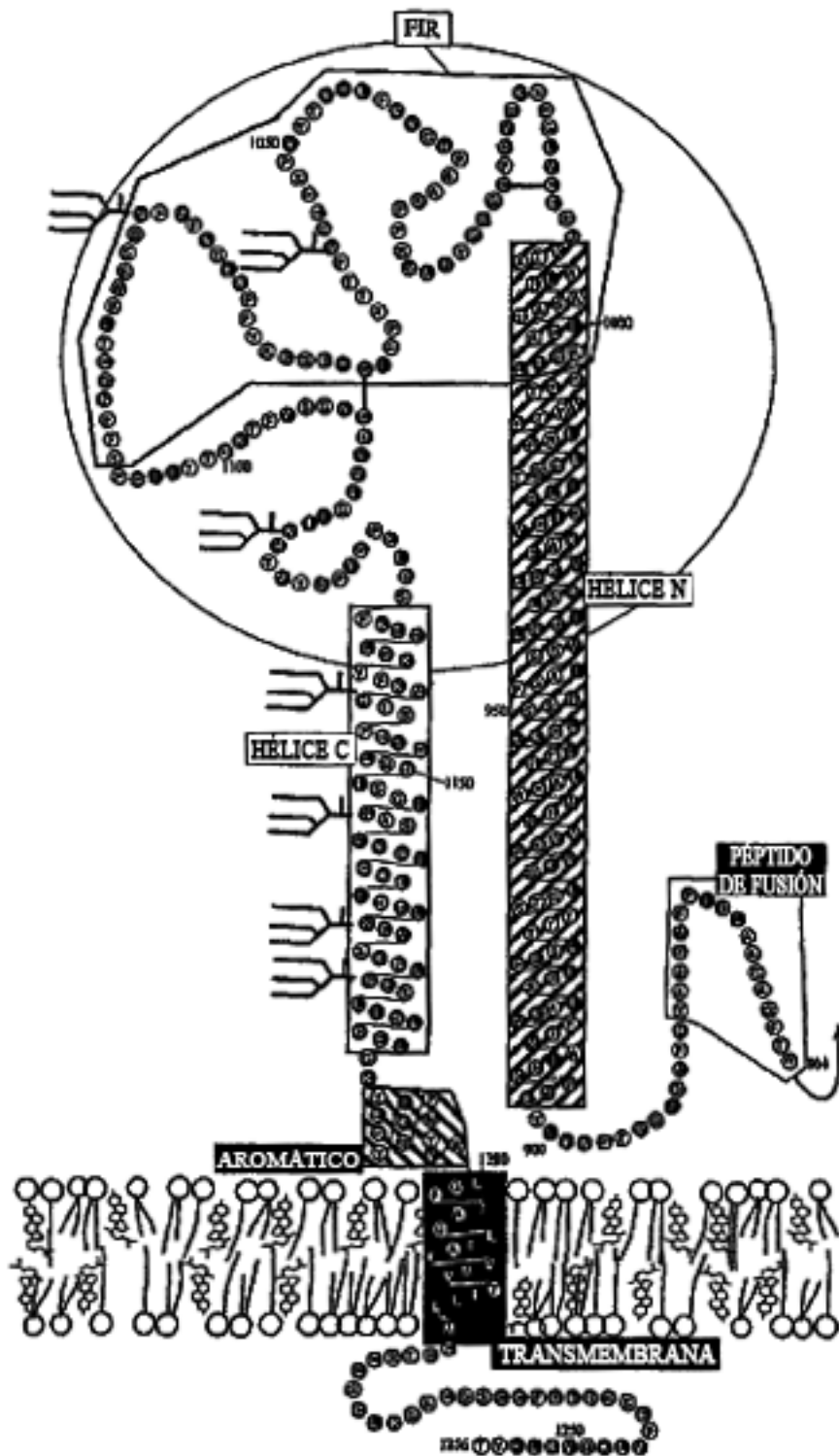
Familia: Arenavirus Coronavirus Filovirus Ortomixovirus Paramixovirus Retrovirus

Ejemplo: GP2 del virus de Lassa S2 del coronavirus del SARS GP2 del virus del Ébola HA2 del virus de la gripe F1 del virus del sarampión TM del VIH-1

Figura 1

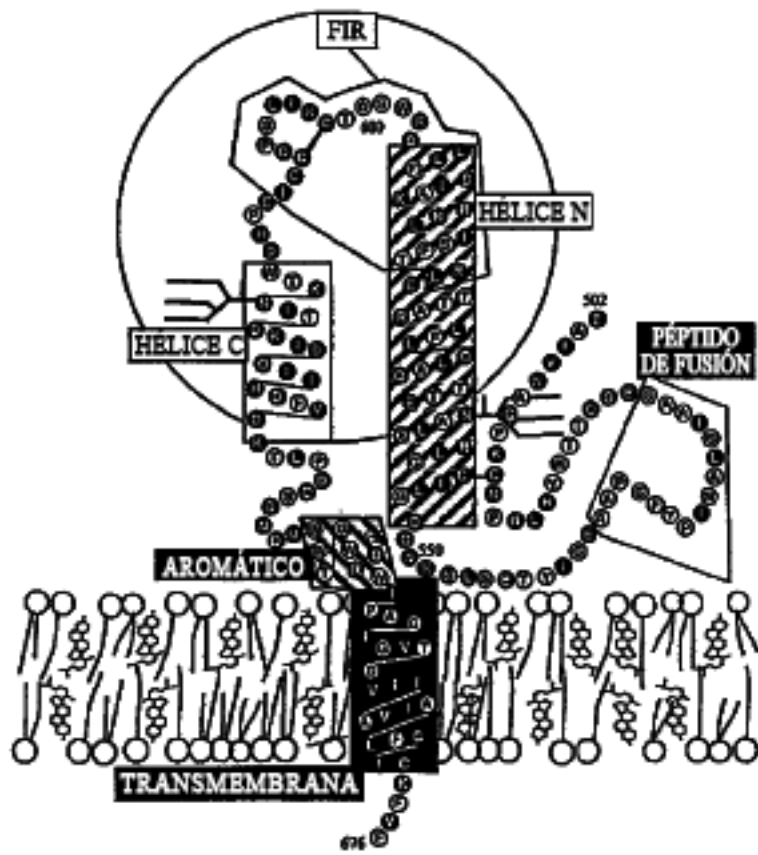


GP2 del virus de Lassa
Figura 2

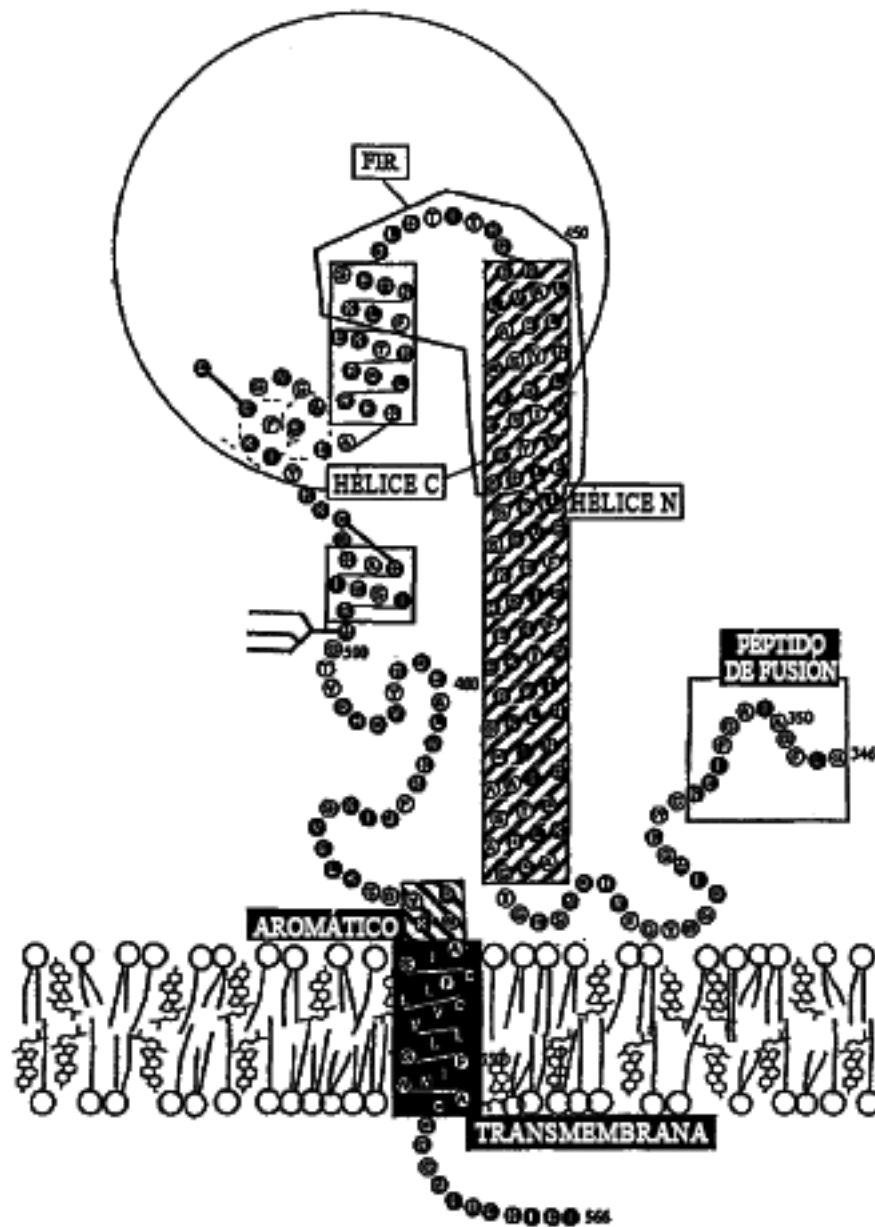


S del CoV del SARS

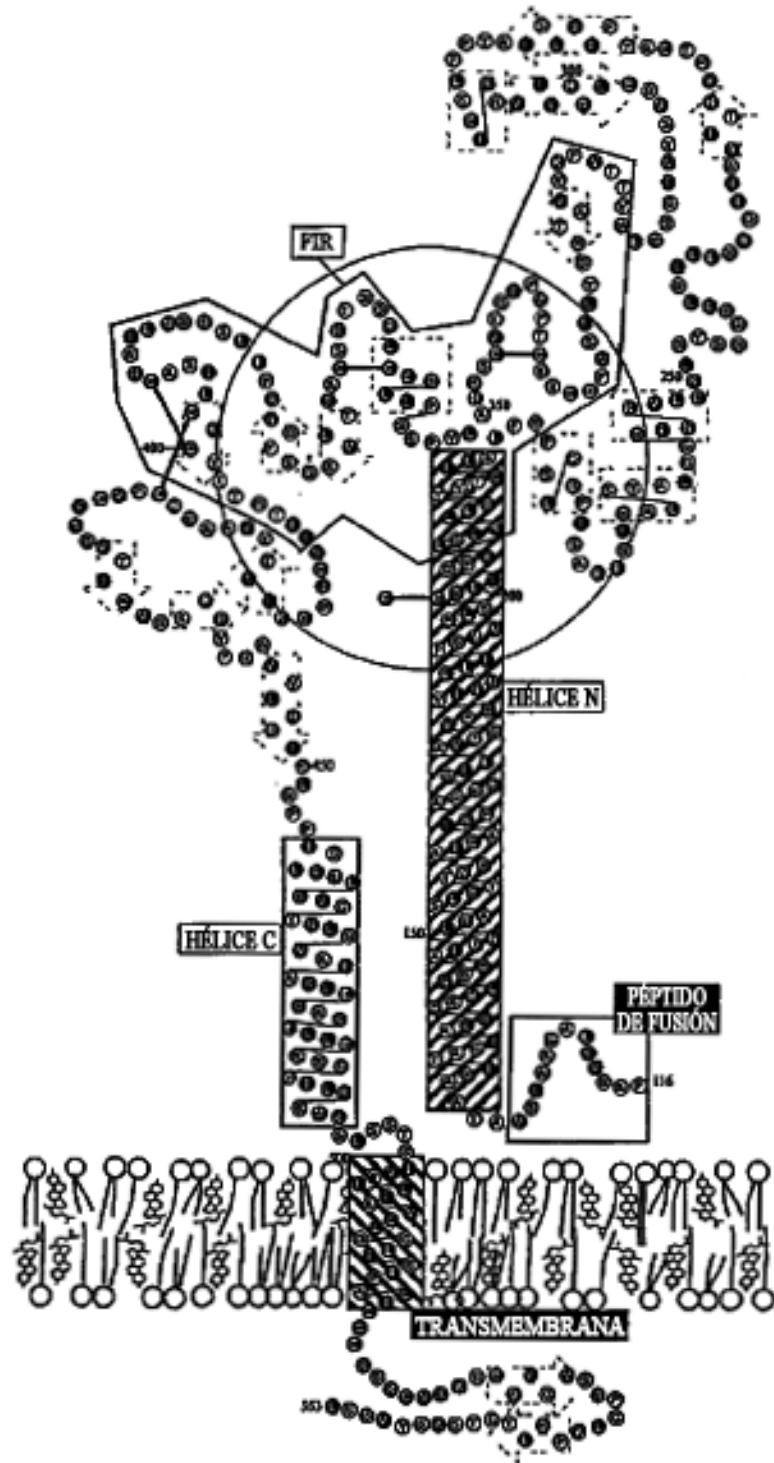
Figura 3



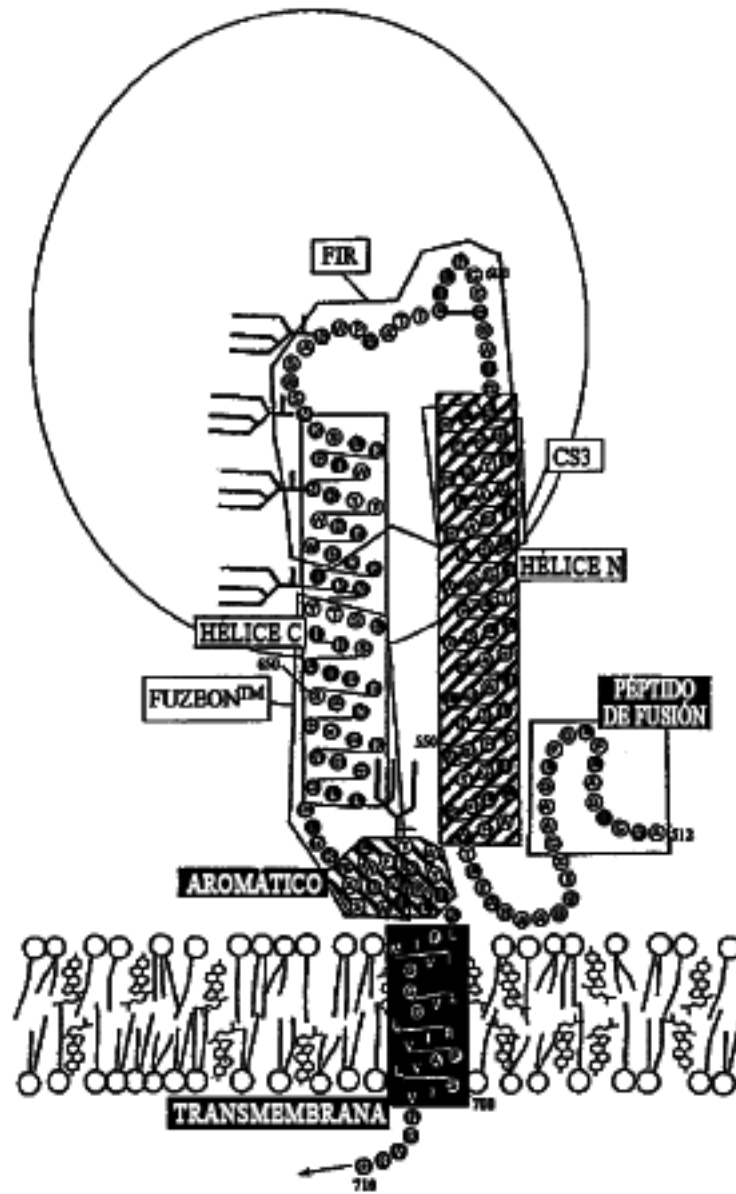
Gp2 del virus del Ébola
Figura 4



HA2 del virus de la gripe
Figura 5



F1 del virus del sarampión
Figura 6



TM del VIH-1
Figura 7

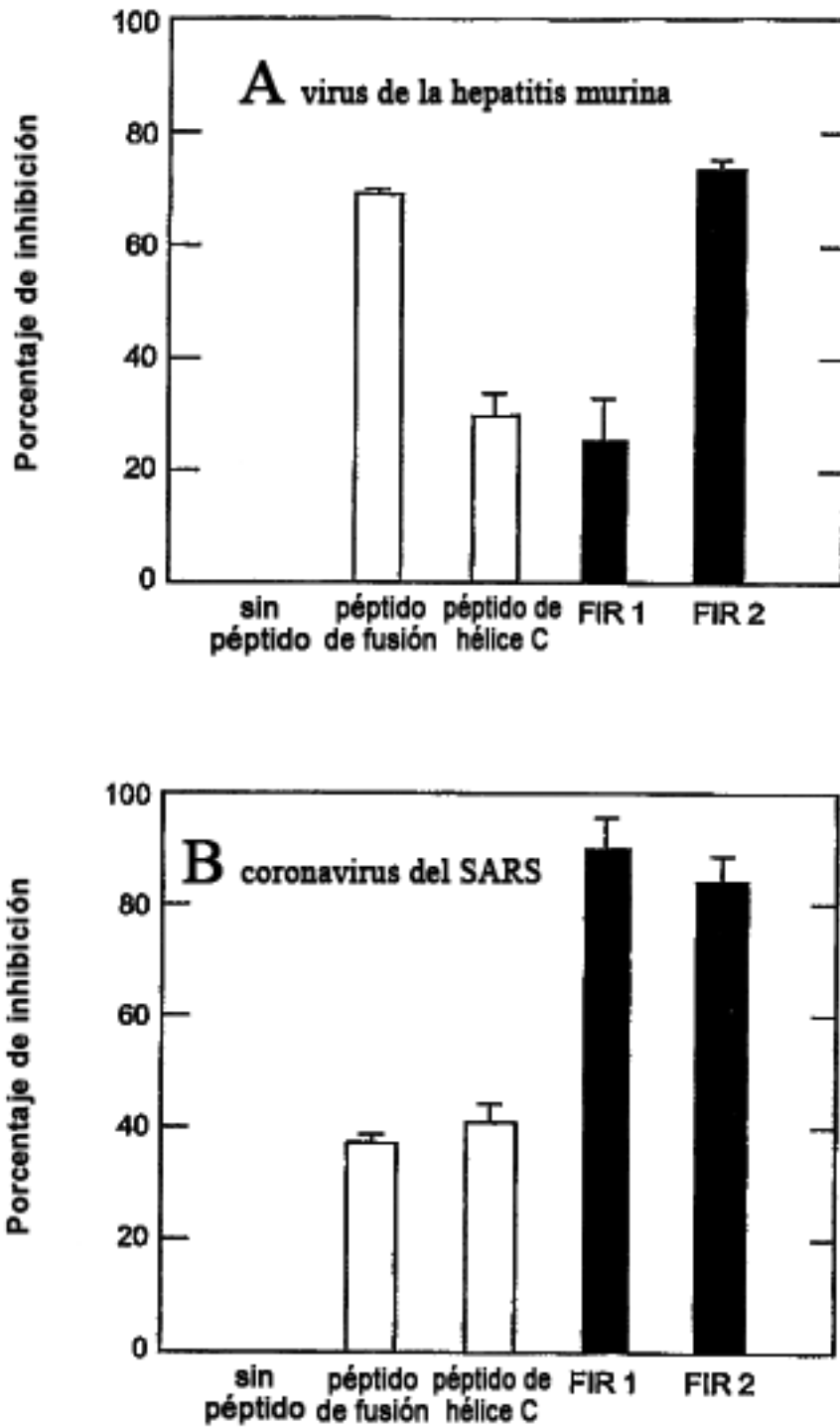


Figura 8

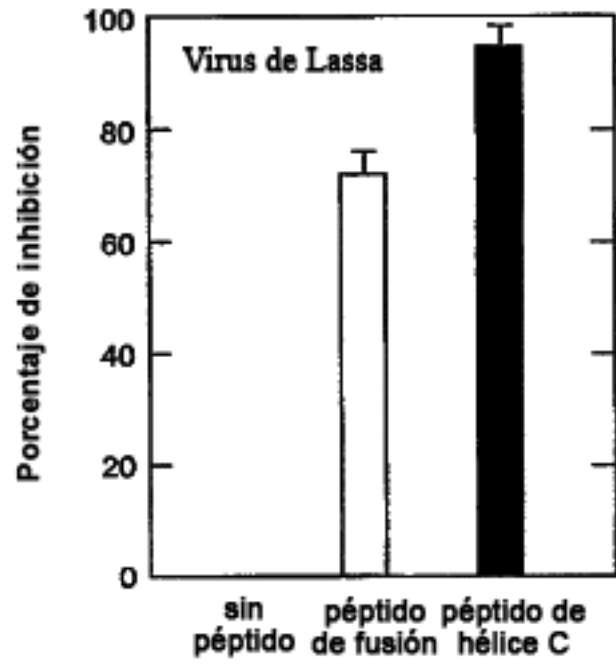


Figura 9