



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-52822

54. TÍTULO

METODO PARA PREVENIR LA FUSION VIRUS-CELULA AL INTERIOR
LA FUNCION DE LA REGION DE INICIACION DE FUSION EN VIRUS
ARN QUE TIENEN PROTEINAS DE CUBIERTA FUSOGENICA DE
MEMBRANA CLASE I

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 38/02

71. SOLICITANTE

THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND

DOMICILIO

NEW ORLEANS, LOUISIANA 70112-2699, U.S.A.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO
C.C. 438,019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-052822- -00000-0000

Fec: 2006-06-01 16:45:44 Dep. 2020 NUECREACIONES in

Tra. 11 PATENTEIYII

Cve: 379 FASINACIONALII

Act 411 PRESENTACION

Folios: 154

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**
SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

 Nombre: THE ADMINISTRATORS OF THE
TULANE EDUCATIONAL FUND
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Louisiana, Estados
Unidos de América.

 Dirección: 1430 Tulane Avenue,
New Orleans,
Louisiana 70112-2699
Estados Unidos de América

 Domicilio: New Orleans
Louisiana 70112-2699
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

**REPRESENTANTE
APODERADO**

 Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

 1. Robert F. GARRY
2114 Pine Street,
New Orleans
Louisiana 70118
Estados Unidos de América

 2. Wilson RUSSELL
148 Wisteria Lane,
Mandeville,
Louisiana 70448,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

 Solicitud Internacional No. PCT/US2004/036578

 Fecha: 3 de noviembre de 2004

 Publicación Internacional No. WO 2005/044992 A2

 Fecha: 19 de mayo de 2005

6

Título (54)
**METODO PARA PREVENIR LA FUSION VIRUS-CELULA AL INHIBIR LA FUNCION
DE LA REGION DE INICIACION DE FUSION EN VIRUS ARN QUE TIENEN
PROTEINAS DE CUBIERTA FUSOGENICA DE MEMBRANA CLASE I**

7

Clasificación Internacional (51) C12N

8

Prioridad

 SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

4 de noviembre de 2003

(31) Número de Solicitud

60/517.181

9

 Comprobante de pago N .: 06- 38,522

 Fecha: 22 de mayo de 2006

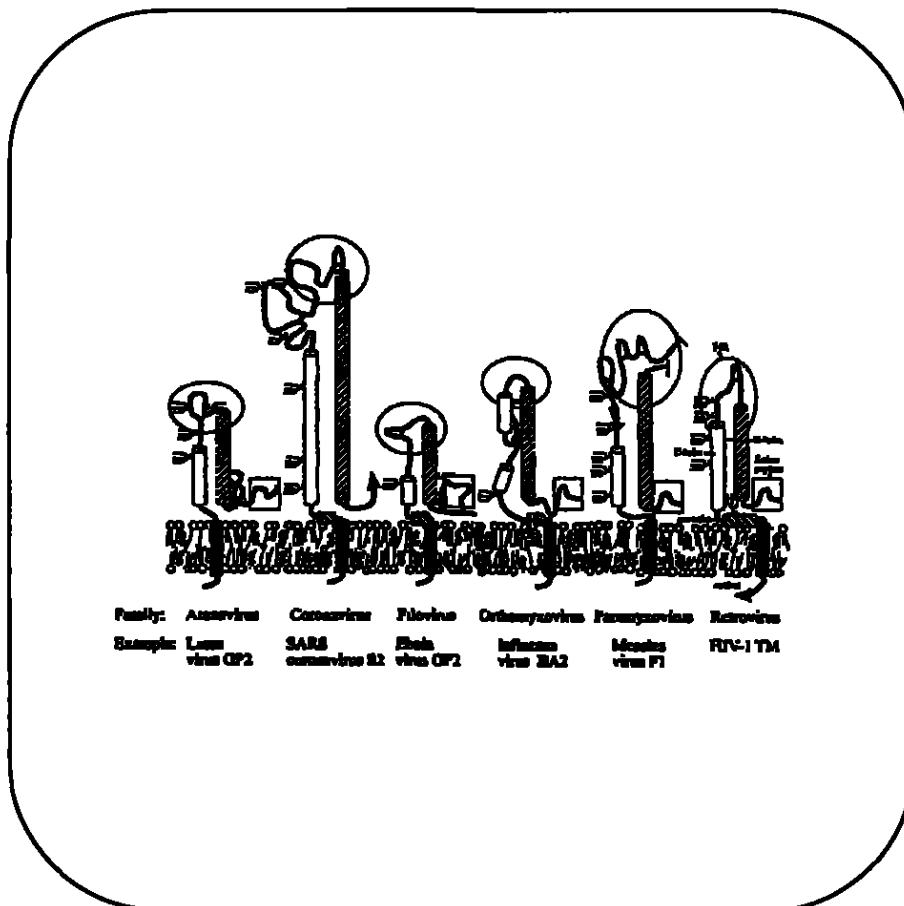
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/044992 A2
2. ☒ Extracto de publicación.

CAVELIER

ABOGADOS

SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, S - COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

11876
1878

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND

of / domiciliado (s) en 1430 Tulane Ave., New

Orleans, Louisiana 70112, United States of America,

hereby ratify the patent application No.99.072.002 filed by EMILIO FERRERO on November 16, 1999 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection of the consumer, oppositions or observations, administrative contentious, nullity, infringement, granting of licenses, a further action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by third persons against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this / Dado y firmado hoy 11-17-99

In/en New Orleans, LA

Signature *Germa A. Siski* 11/17/99 Firma

CAVELIER ABOGADOS
WPPODERE-181 (MINUTA N° 12.1.12.6 USA)

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 17 días del mes de Noviembre de 19 99
ante mí, Notario Público de Orleans Parish
compareció(eron) personalmente Carla Fishman

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 17 de Noviembre de 19 99
compareció(eron) ante mí
Carla H. Fishman
a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documen
to en representación de la Sociedad/compañía
denominada ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND

Certifico:

- Que he visto los siguientes documentos: Resolución de la
 Junta Administrativa fechado 26 Junio, 1882
y modificado hasta 21 Noviembre
1996, Acta No 43 de la Sesión General
de 1884
- Que dichos documentos prueban lo siguiente:
ADMINISTRATORS OF THE TULANE
2.1. Que EDUCATIONAL FUND
es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
de acuerdo con las leyes del Estado de Louisiana,
Estados Unidos de América.
- 2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
1430 Tulane Ave., New Orleans, Louisiana
70112, Estados Unidos de América.
- 2.3. Que el objeto u objeto, para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.
- 2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Carla H. Fishman

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad New Orleans
Estado Louisiana
Hoy 17 Nov. de 19 99

Notario Público — Notary Public

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 17 day of NOVEMBER 19 99
before me, a Notary Public of ORLEANS PARISH
personally appeared CARLA H. FISHMAN

to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has(have) legal
capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 17 day of NOVEMBER 19 99
appeared before me
CARLA H. FISHMAN
who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company
named ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND

I Certify:

- That I have seen the following documents:
Resolution of the Board of
Administrators Adopted June 26,
1882 and as amended up to November 21,
1996 & Act No 43 of the General Session of 1884
- That the above documents duly prove the following:
ADMINISTRATORS OF THE TULANE
2.1. That EDUCATIONAL FUND
is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of the State of Louisiana,
United States of America.
- 2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
1430 Tulane Ave., New Orleans, Louisiana
70112, United States of America.
- 2.3. That the purpose of purposes for which the present Power
of Attorney is granted are comprised within the corporation
purposes set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.
- 2.4. That CARLA H. FISHMAN

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City NEW ORLEANS
State LOUISIANA
This 17 day of Nov. 19 99

Nancy W. Jackson

* Documents must be identified with date and origin.

RESPONSABLE
2006 MAR 12 12:24
Jefe de Legaciones
Embajada de Bogotá D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

28470
Firma Apadec en el
Documento de Empeña
is funciones indicadas

I, DALE N. ATKINS, Clerk of the Civil District Court for the Parish of Orleans, State of Louisiana, the same being a Court of Record, having probate Jurisdiction, DO HEREBY CERTIFY, that

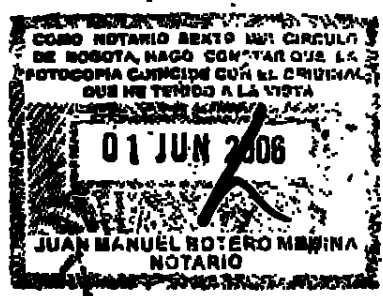
NANCY W. JACKSON

Whose name is subscribed to the certificate of proof, acknowledgment, or affidavit of the annexed instrument, and thereon written, was at the time of taking such proof, acknowledgment or affidavit a Notary Public within and for said Parish, residing in said Parish, duly appointed, commissioned and sworn, and authorized by the laws of said State to administer oaths, and to take the acknowledgments and proofs of deeds or conveyances of lands, tenements and hereditaments, in said State, and other instruments to be recorded therein and to certify the same; that full faith and credit are and ought to be given to his official acts; and I further certify that I have compared the signature to the original certificate with that deposited in this office by such person and verily believe that the signature to the attached certificate is his genuine signature, and the person signing such certificate is not required by law to file in this office an impression of his official seal.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of said Court at the City of New Orleans in said Parish and State on the

3rd day of December 19 99

Dale N. Atkins Clerk.

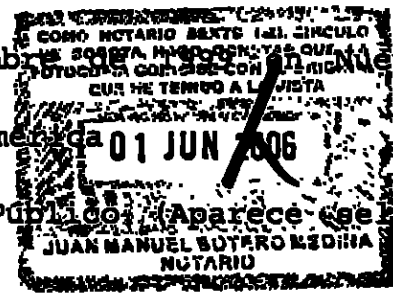


66

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 090300 al español de un documento escrito en inglés, preparada por Jaime Armando Garavito Burgos, Traductor Oficial debidamente reconocido por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobado por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia mediante Resolución N° 034 de enero 11 de 1983

Documento escrito en inglés y español por medio del cual **ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND**, ratifica la Solicitud de Patente N° 99.072.002 presentada por el doctor Emilio Ferrero el 16 de noviembre de 1999 y otorga poder a favor **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ y GERMÁN CAVELIER**. Dado y firmado el 17 de noviembre de 1999 en New Orleans, Louisiana, Estados Unidos de América (firmado) Carla H. Fishman

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y en español referente a la existencia legal de la sociedad **ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND** y su representante autorizado Carla H. Fishman, expedida el 17 de noviembre de 1999 en New Orleans, Louisiana, Estados Unidos de América (firmado) Nancy W. Jackson, Notario Público. Aparece sello notarial en relieve)



Estado de Louisiana
Corte Civil Distrital
Parroquia de Orleans

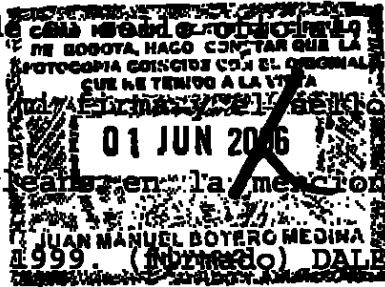
Yo, **DALE N. ATKINS**, Escribano de la Corte Civil Distrital para la Parroquia de Orleans, Estado de Louisiana, siendo la misma

67

una Corte de Registro, con jurisdicción en materia de sucesiones, POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO que

NANCY W. JACKSON

quien suscribe el certificado de prueba, reconocimiento o declaración juramentada del instrumento anexo, era en el momento de recibir dicha prueba, reconocimiento o declaración juramentada, un Notario Público dentro de dicha Parroquia y para la misma, residente en ella, debidamente nombrado, comisionado, juramentado y autorizado por las leyes del mencionado estado para tomar juramentos y para recibir las pruebas de escrituras o trasposos de tierras y bienes inmuebles en dicho estado y demás instrumentos que deban registrarse en el mismo, así como para certificarlos. Que se da y debe darse plena fe y crédito a sus actos oficiales. Certifico además que he comparado la firma en el certificado original con la firma depositada en esta oficina por dicha persona y realmente creo que la firma en el certificado anexo es su firma auténtica. Certifico también que la ley no ordena que la persona que firma dicho certificado archive en esta oficina una impresión de

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he estampado  el día 16 de diciembre de dicha Corte en la ciudad de Nueva Orleans, en la mencionada Parroquia y Estado el 3 de diciembre de 1999. (firmado) DALE N. ATKINS, Escribano.

N° 006. EL CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA en Nueva Orleans, Louisiana, Estados Unidos de América, certifica las funciones y firma de Nancy W. Jackson, el 16 de diciembre de 1999. Pagado impuesto de timbre y derechos consulares. (firmado) MARIA INES

78

PANTOJA, Cónsul General

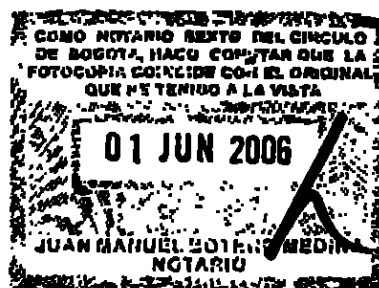
EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES en Santa Fe de Bogotá,
D.C. certifica la firma y las funciones de Inés Pantoja, el 01
de marzo del 2000. N° 128470. (firmado) Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los
archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me
remito.

Jaime A. Garavito B.
JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Bos 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

Santa Fe de Bogotá, D.C., marzo 09 del 2000

COLO: 11876-801-001-9
WPC11876 - ID # 5



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
3675
LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS
NO SE SUJUE
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2000 MAR 10 A 11:43
JEFE DE LEGALIZACIONES
CALLE DE BOGOTA D.C.

[Handwritten signature]

COMO NOTARIO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE (S) FIRMADO(S) DE
Juan C. G. G. G.
CIRCULO (S) DE LA FIRMA RECONOCIDA POR
BOGOTA EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA 10 MAR. 2000

NOTARIA
ABLO MENDER
BARANS

COMO NOTARIO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
08 JUN 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

**METHOD OF PREVENTING VIRUS: CELL FUSION BY INHIBITING THE
FUNCTION OF THE FUSION INITIATION REGION IN RNA VIRUSES HAVING
CLASS I MEMBRANE FUSOGENIC ENVELOPE PROTEINS**

TITLE

[0001] This application claims the benefit of United States Provisional Application Serial Number 60/517,181, filed November 4, 2003, which is herein incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates to a method of preventing or inhibiting viral infection of a cell and/or fusion between the envelope of a virus and the membranes of a cell targeted by the virus (thereby preventing delivery of the viral genome into the cell cytoplasm, a step required for viral infection). The present invention provides methods for identifying a fusion initiation region, or FIR, of the viruses. The present invention provides for a method of identifying the FIR in these viruses. The present invention further provides for methods of preventing infection by a Type I virus by interfering with its FIR.

INTRODUCTION

[0003] All viruses must bind to and invade their target cells to replicate. For enveloped animal viruses, including RNA viruses having Class I membrane fusion proteins (Type I viruses), the process involves (a) binding of the virion to the target cell, (b) fusion of the envelope of the virus with the plasma membrane or an internal cellular membrane, (c) destabilisation of the viral envelope and cellular membrane at the fused area to create a fusion pore, (d) transfer of the viral RNA through the pore, and (e) modification of cellular function by the viral RNA.

[0004] Fusion of the viral membrane and the cell envelope, steps (b) and (c) above, is mediated by the interaction of a viral transmembrane glycoprotein (fusion protein) with surface proteins and membranes of the target cell. These interactions cause conformational changes in the fusion protein that result in the insertion of a viral fusion peptide into the target cell membrane. This insertion is followed by further conformational changes within the fusion protein that bring the viral envelope and cell membranes into close proximity and results in the fusion of the two membrane bilayers.

[0005] A virus is unable to spread and propagate within its host if this fusion process is disrupted. Intentional disruption of this fusion process can be achieved by directing peptides and

9
16

- 2 -

peptide mimics homologous to fusion protein sequences, antibodies that recognize the fusion protein, and other factors that act against the fusion protein.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Structural Similarities among RNA Virus Class I Fusion Proteins.

[0006] Hemagglutinin 2 (HA2) of influenza virus, an orthomyxovirus, is the prototypic RNA virus Class I fusion protein and contains an amino terminal hydrophobic domain, referred to as the fusion peptide, that is exposed during cleavage of the hemagglutinin precursor protein. The membrane fusion proteins of RNA viruses from several diverse families, including arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses, share several common structural features with HA2 and have been referred to as Class I viral fusion proteins. It has been observed that the fusion protein of HIV-1, the transmembrane glycoprotein and other retroviral transmembrane proteins, like those of orthomyxoviruses and paramyxoviruses, possess a hydrophobic fusion peptide domain exposed during cleavage of a precursor (gp160) (Gallaher, 1987; Gonzalez-Scarano *et al.*, 1987). Based on these similarities and computer algorithms that predict protein configurations, it has been suggested (Gallaher *et al.*, 1989) that the external portion (ectodomain, amino terminus) of HIV-1 transmembrane protein and the transmembrane proteins of other retroviruses, all could fit the scaffold of HA2 structure as determined by x-ray crystallography (Wilson, Skehel, and Wiley, 1981).

[0007] Based on these observations, it was predicted that retroviral transmembrane proteins contain several structural features in addition to the fusion peptide in common with the known structure of HA2, including an extended amino terminal helix (N-helix, usually a "heptad repeat" or "leucine zipper"), a carboxyl terminal helix (C-helix), and an aromatic motif proximal to the transmembrane domain. The presence of at least four out of these five domains defines a viral envelope protein as a Class I fusion protein. This retroviral transmembrane protein model was subsequently confirmed by structural determinations and mutational analyses (Chan *et al.*, 1997; Kowalski *et al.*, 1991; Weissenhorn *et al.*, 1997). Common structural motifs are present not only in orthomyxovirus and retrovirus fusion proteins, but also in those of paramyxoviruses, filoviruses (such as Ebola virus, EboV) (Gallaher, 1996) and arenaviruses (Gallaher, DiSimone, and Buchmeier, 2001). The Gallaher structural model of the EboV fusion protein (GP2) has also

10
11

- 3 -

been confirmed by x-ray crystallographic methods (Malashkevich *et al.*, 1999; Weissenhorn *et al.*, 1998).

Figure 1 shows the five, previously-described, domains of the fusion proteins of the six families of Type I viruses. The fusion proteins originate in a hydrophobic fusion peptide, terminate in an anchor peptide, and incorporate an extended amino terminal alpha-helix (N-helix, usually a "heptad repeat" or "leucine zipper"), a carboxyl terminal alpha-helix (C-helix) (Carr and Kim, 1993; Suarez *et al.*, 2000; Wilson, Skehel, and Wiley, 1981), and sometimes an aromatic motif proximal to the virion envelope. Also shown is the sixth domain, the fusion initiation region (FIR), discovered by the present inventors.

Fusion Inhibition in Type I Viruses

Previous attempts by the present inventors (Garry) and others to design peptides and peptide mimics, antibodies, and other factors that inhibit fusion in Type I viruses have focused on the fusion peptide, the N-helix, and the C-helix of the fusion proteins. In the case of fusion peptides, analogs of the orthomyxoviruses and paramyxoviruses (Richardson, Scheid, and Choppin, 1980) and HIV-1 fusion peptide domains (Gallaher *et al.*, 1992; Owens *et al.*, 1990; Silburn *et al.*, 1998) have been found to block viral infection, presumably by forming inactive heteroaggregates. Peptides corresponding to portions of the N-helix and C-helix have also been found to be effective in inhibiting viral infection both *in vitro* and *in vivo*. For example, a 17-amino-acid peptide corresponding to the carboxy-terminal portion of the N-helix of the HIV-1 fusion protein, defined as the CS3 region, blocked HIV infection (Qureshi *et al.*, 1990). In addition, other N-helix and C-helix inhibitory peptides were developed based on the fusion protein structural model (Wild, Greenwell, and Matthews, 1993; Wild *et al.*, 1992), including the C-helix anti-HIV-1 peptidic drug DP178 (T-20 or FUZEON®). DP178 overlaps the C-helix and the aromatic anchor-proximal domain and inhibits HIV-1 virion:cell fusion at very low concentrations (50% inhibition at 1.7 nM) achievable *in vivo* following injection. In a clinical trial, 100 mg/day of DP178 caused an approximately 100-fold reduction in plasma HIV-1 load of infected individuals (Kilby *et al.*, 1998). This result has greatly motivated the search for other HIV-1 inhibitory peptides based on transmembrane protein structure (Pozniak, 2001; Sodroski, 1999). Peptidic inhibitors of paramyxoviruses have also been shown to inhibit viral replication (Lambert *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1999). Studies by Watanabe and coworkers suggest that a

11
12

- 4 -

similar approach of targeting the N-helix and the C-helix of EboV GP2 may also lead to useful inhibitors (Watanabe *et al.*, 2000). Neutralizing antibodies directed against portions of the fusion protein domains have also been shown to inhibit virion:cell fusion.

Observations in HIV-1

[0010] A great deal of study has been devoted to fusion inhibition in human immunodeficiency virus HIV-1, one of the Type I RNA viruses. Bolognesi *et al.* (5,464,933) and the present inventors (Garry, USPN 5,567,805) teach that HIV-mediated cell killing can be inhibited by introducing peptides that bind to portions of the transmembrane fusion protein of the HIV-1 virion. The Bolognesi DP178 binding region, labeled FUZEON® in Figure 7, lies primarily on the C-helix and is outside what is described in the present application the fusion initiation region (FIR). Bolognesi demonstrates inhibition but teaches no method of inhibition. The present inventors (Garry) previously demonstrated inhibition at the CS3 region of HIV-1 TM, labeled CS3 in Figure 7, but identified no method of inhibition, suggesting only that CS3:CS3-receptor interaction is inhibited. The unexpected discovery of the FIR by the present inventors (as currently described herein) and the fact that the CS3 sequences lie within the FIR indicates that the CS3:CS3-receptor binding described in USPN 5,567,805 is in fact binding that occurs between the CS3 portion of the FIR and portions of the cell membrane for which the CS3 portion of the FIR has an affinity. In addition, although Melikyan, Watanabe, Bewley, and others have described fusion inhibition with introduced peptides, they have not explained the mechanisms through which the inhibition occurs. Correspondingly, the location of the FUZEON® peptide is distant from the FIR, which strongly suggests that other elements of the fusion process operate in the FUZEON® region.

[0011] In view of the foregoing, it is clear that there exists a need in the art for a more effective means for identifying those regions of viruses that are involved in the infection process and for compositions effective for preventing or inhibiting viral infection. The invention described and disclosed herein provides an effective solution to these needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] Various embodiments of the instant invention provide for methods of identifying "factors" (compounds) capable of inhibiting membrane fusion between viruses and their host

12
13

- 5 -

cells and, thereby, preventing or inhibiting infection of the host cell by the virus. Aspects of this embodiment of the invention provide for methods of identifying these inhibitory "factors" where the method comprises the steps of (a) identifying a virus having an envelope fusion protein having two, or more, extended alpha helices, a fusion peptide, and a fusion initiation region (FIR); (b) preparing a "target" wherein the target comprises the amino acid sequence of the FIR, (c) exposing the "target" to one or more test compounds, and (d) identifying those test compounds that physically interact with the "target". For example, physical interaction can be detected using a "target" bound to a solid substrate and a fluorescently or radioactively labeled test compound in a standard binding assay. Target and test compounds having dissociation coefficients (K_d) in the micromolar range or lower (*i.e.* $\leq$ about 9×10^{-6}) are considered to be positively interacting.

[0013] Other aspects of the instant invention provide for compositions comprising an isolated peptide having the amino acid sequence of a viral fusion initiation region (FIR) or a functional segment of the FIR or having an amino acid sequence which is analogous to the sequence of a FIR or a functional segment of a FIR. As used herein, an analogous amino acid or peptide sequence is a sequence containing a majority of identical or chemically similar amino acids in the same order as a primary sequence. Such chemical similarities are well known to those skilled in the art.

[0014] Other aspects of this embodiment of the invention provide for isolated, typically substantially purified, peptides or peptide analogs that are capable of preventing or inhibiting viral infection of a host cell and/or inhibiting membrane fusion of a virus with a host cell, where the virus comprises a membrane fusion protein having two (extended) alpha helices, a fusion peptide and a FIR.

[0015] Additional embodiments of the instant invention provide for methods of treating or preventing viral infection by administering to a patient one or more of the compounds identified by the methods described herein as capable of inhibiting viral infection. In various aspects of this embodiment of the invention the compounds administered are peptides or peptide analogs comprising all or a functional segment of a viral FIR sequence. In any aspect of this embodiment of the invention the administered compound is antigenic and is administered in an amount sufficient to eliciting an immune response.

13
14

- 6 -

[0016] Other embodiments of the instant invention provide for a "molecular factor", such as a plasmid, recombinant virus, or other substance which enables or stimulates a cell or organism to produce a peptide or peptide analog that is capable of preventing or inhibiting a viral infection of that cell or organism. In any aspect of this embodiment the "molecular factor" is capable of preventing or inhibiting a viral infection when administered to a patient.

[0017] Another embodiments of the instant invention provide for antibodies capable of inhibiting the virus:cell membrane fusion of a virus having a fusion protein comprising two, extended alpha-helices, a fusion peptide and a FIR. In any aspect of this embodiment of the invention the antibodies are capable of binding specifically to amino acid sequences comprising the FIR sequence, or fragments thereof of sufficient size to allow antibody recognition. Various aspects of this embodiment of the invention provide for methods of producing the antibodies. In certain aspects of this embodiment, the method for producing antibodies comprises: (a) providing as the antigen a peptide comprising a viral initiation region (FIR) or an antigenic fragment of the FIR; (b) introducing the antigen in to an animal so as to elicit an immune response; (c) collecting antibodies from the animal; and optionally, (d) purifying the collected antibodies to identify that fraction of the collected antibodies having a high specificity for the antigen.

[0018] Other embodiments of the current invention provide methods of treating patients, which methods comprise administering to the patient antibodies that specifically recognize and bind to peptides comprising a FIR region from a virus or comprising a functional fragment of such a FIR region where the functional fragment is of sufficient size to allow its specific recognition by an antibody (that is, it is an antigenic fragment).

[0019] Other embodiments of the instant invention provide for methods of producing antibodies specific for FIR or functional fragments thereof.

ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS OF THE INVENTION

The Sixth Domain of RNA Viruses Having Class I Membrane Fusion Proteins

[0020] The arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses are the six families of RNA viruses currently identified that have Class I membrane fusion envelope proteins. The fusion proteins of these Type I viruses have previously been

14
15

- 7 -

shown by the present inventors (Garry) and others to incorporate five conserved motifs, or domains (Carr and Kim, 1993; Gallaher *et al.*, 1989; Suarez *et al.*, 2000; Wilson, Skehel, and Wiley, 1981). These domains comprise a fusion peptide, an N-helix, a C-helix, and an aromatic motif, all of which are ectodomains, and an anchor peptide, which is an endodomain.

[0021] Using computational analyses, secondary structure models, interfacial hydrophobicity calculations and other techniques, the present inventors have made the surprising discovery of a highly conserved sixth domain that is present in the fusion proteins of a wide variety of viruses (this sixth domain is described herein). The viruses possessing this domain include, but are not necessarily limited to the six classes of RNA viruses listed above. To emphasize the critical function of this newly identified domain, which is an ectodomain, the domain is referred to herein as the fusion initiation region (FIR) of the viruses.

[0022] Various embodiments of the instant invention provide methods of identifying the FIR in arenavirus, coronavirus, filovirus, orthomyxovirus, paramyxovirus, and retrovirus families of viruses. Also provided are methods of determining whether the FIR is present in other known virus families or in any newly discovered virus families.

[0023] As used herein the term "extended" alpha helix refers to an alpha helix having more than four "alpha helix turns" (specifically, more than 14 amino acids).

[0024] Other embodiments provide for "factors" that the inventors have unexpectedly found are effective for preventing or inhibiting viral infection and/or virus:cell fusion.

[0025] As used herein the term "factors" includes, but is not limited to isolated peptides or functional peptide segments (or peptide analogs thereof) of the newly described fusion initiation region (FIR) domains, peptide mimics ("peptide mimic" refers to any compound or substance that could serve as a substitute for a peptide interacting with the FIR, that is any compound that mimics the properties of a functional segment of the FIR), antibodies specific for functional FIR domains (e.g. idiotypic or anti-idiotypic antibodies) and other molecular compounds that interfere with virus:cell binding and/or fusion.

[0026] As used herein the term "functional segment" or "functional fragment" of a fusion initiation region (FIR) refers to a fragment capable of inhibiting virus:cell fusion, inhibiting viral infectivity, capable of eliciting an antibody capable of recognizing and specifically binding to the FIR and/or interfering with FIR-mediated cell infection.

15
16

- 8 -

[0427] As used herein, a "peptide analog" or "modified peptide" is preferably defined as a FIR peptide modified to contain an amino group, an acetyl group, a hydrophobic group (for example carbobenzoxy, dansyl, or t-butyloxycarbonyl) or a macromolecular carrier group (for example lipid conjugate, polyethylene glycol, a carbohydrate or a protein) at the amino terminus. An additional class of FIR peptide analogs contains a carboxyl group, an amido group, a hydrophobic group or a macromolecular carrier group at the carboxyl terminus. Other peptide analogs are defined as FIR peptides wherein at least one bond linking adjacent amino acids residues is a non-peptide bond (for example an imido, ester, hydrazine, semicarbazide or azo bond), a peptide wherein at least one amino acid residue is in a D-isomer configurations or a peptide in which the order of the amino acids is inverted. Additional peptide analogs are FIR peptides comprising at least one amino acid substitution wherein a first amino acid residue is substituted for a second, different amino acid residue (the amino acid substitution can be a conserved substitution or a non-conserved substitution). As used herein, such peptide analogs may comprise analogous amino acid sequences in which the analogous sequences contain a majority of identical or chemically similar amino acids in the same order as the primary sequences.

[0428] As used herein, the term "fusion initiation region" (FIR) generally refers to a region of a viral fusion protein involved in the initial step or steps of viral infection and/or fusion with a host cell.

[0429] As used herein the term "peptide mimic" includes, but is not limited to organic compounds or other chemicals that mimic the structure or function of the FIR peptide. Examples of peptide mimics include, but are not limited to organic compounds comprising the functional side-groups of an amino acid or peptide, but lacking the carbon/nitrogen backbone or peptide bonds. Peptide mimic also refers to compounds that mimic the action of these functional side-groups with other moieties.

[0430] Other molecules, such as idiotype or anti-idiotypic antibodies or proteins selected via phage display methods, that bind to the peptides, peptide analogs or peptide mimics described in the present application may also function as inhibitors of viral infection and/or virus:cell fusion. Also contemplated by the instant invention are plasmids, or recombinant viruses, or other molecules or compounds that enable or stimulate the patient to produce an analog of the

inhibitory compounds. For example, a recombinant protein, produced in an engineered bacterial, fungal, or mammalian cell, can be used to produce an immunogenic analog of the FIR of a viral fusion protein. Similarly, an anti-idiotypic response could be induced in the individual by using an engineered protein comprising a sequence corresponding to the binding site of a FIR-specific antibody.

[0031] As used herein the term "fusion peptide" preferably refers to a hydrophobic sequence at or near the amino terminus of a class I viral fusion protein (*see*, Gallaher *et al.*, 1987; 1992).

[0032] As used herein the term "substantially purified" peptide or peptide analog preferably refers to a peptide or peptide analog that is greater than about 80% pure. More preferably, "substantially purified" refers to a peptide or peptide analog that is greater than about 90% or greater than about 95% pure. Most preferably it refers to a peptide or peptide analog that is greater than 96%, 97%, 98%, or 99% pure. Functionally, "substantially purified" means that it is free from contaminants to a degree that that makes it suitable for the purposes provided herein. Methods for assessing purity are well known to those of skill in the art. Suitable methods include, but are not limited to gas chromatography (GC) linked mass spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, and functional assays in cell culture systems that, *inter alia*, assess cytotoxicity.

[0033] As used herein the term "stable analog" refers to a peptide that has a pharmacologically active half-life in biological systems. Biological half-lives of greater than 60 minutes are contemplated.

[0034] As used herein the term "peptide derivative" refers to a peptide that has substituted amino acids different from those in the FIR sequence of a viral fusion protein. Wherein the substitutions do not render the peptide useless for the instant invention.

[0035] According to various aspects of the present embodiment of the invention the peptides, peptide analogs, peptide mimics, and other factors may be produced by any means known in the art, including, but not limited to, chemical synthesis, recombinant DNA methods and combinations thereof.

[0036] The present invention provides methods for identifying the FIR of Type I, and other, viruses and for treating or preventing infection by these viruses. One possible mechanism by

which the current invention may to prevent and/or inhibit infection is by interfering with the FIR mediated virus:cell fusion.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0037] Figure 1 shows the domains of the fusion proteins of one member of each of these six viral families (namely, arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses). The circles in Figure 1 show the approximate location of the FIR in each virus illustrated.

[0038] Figures 2 through 7 show the amino acid sequences of these fusion proteins (corresponding to SEQ ID NOs 16-21, respectively) and a schematic representation of their ectopic structure. Specifically shown are the five previously-described domains are the fusion peptide, *i.e.*, the N-helix, the C-helix, the aromatic motif (if present), and the anchor peptide. The newly-discovered sixth domain, the fusion initiation region, or FIR is also identified. Each FIR is indicated by a polygon in Figures 2 through 7.

[0039] The circled area behind the fusion proteins in each of Figures 2-7 represents the primary virus:cell binding protein (VCBP) of the virus. The VCBP usually interacts with the portion of the fusion protein which is most distal from the viral membrane and is thus shown to be so positioned in the Figures. Unlike the highly-conserved fusion protein, the VCBP of each virus family is more divergent. It is usually the VCBP that dictates the host range of the virus and determines which of the host's cell types are targeted for infection. The VCBP acts in this capacity by recognizing and binding with specific cell surface proteins. The binding of the VCBP to the targeted cell proteins occurs prior to and is typically a prerequisite for virus:cell fusion.

[0040] Figure 8: Inhibition of coronavirus infectivity by fusion initiation region peptides. Between 50 and 100 PFU of mouse hepatitis virus strain A59 or SARS coronavirus strain Urbani were pre-incubated with or without the indicated peptides (~100 μ M) in serum-free DMEM for 1 h. Cells were then exposed to peptide-treated inoculum or a vehicle control (no peptide). After 1 h adsorption, the inoculum was removed, cells were washed twice with 1X phosphate buffered saline, and the cells were overlaid with DMEM containing 10% FBS and 0.5% agarose. Forty-eight hours after infection, infected monolayers were fixed and stained with crystal violet to determine plaque numbers.

Figure 9: Inhibition of Lassa virus infectivity by fusion initiation region peptides. Between 50 and 100 PFU Lassa virus was pre-incubated with or without the indicated peptides (~100 μ M) in serum-free BME for 1 h. Cells were then exposed to the peptide-treated inoculum or vehicle control (no peptide). After 1 h adsorption, the inoculum was removed, cells were washed twice with 1X phosphate buffered saline, and the cells were overlaid with BME containing 5% FBS, 10 mM HEPES and 0.5% agarose. Four days after infection a second overlay containing 5% neutral red was applied, and plaques were counted 24 h later.

The six families of RNA viruses now known to have Class I membrane fusion proteins (Type I viruses) and representative members of each family are as follows:

Representative RNA Viruses Having Class I Membrane Fusion Proteins (Type I Viruses)

<u>Family</u>	<u>Representative Virus</u>	<u>Shown in Figures</u>
Arenaviruses	Lassa Virus	Yes
	Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV)	No
	Junin Virus	No
	Machupo Virus	No
	Guanarito Virus	No
	Sabia Virus	No
Coronaviruses	Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Virus	Yes
	Murine Hepatitis Virus (MHV)	No
	Bovine Coronavirus	No
	Canine Coronavirus	No
	Feline Infectious Peritonitis Virus	No
Filoviruses	Ebola Virus	Yes
	Marburg Virus	No
Orthomyxoviruses	Influenza A Virus	Yes
	Influenza B Virus	No
	Influenza C Virus	No
Paramyxoviruses	Measles Virus	Yes
	Mumps Virus	No
	Canine Distemper Virus	No
	Newcastle Disease Virus	No
Retroviruses	Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1)	Yes
	Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2)	No
	Human T-cell Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1)	No
	Human T-cell Lymphotropic Virus 2 (HTLV-2)	No
	Human Intracisternal A-type Particle 1 (HIAP-1)	No
	Human Intracisternal A-type Particle 2 (HIAP-2)	No

The viruses shown in the Figures are as follows:

Illustrated RNA Viruses Having Class I Membrane Fusion Proteins (Type I Viruses)

<u>Figure</u>	<u>Family</u>	<u>Virus Shown</u>	<u>Protein Shown</u>
Figure 2	Arenaviruses	Lassa Virus	GP2
Figure 3	Coronaviruses	SARS Virus	S
Figure 4	Filoviruses	Ebola Virus	GP2
Figure 5	Orthomyxoviruses	Influenza A Virus	HA2
Figure 6	Paramyxoviruses	Measles Virus	F1
Figure 7	Retroviruses	HIV-1	TM

Sequence Listing of Illustrated Class I Membrane Fusion Proteins (Type I Viruses)

LASSA GP2 (Genbank Accession Number: A43492, amino acids 257-490)

LLGT FTWTLSDSEG NETPGGYCLT RWMLIEAELK CFGNTAVAKC
NEKHDEEFCD MLRLFDENKQ AIRRLKTEAQ MSIQLINKAV NALINDQLIM
KNHLRDIMGI PYCNYSRYWY LNETSTGKTS LPRCWLISNG SYLNETKFSD
DIEQQADNMI TEMLOKEYID RQKTPPLGLV DLFVFTSFY LISIFLHLVK
IPTHRHIVGK PCPKPHRLNH MGICSCGLYK QPGVPVRWKR (SEQ ID NO:16)

SARS S (Genbank Accession Number: AAQ9406, amino acids 864-1256)

WTF GAGAALQIPF AMQMAYRFNG IGVTONVLYE NQKQIANQFN
KAISQIQESL TTTSTALGKL QDVVNQNAQA LNTLVKQLSS NFGAISSVLN
DILSRLDKVE AEVQIDRLIT GRLQSLQTYV TQQLIRAAEI RASANLAATK
MSECVLGQSK RVDFCGKGYH LMSFPQAAPH GVVFLVITYV PSQERNFTTA
PAICHEGKAY FPREGVFVEN GTSWFITQRN FFSPQIITTD NTFVSGNCDV
VIGIINNTVY DPLQPELDSF KEELDKYFKN HTSPDVDLGD ISGINASVNN
IQKEIDRLNE VAKNLNESLI DLQELGKYEQ YIKWPWYVWL GFIAGLIAIV
MVTILLCCMT SCCSCLKGAC SCGSCCKFDE DDSEPVLLKGV KLHYT (SEQ ID NO:17)

EBOLA GP2 (Genbank Accession Number: AAM76034, amino acids 502-676)

EAIVNAQPK CNPNLHYWTT QDEGAAIGLA WIPYFGPAAE GIYTEGLMHN
QDGLICGLRQ LANETTQALQ LFLRATFELR TFSILNRKAI DFLLRWGGT
CHILGPDCCI EPHDWTKNIT DKIDQIIHDF VDKTLPDQGD NDNWWTGWRQ
WIPAGIGVTG VIIAVIALFC ICKFVF (SEQ ID NO:18)

20
21

- 13 -

INFLUENZA HA2 (Genbank Accession Number: P03437, amino acids 346-566)

GLFGA IAGFIENGWE GMIDGWYGFH HQNSEGTGQA ADLKSTQAAI
DQINGKLNKV IEKTNEKPHQ IEKEFSEVEG RIQDLEKYVE DTKIDLWSYN
AELLVALENQ HTIDLTDSM NKLFEKTRRQ LRENAEEMGN GCFKIYHKCD
NACIESIRNG TYDHDVYRDE ALNNRFQIKG VELKSGYKDW RCNICI (SEQ ID NO:19)

MEASLES F1 (Genbank Accession Number: VGNZMV, amino acids 116-553)

FAGVV LAGAALGVAT AAQITAGIAL HQSMLNSQAI DNLRASLETT
NQAIRAIRQA GQEMILAVQG VQDYINNELI PSMNQLSCDL IGQKLGKLL
RYYTEILSLF GPSLRDPISA EISIQALSYA LGGDINKVLE KLGYSGGDLL
GILESIRGIKA RITHVDTSY FIVLSIAYPT LSEIKGVIVH RLEGVSYNIG
SQEWYTTVPK YVATQGYLIS NFEDESSCTFM PEGTVCSQNA LYPMSPLLQE
CLRGSTKSCA RTLVSQSFGN RFILSQGNLI ANCASILCKC YTTGTIINQD
PDKILTYIAA DHCPVVEVNG VTIQVGSRRY PDAVYLHRID LGPPISLERL
DVGFTNLGNAL AKLEDKELL ESSDQILRSM KGLSSTSIVY ILIAVCLGGL
IGIPALICCC RGRCNKKGEQ VGMSRPGLKP DLTGTSKSYV RSL (SEQ ID NO:20)

HIV TM (Genbank Accession Number: AAB50262, amino acids 512-710)

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

Method of Identifying the FIR

[0043] Certain embodiments of the invention comprise a method of identifying within the fusion proteins of viruses a conserved motif. The conserved motif of the FIR regions from different viruses will have similar structure and function. Additionally, the FIR regions of related viruses may, but will not necessarily, have highly similar primary amino acid sequences. The current invention provides means for identifying these regions, either with or without relying on their identity/similarity to known sequences.

[0044] Other embodiments of the present invention provide for methods useful for preventing or inhibiting viral infection and/or virus:cell fusion using peptides, peptide mimics, antibodies or

other factors that are targeted to the specific virus' FIR and interfere with the function of that FIR.

[0045] The FIR is typically between 50 and 100 amino acids in length, although it may be longer in some viruses. Various aspects of the current embodiments provide methods for identifying the FIR of a viral fusion protein wherein the methods comprises the following steps:

(1) The sequence of the fusion protein is first fitted to the HIV transmembrane fusion protein scaffold, which comprises the N-helix, the C-helix, and other previously-described domains, in order to identify the N-helix and the C-helix in the subject fusion protein. This fitting process is facilitated by searching the primary amino acid sequence of the protein for two or more cysteines that have a propensity to form at least one covalently bonded loop, which will be present in most but not all of these sequences. The N-helix can then be identified in the region preceding this cysteine loop by examining the region for charged amino acids and other amino acids that have the propensity to form an alpha helix (e.g., glutamine (Q), alanine (A), tryptophane (W), lysine (K) and leucine (L)).

(2) The amino terminus of the FIR is then identified on the N-helix. This terminus will usually lie within the final 10 to 20 amino acids of the N-helix and will have a core typically comprising three or four hydrophobic amino acids (such as leucine (L) or alanine (A)), a positively-charged amino acid (such as lysine (K) or arginine (R)), a negatively-charged amino acid (such as glutamate (E)), and an aromatic amino acid (such as tyrosine (Y)).

(3) The carboxy terminus of the FIR is then identified. In the case of all of the families except the coronaviruses and paramyxoviruses, this terminus is the carboxy-terminus of the first peptide sequence with positive interfacial-hydrophobicity that is found beyond the N-helix. This terminus is usually located beyond the cysteine loop, if the loop is present, and sometimes overlaps the C-helix or is positioned on the C-helix. The positive interfacial-hydrophobicity sequences have a high percentage of aromatic amino acids (such as tryptophane (W), phenylalanine (F), and tyrosine (Y)) and small hydrophobic amino acids (such as glycine (G)). The degree of interfacial hydrophobicity of these sequences can be determined by using the Wimley-White interfacial hydrophobicity scale, preferably with a computer program such as the MPEX program that incorporates this scale. ("Interfacial hydrophobicity" is a measure of a peptide's ability to transfer from an aqueous solution to the membrane bilayer interface and is

5

22
23

- 15 -

based on the experimentally determined Wimley-White whole-residue hydrophobicity scale (Jayasinghe, Hristova, and White, 2000). Computer programs using this scale can identify a peptide sequence of a peptide chain having positive interfacial hydrophobicity scores and are therefore the most likely to associate with the surface of membranes.) See Example 1, as an example of the application of this method to the identification of the FIR in the Ebola virus.

[0046] In the case of the coronaviruses, which have longer alpha helices and a generally larger scale, and the paramyxoviruses, in which the FIR is discontinuous because of a non-FIR sequence insert, the carboxy terminus of the FIR is the carboxy-terminus of the second peptide sequence with positive interfacial-hydrophobicity that is found beyond the N-helix. The sequence between the N-helix and C-helix in the F1 protein of paramyxoviruses is longer than the interhelical sequences of other viruses with Class I viral fusion proteins. The F2 protein of paramyxoviruses, which serves a receptor-binding function, is correspondingly shorter. Upon inspection of computer models, it is obvious to those skilled in the art that the F1 protein contains a sequence insert between the N-helix and C-helix. Consequently, the FIR of paramyxoviruses contains two cysteine loops and two high-interfacial-hydrophobicity sequences and is discontinuous because additional amino acids which are characteristic only of the paramyxoviruses and appear between the N-helix and the first high-interfacial-hydrophobicity sequence are excluded from the FIR.

FIR SEQUENCES

[0047] The sequence of the fusion protein and FIR for each of the six representative viruses shown in Figure 2 through Figure 7 is given in the respective Figure and in the Sequence Listing provided below (SEQ ID NO:16 to SEQ ID NO:21 provide the respective fusion proteins; and SEQ ID NO:1 to SEQ NO:7 provide the respective FIR). Although there is some minor sequence variation among the sister viruses within each of these six families, the FIR in any Type I virus can readily be identified using the representative sequence given in the appropriate figure.

Methods of Inhibiting Fusion in these Viruses

[0048] Other embodiments of the present invention provide methods of inhibiting virus:cell fusion by interfering with the function of the FIR. Various aspects of these embodiments include

targeting the FIR with peptides, peptide mimics and other factors which may or may not be analogs of the FIR, in order to interfere with virus:cell fusion. In the various aspects of this embodiment of the present invention the peptides, peptide mimics, and peptide analogs are between about 6 and 150 amino acid residues long. More preferably, they are from about 8 to 50 residues long, even more preferably they are from about 8 to 40 amino acids in length or of such length as is necessary to provide effective inhibition of viral infection. As used herein the term "of such length as necessary to provide effective inhibition of the virus, preferably refers to a length sufficient to provide a 5-fold or greater reduction in viral infectivity, when used according to the instant invention. Methods for quantifying reduction in viral infectivity are well known to those of skill in the art. For example, reductions in viral activity may be determined by plaque reduction, binding inhibition, titer reduction assays, or by animal challenge studies.

[0449] FIR peptides, peptides of analogous sequences, or fragments or derivatives thereof, contemplated as being part of the instant invention include, but are not limited to, those comprising, as primary amino acid sequences, all or an efficacious part of one or more of the following:

LASSA

X-LIMKNHLRDIMGIPYCNYSRYWYLNHTSTGKTLPRCWLI-Z (SEQ ID NO:1).

SARS

X-LIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPH
GVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVFVFNGTSWFTTQRNFFS-Z (SEQ ID
NO:2)

EBOLA

X-LRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCI-Z (SEQ ID NO:3)

INFLUENZA

X-IQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSMNKLF-Z (SEQ ID NO:4)

24
25

- 17 -

MEASLES**X-LGLKLLRYYTEILSLFG-Z (SEQ ID NO:5)**

—

**X-WYTTVPKYVATQGYLISNFDSSCTFMPEGTVC SQNALYPMSPLLQE
CLR GSTKSCARTLVSGSFGNRFILSQGNLIANCASILCKCYTTGTII-Z (SEQ ID NO:6)**

(The "—" indicates that the Measles FIR is discontinuous).

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

In each of the foregoing sequences the "X" and the "Z" respectively designate either the amino- or carboxy-terminus, respectively, of the peptide or an additional moiety, as described below.

[0050] Other peptides provided by the instant invention include those having the sequence of a FIR region. In a preferred aspect of this embodiment the FIR region is from a virus belonging to one of the viral families selected from the group consisting of arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses. In a more preferred aspect of this embodiment, the FIR is from a virus selected from the group consisting of Lassa Virus, Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV), Junin Virus, Machupo Virus, Guanarito Virus, Sabia Virus, Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Virus, Murine Hepatitis Virus (MHV), Bovine Coronavirus, Canine Coronavirus, Feline Infectious Peritonitis Virus, Ebola Virus, Marburg Virus, Influenza A Virus, Influenza B Virus, Influenza C Virus, Measles Virus, Mumps Virus, Canine Distemper Virus, Newcastle Disease Virus, Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1), Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2), Human T-cell Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1), Human T-cell Lymphotropic Virus 2 (HTLV-2), Human Intracisternal A-type Particle 1 (HIAP-1), and Human Intracisternal A-type Particle 2 (HIAP-2).

[0051] Other aspects of this embodiment of the invention provide for sequences comprising a functional fragment of a FIR sequence or sequences analogous thereto, particularly from a virus belonging to one of the viral families selected from the group consisting of arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses (with the

exception of the HIV-1 TM CS3 peptide previously described by the present inventors (Garry) and depicted in Figure 7). In another preferred aspect of this embodiment, the peptide comprises a functional fragment (except the HIV-1 TM CS3 fragment) or a sequence analogous to a functional fragment from a virus selected from the group consisting of Lassa Virus, Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV), Junin Virus, Machupo Virus, Guanarito Virus, Sabia Virus, Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Virus, Murine Hepatitis Virus (MHV), Bovine Coronavirus, Canine Coronavirus, Feline Infectious Peritonitis Virus, Ebola Virus, Marburg Virus, Influenza A Virus, Influenza B Virus, Influenza C Virus, Measles Virus, Mumps Virus, Canine Distemper Virus, Newcastle Disease Virus, Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1), Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2), Human T-cell Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1), Human T-cell Lymphotropic Virus 2 (HTLV-2), Human Intracisternal A-type Particle 1 (HIAP-1), and Human Intracisternal A-type Particle 2 (HIAP-2).

[0332] As noted above the instant invention also contemplates derivatives of the FIR peptides described above and analogous sequences thereto. These derivative peptides may comprise altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within the sequence resulting in a silent change. For example, one or more amino acid residues within the sequence can be substituted for by another amino acid of a similar polarity that acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration (e.g. substitution of leucine for isoleucine). Substitutes for an amino acid within the sequence may be selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. By way of further example, and not by way of limitation, such peptides may also comprise D-amino acids, and/or they may comprise an inefficient carrier protein, or no carrier protein at all.

[0333] FIR peptides may comprise peptides in which "X" comprises an amino group, an acetyl group, a hydrophobic group or a macromolecular carrier group; and/or "Z" comprises a carboxyl group, an amido group, a hydrophobic group or a macromolecular carrier group. Various aspects of the instant invention are drawn to peptides wherein the "X" moiety may also be selected from

28
22

the group comprising: a hydrophobic moiety, a carbobenzoxy moiety, dansyl moiety, or a t-butyloxycarbonyl moiety. In any of the peptides of the instant invention the "Z" moiety may be selected from the group comprising: a hydrophobic moiety, a t-butyloxycarbonyl moiety.

[0056] In other aspects of this embodiment of the invention the "X" moiety may comprise a macromolecular carrier group. Such macromolecular carrier group may be selected from the group comprising, but not limited to: a lipid conjugate, a polyethylene glycol moiety, or a carbohydrate moiety. Similarly the "Z" may also comprise a macromolecular carrier group; wherein said macromolecular carrier is selected from the group comprising, but not limited to: a lipid conjugate, polyethylene glycol moiety, or a carbohydrate moiety.

[0057] Various embodiments of this aspect of the invention also contemplate peptides wherein one or more of the molecular bonds linking adjacent amino acid residues is a non-peptide bond. Such non-peptide bonds include, but are not limited to: imido, ester, hydrazine, semicarbazide and azo bonds.

[0058] Yet other aspects of the instant invention provide for peptides wherein the peptide comprises one or more amino acid residues that is/are in a D-isomer amino acid.

[0059] Other aspects of the instant invention provide for peptides comprising one or more amino acid substitution wherein a first amino acid residue is substituted for a second, different amino acid residue, in the sequences provided above (or a functional segment thereof). In various aspects of this embodiment, the amino acid substitution is a conservative substitution. In other aspects of this embodiment the amino acid substitution is a non-conservative substitution. Yet other aspects of this embodiment of the invention provide for peptides as described above except that one or more amino acid residues have been deleted.

[0060] In various preferred aspects of the instant embodiments the FIR peptides comprise at least three contiguous residues of a FIR. More preferably the FIR peptide comprises at least 8 contiguous residues of a FIR. As used herein the term "FIR inhibitory peptide(s)" preferably refers to a peptide or peptides having the sequence of a FIR (or functional segment thereof) and to such FIR peptides or functional segments in which one or more amino acids is/are substituted for by functionally equivalent or chemically similar amino acids (see *infra*). It also refers to derivatives of these peptides, including but not limited to, benzylated derivatives, glycosylated derivatives, and peptides that include enantiomers of naturally occurring amino acids. In a

preferred aspect of this embodiment the peptide is selected from those having the sequence of any of SEQ ID NOs 1-7, 8-15, 22-25, and 30. In particularly preferred aspects of this embodiment the peptide has a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 22-25 and 30.

[0057] In yet other aspects of this embodiment of the invention, the FIR peptides may be linked to a carrier molecule such as a protein, including but not limited to, human serum albumin (HSA).

[0058] Furthermore, the instant invention contemplates molecules comprising any combination of the X and Z moieties and/or other peptide modifications described above.

[0059] Peptides according to the instant invention may be produced from naturally occurring or recombinant viral proteins. They may also be produced using standard recombinant DNA techniques (e.g. the expression of peptide by a microorganism that contains recombinant nucleic acid molecule encoding the desired peptide, expressed under the control of a suitable transcriptional promoter, and the harvesting of desired peptide from said microorganism). In a preferred aspect of the invention, any of the peptides of the invention may be prepared using any chemical synthesis methodology known in the art including, but not limited to, Merrifield solid-phase synthesis (Clark-Lewis *et al.*, 1986, Science 231:134-139).

[0060] Embodiments of the instant invention also provide for other compounds useful for treating or preventing infection of a cell by a virus. These include antibodies (or active segments thereof, meaning portions of antibodies capable of specifically recognizing a FIR region or a functional segment thereof) and other molecules. Certain aspects of this embodiment of the invention provide for antibodies that specifically recognize a FIR, or antigenic fragment thereof and/or are capable of interfering with virus:cell interaction sufficiently to prevent or reduce infection of the cell by the virus. Antibodies according to these embodiments of the invention may be monoclonal or polyclonal.

[0061] Various embodiments of the invention provide for methods of producing antibodies capable of specifically recognizing a FIR and/or preventing or reducing infection of the cell by the virus. General methods for producing antibodies are well known to those of skill in the art. Methods for producing antibodies according to the instant invention comprise the steps of (i) providing an antigen comprising a FIR or an antigenic fragment thereof (such antigen may be an

28
29

- 21 -

unmodified peptide, a peptide mimic, a peptide analog, or a peptide derivative); (ii) exposing the immune system of an animal to the antigen so as to induce an immune response; (iii) collecting antibodies from the animal and identifying those antibodies that either specifically recognize a FIR (or functional segment thereof) and/or are capable of inhibiting or reducing virus:cell infection in a dose responsive manner in assays that measure viral infectivity.

[0064] Other embodiment of the instant invention provide for methods of identifying compounds capable of preventing or inhibiting infection by a virus comprising a FIR or that are useful as drug leads for the development of drugs for preventing or inhibiting viral infection. Such methods comprise the steps of: (i) identifying a virus having at least one membrane fusion protein comprising a fusion initiation region that is requisite for virus:cell fusion; (ii) preparing a target, where the target comprises the amino acid sequence of a FIR, or a functional segment of a FIR; (iii) screening a plurality of compounds to identify at least one compound that binds to the target, thereby identifying a target-binding compound; (iv) screening at least one target-binding compound to identify a target-binding compound that is capable of specifically preventing or reducing viral infection by the virus from which the target was obtained or that is useful as a drug lead for the development of a drug for specifically preventing or reducing infection by such a virus. As used herein the phrase "specifically preventing or reducing viral infection" means that the compound specifically prevents infection by the target virus, without any substantial effect on an unrelated virus. For example, if a compound that specifically prevented infection by the SARS virus would not prevent infection by the HIV-1 virus.

[0065] As used herein the compounds (e.g. drugs or drug leads) identified by the methods described above may be of any type, by way of non-exclusive list they may be any peptide (or derivative, analog, or mimic thereof) this includes short peptides as are typically employed in phage display libraries, any antibody or active fragment thereof (i.e. any fragment, such as an F_{ab} that is capable of specifically recognizing the target) or any other organic or inorganic molecule.

[0066] In any embodiment of the instant invention the FIR may be from any virus having a membrane fusion protein comprising at least extended two alpha-helices, a fusion peptide, and a fusion initiation region. Preferably, the virus is selected from a virus family, wherein the virus family is selected from the group consisting of: arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses. More preferably, the virus is selected

29
35

- 22 -

from the group consisting of: Lassa virus, SARS (severe acute respiratory syndrome) virus, Ebola virus, influenza virus, measles virus, and HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1).

[0067] According to various aspects of the instant invention, the peptides and/or factors of the instant invention useful for treating or preventing viral infection of a cell can target the amino acids surrounding and within the FIR cysteine loop, the distal portion of the FIR N-helix, any of the interfacial hydrophobicity regions of the FIR, other areas of the FIR, or any combination of thereof. These factors, antibodies, peptides or peptide analogs (collectively compounds) may be used individually; alternatively they may be used in combinations of two or more to prevent or inhibit infection of the cell by the virus. The methods of preventing or inhibiting viral infection of the cell by interfering with the function of the FIR provided by the instant invention also include the use of neutralizing antibodies, produced exogenously or endogenously, against all or portions of the FIR. The purpose of such use is to interfere with the function of the FIR, thereby inhibiting viral infection of the cell and/or virus:cell membrane fusion.

[0068] Other embodiments of the instant invention provide for compositions, including pharmaceutical compositions, comprising any and all of the compounds, peptides (including analogs, derivatives, and mimics thereof), antibodies, or any other molecule of the instant invention or identified by the methods of instant invention. This includes, but is not limited to, compositions containing any molecule that comprises, consists essentially of, or consists of a FIR, or a functional segment of a FIR. It further includes, but is not limited to compositions comprising any compound that specifically recognizes, binds to, or interferes with the function of a viral FIR. As used herein, the phrase "interfering with the function of the FIR" means that a compound interacts with the FIR or with the cellular protein that serves as the receptor that recognizes the FIR so as to prevent or reduce infection of the cell by the virus. Additionally, it is contemplated that the compositions may comprise either one of the molecules described or mixtures of two or more of the molecules.

[0069] Further embodiments of the instant invention provide for methods of treating or preventing infection of a cell by a virus (where the virus comprises a FIR) using any of the compounds of the instant invention and/or any compound identified by any of the methods of the instant invention. Various aspects of this embodiment of the invention provide for administering an effective amount of any of the pharmaceutical compositions described herein to a patient

30
31

- 23 -

suspected of being exposed to a virus (or having potential for being exposed to a virus) wherein the virus comprises a FIR. In various aspects of the invention the pharmaceutical composition comprises an antibody that specifically recognizes and binds to a FIR (or functional segment of a FIR) or a fragment of such antibody that specifically recognizes and binds to a FIR, or functional segment of a FIR.

[0070] Still other aspects of this embodiment of the invention provide for methods that comprise administering to a patient an effective amount of a composition comprising at least one recombinant DNA or RNA molecule; where the RNA or DNA encodes a FIR (or functional segment thereof) or a molecule capable of specifically binding to a FIR or a cellular receptor that recognizes a FIR so as to prevent or reduce infection by the virus. In a preferred aspect of this embodiment the recombinant RNA or DNA molecule and or pharmaceutical composition further comprises the elements necessary to allow the protein encoded by the RNA or DNA molecule to be expressed in a human cell. By way of non-exclusive example, in certain aspects of this embodiment of the invention the recombinant RNA or DNA molecule is part of a recombinant plasmid or a recombinant virus.

EXAMPLES

Example 1: Identification of the FIR in Ebola virus

[0071] The method to identify the FIR of Class I viral fusion proteins can be illustrated by two examples. The first example is identification of the FIR in the minimal class I fusion protein glycoprotein 2 (GP2) of Ebola virus, a filovirus. The boundaries of the N-helix and the C-helix of Ebola virus GP2 have been determined by x-ray crystallographic methods (Malashkevich et al., 1999). The terminal amino acids of the N-helix contain the sequence ILNRKAIDF (SEQ ID NO:8) that fits the consensus of a core comprising three or four hydrophobic amino acids, a positively-charged amino acid, a negatively-charged amino acid, and an aromatic amino acid. Between these two helices are two cysteines in the sequence CHILGPDC (SEQ ID NO:9). Defining the ends of the Ebola virus GP2 FIR is the sequence FLLQRWGGTCHILGPDCCI (SEQ ID NO:10), which has a Wimley-White interfacial hydrophobicity score of 2.59 as determined by the MPEX program (Jayasinghe et al, 2002). Thus, the FIR of Ebola virus GP2 extends from amino acids 579 to 610.

31
32

- 24 -

Example 2: Identification of the FIR in measles virus

[0072] The second example is a complex class I fusion protein, the F1 protein of measles virus, a paramyxovirus. The N- and C- helices of measles virus F1 can be identified by examining the primary sequence for amino acids with the propensity to form helices. Alignment of the primary sequence of measles virus F1 with the primary amino acid sequence of the F1 protein of another paramyxovirus, Newcastle disease virus F1, can also aid in the identification of the helix boundaries. The structure of the Newcastle disease virus F1 protein has been determined by x-ray crystallographic methods (Chen et al., 2001). The boundaries of the N- and C- helices can thus be predicted to be amino acids 131 - 217 and 455-491 respectively. In contrast to Ebola virus GP2 and most other viral class I fusion proteins, the primary sequence between the N- and C- helices in the measles virus is longer than 100 amino acids. The FIR region of measles virus F1 contains an insertion which, upon inspection of computer models, is obvious to those skilled in the art, and thus the FIR structure is formed by a secondary arrangement that brings together two parts of the primary sequence. The inserted sequence forms a loop external to the FIR. The terminal amino acids of the N-helix contain the sequence LKLLRYYTE (SEQ ID NO:11) which fits the consensus of a core comprising three or four hydrophobic amino acids, a positively-charged amino acid, a negatively-charged amino acid, and an aromatic amino acid. There are eight cysteine residues in measles virus F1 between the N- and C- helices. On the basis of the alignment with Newcastle disease virus F1 it can be determined that the first two cysteines and the second two cysteines form disulfide-linked loops. The first pair of cysteines in the sequence, CTFMPEGTVC (SEQ ID NO:12), is part of the FIR because it is bounded by a sequence WYTTVPKYVATQGYLISNF (SEQ ID NO:13) with a Wimley-White interfacial hydrophobicity score of 3.36, as determined by the MPEX program. The second pair of cysteines in the sequence, CLRGSTKSC (SEQ ID NO:14), is also part of the FIR because it is adjacent to a sequence TLVSGSFGNRFILSQGNLIANCASILCKCYTTGTII (SEQ ID NO:15) with a Wimley-White interfacial hydrophobicity score of 2.54, as determined by the MPEX program. Thus, the FIR of measles virus F1 extends from amino acids 205 to 407, with amino acids 221 to 314 representing an insertion that does not participate in FIR function.

Example 3: Identification Of Coronavirus Fusion Inhibitory Peptides.**Background**

[0073] Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a newly recognized illness that spread from southern China in late 2002/early 2003 to several countries in Asia, Europe and North America (Guan et al., 2004). SARS usually begins with a fever greater than 38°C. Initial symptoms can also include headache, malaise and mild respiratory symptoms. Within two days to a week, SARS patients may develop a dry cough and have trouble breathing. Patients in more advanced stages of SARS develop either pneumonia or respiratory distress syndrome. In the initial outbreak there were 8098 cases worldwide, with an overall mortality of 9.6%. A previously unrecognized coronavirus (CoV) has been demonstrated to be the cause of the new disease (Poutanen et al., 2003; Peiris et al., 2003; Drosten et al., 2003; Rota et al., 2003; Mara et al., 2003). Public health interventions, such as surveillance, travel restrictions and quarantines, contained the original spread of SARS CoV in 2003 and again appear to have stopped the spread of SARS after the appearance of a few new cases in 2004. It is unknown, however, whether these draconian containment measures can be sustained with each appearance of the SARS CoV in humans. Furthermore, the potential of this new and sometimes lethal CoV as a bio-terrorism threat is obvious.

[0074] Coronaviruses are large positive-stranded RNA viruses typically with a broad host range. Like other enveloped viruses, CoV enter target cells by fusion between the viral and cellular membranes, a process mediated by the viral spike (S) protein. CoV S proteins, characterized to date, appear to consist of two non-covalently associated subunits, S1 and S2. Using computational analysis, Garry and Gallaher (2003) first proposed that the portion of the SARS-CoV S protein corresponding to the S2 subunit fit the prototypical model of a class I viral fusion protein based on the presence of two predicted alpha helical regions at the N- and C-terminal regions of S2 (N-helix, C-helix) and an aromatic amino acid-rich region just prior to the transmembrane anchor domain.

Materials And Methods

[0075] L2 cells or Vero E6 cells were maintained as monolayers in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.15% HCO₃⁻ supplemented with 10% fetal

33

34

- 26 -

bovine serum (FBS), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml), and 2mM L-glutamine at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Mouse hepatitis virus (MHV) strain A59 or SARS CoV strain Urbani or HK was propagated on L2 cells. For plaque assays, L2 cells or Vero E6 cells were seeded at a density of 1x10⁶ cells in each well of a 6-well plate. Fifty to 100-plaque forming units (p.f.u.) of MHV or SARS CoV were pre-incubated with or without approximately 100µg/ml of peptide in serum-free DMEM for 1 h. Cells were then infected with peptide-treated inoculum or vehicle control inoculum. After 1 h adsorption, the inoculum was removed, cells were washed twice with 1X phosphate buffered saline, and the cells were overlaid with 10% FBS/DMEM containing 0.5% SEAPLAQUE® agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME). Monolayers were fixed with 3.7% formalin and stained with 1X crystal violet 2 days post-infection, and plaque numbers were determined by light microscopy.

Results And Discussion

[0076] Synthetic peptides corresponding to the FIR domains of the MHV or SARS CoV S protein were tested for their ability to inhibit infection by these coronaviruses. The ability to inhibit formation of plaques in cell monolayers is the most stringent *in vitro* test of a potential infection inhibitor drug. Two peptides (GNHILSLVQNAPYGLYFIHFSW, SEQ IDS NO:22 and GYFVQDDGEWKFTGSSYYY, SEQ ID NO:23) from the MHV FIR can inhibit plaque formation by MHV, though the first MHV FIR peptide is more efficient (*see* Fig. 8A). Two peptides from the FIR of SARS, CoV (GYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTY, SEQ ID NO:24 and GVPVFNGTSWFTTQRNFFS, SEQ ID NO:25) inhibited plaque formation by this coronavirus (*see* Fig. 8B). There was also a significant reduction (~50%) in the average diameter of the residual plaques. These results suggest that this peptide inhibits both entry and spread of MHV. Similar results with these inhibitory peptides were obtained in independent experiments, with 50% plaque inhibition observed at concentrations of <5 µM. These results are unlikely to be explained by non-specific cytotoxic effects of the peptides. Except for the plaques, cells in the monolayers were intact and viable. The low number of plaques grew were similar in size to control plaques. Peptides from other regions also inhibited infection by these viruses, but to a lesser extent than the most active FIR peptides (Fig. 8). For example, peptides from the fusion peptide region and the carboxyl terminal helix (C-helix) of the MHV S and SARS CoV S provided some inhibition (MHV S fusion peptide = MFPPWSAAAGVPPSLSVQY, SEQ ID

34
35

- 27 -

NO:26; MHV S C-helix = QDAIKKLNESYINLKEVGTYEMYVKW, SEQ ID NO:27; SARS CoV S fusion peptide = MYKTPTLKYFGGFNFSQIL, SEQ ID NO:28; SARS CoV S C-helix = AACEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKW, SEQ ID NO:29. Inhibitory activities in the μ M range were recently reported with coronavirus C-helix peptides by Bosch *et al.*, (2003) and others (Bosch *et al.*, 2004; Lui *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004). However, no FIR coronavirus inhibitory peptides have been reported. Nevertheless, in view of the current invention, the cited references collectively, provide support for the tremendous advantages of the currently disclosed and claimed inventions. That is, these references are consistent with the inventors' assertion that the methods of the present invention can be advantageously used to identify synthetic peptides that inhibit fusion/infectivity by members of the Coronaviridae family.

Example 4: Identification Of Arenavirus Fusion Inhibitory Peptides.

Background

[0077] Lassa fever is an often-fatal hemorrhagic illness named for the town in the Yedseram River valley of Nigeria in which the first described cases occurred in 1969 (Buckley and Casals, 1970). Parts of Guinea, Sierra Leone, Nigeria, and Liberia are endemic for the etiologic agent, Lassa virus (LasV). The public health impact of LasV in endemic areas is immense. The Centers for Diseases Control, and Prevention (CDC) have estimated that there are 100,000-300,000 cases of Lassa per year in West Africa and 5,000 deaths. In some parts of Sierra Leone, 10-15% of all patients admitted to hospitals have Lassa fever. Case fatality rates for Lassa fever are typically 15% to 20%, although in epidemics overall mortality can be as high as 45%. The mortality rate for women in the last month of pregnancy is always high, ~90%, and LasV infection causes high rates of fetal death at all stages of gestation. Mortality rates for Lassa appear to be higher in non-Africans, which is of concern because Lassa is the most commonly exported hemorrhagic fever. Because of the high case fatality rate and the ability to spread easily by human-human contact, LasV is classified as a Biosafety Level 4 and NIAID Biodefense category A agent.

[0078] LasV is a member of the *Arenaviridae* family. The genome of arenaviruses consists of two segments of single-stranded, ambisense RNA. When viewed by transmission electron microscopy, the enveloped spherical virions (diameter: 110-130 nm) show grainy particles that

38
36

- 28 -

are ribosomes acquired from the host cells (Murphy and Whitfield, 1975). Hence, the use for the family name of the Latin "arena," which means "sandy." In addition to LasV, other arenaviruses that cause illness in humans include Junin virus (Argentine hemorrhagic fever), Machupo virus (Bolivian hemorrhagic fever), Guanarito virus (Venezuelan hemorrhagic fever) and Sabiá virus (Brazilian hemorrhagic fever). Arenaviruses are zoonotic; each virus is associated with a specific species of rodent (Bowen, Peters, and Nichol, 1997). The reservoir of LasV is the "multimammate rat" of the genus *Mastomys* (Monath *et al.*, 1974). The wide distribution of *Mastomys* in Africa makes eradication of this rodent reservoir impractical and ecologically undesirable.

[0079] Signs and symptoms of Lassa fever, which occur 1-3 weeks after virus exposure, are highly variable, but can include fever, retrosternal, back or abdominal pain, sore throat, cough, vomiting, diarrhea, conjunctival injection, and facial swelling. LasV infects endothelial cells, resulting in increased capillary permeability, diminished effective circulating volume, shock, and multi-organ system failure. Frank bleeding, usual mucosal (gums, etc.), occurs in less than a third of cases, but confers a poor prognosis. Neurological problems have also been described, including hearing loss, tremors, and encephalitis. Patients who survive begin to defervesce 2-3 weeks after onset of the disease. The most common complication of Lassa fever is deafness. Temporary or permanent unilateral or bilateral deafness occurs in ~30% of Lassa fever patients during convalescence, and is not associated with the severity of the acute disease. The antiviral drug ribavirin is effective in the treatment of Lassa fever, but only if administered early (up to six days) in the course of illness (Johnson *et al.*, 1987; McCormick *et al.*, 1986). It is unknown whether ribavirin is effective against other arenaviruses, such as Junin, Machupo, Guanarito or Sabiá viruses. No LasV vaccine is currently available.

Materials And Methods

[0080] Vero cells were maintained as monolayers in Basal Medium Eagle (BME) containing 10 mM HEPES and 5% FBS. Lassa virus (Josiah strain) was propagated on Vero cells. For plaque assays, Vero cells were seeded at a density of 1×10^6 cells in each well of a 6-well plate. Fifty to 100 p.f.u. of LasV were pre-incubated with or without peptide in serum-free BME for 1 h. Cells were then infected with peptide-treated inoculum or vehicle control inoculum. After 1 h adsorption, the inoculum was removed, cells were washed twice with 1X phosphate buffered

26
37

- 29 -

saline, and the cells were overlaid with 2 ml of 0.5% agarose in BME containing 10 mM HEPES and 5% FBS, and incubated for 4 days. A second overlay containing 5% neutral red was applied, and plaques were counted 24 h later.

Results And Discussion

Synthetic peptides corresponding to the FIR domains of LasV glycoprotein 2 (GP2) were tested for their ability to inhibit infection by this arenavirus. A peptide (NYSKYWYLNHTTTGR, SEQ ID NO:30) analogous to the sequence NYSRYWYLNHTSTGK from SEQ ID NO:1 (LASSA FIR) can inhibit plaque formation by LasV (Fig. 9). A peptide analogous to another GP2 region, the fusion peptide, (GTFTWTLSDSEGKDTPGGY, SEQ ID NO:31) also inhibited infection by LasV, but to a lesser extent (Fig. 9). No arenavirus inhibitory peptides have been reported. Collectively, these results suggest that our approaches can identify synthetic peptides that inhibit fusion/infectivity by members of the Arenaviridae. These results, in combination with our results with coronavirus FIR inhibitory peptides, establish proof of the principle that FIR regions peptides can function as viral inhibitors

37
38

REFERENCES

[0032] Each of the following documents is herein incorporated by reference.

Bolognesi *et al.* US Pat. No. 5,464,933 "*Synthetic Peptide Inhibitors of HIV Transmission*"

Bosch, B.J., B.E. Martina, Z.R. Van Der, J. Lepault, B.J. Haijema, C. Verhulst, A.J. Heck, R. DeGroot, A.D. Osterhaus, and P.J. Rottier. 2004. "Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:8455-8460.

Bosch, B.J., Z.R. van der, C.A. de Haan, and P.J. Rottier. 2003. "The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex." *J Virol* 77:8801-8811.

Bowen M.D., Peters, C. J., and Nichol, S. T. (1997). "Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts." *Mol Phylogenet Evol* 8(3), 301-16.

Buckley, S. M., and Casals, J. (1970). "Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus." *Am J Trop Med Hyg* 19(4), 680-91.

Carr, C. M., and Kim, P. S. (1993). A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* 73(4), 823-32.

Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89(2), 263-73.

Chen, L., Gorman, J.J., McKimm-Breschkin, J., Lawrence, L.J., Tulloch, P.A., Smith, B.J., Colman, P.M., and Lawrence, M.C. (2001). The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm of the molecular mechanism of membrane fusion *Structure* 9 (3), 255-266.

Clark-Lewis I, Aebersold R, Ziltener H, Schrader JW, Hood LE, Kent SB. (1986). Automated chemical synthesis of a protein growth factor for hemopoietic cells, interleukin-3. *Science*. 231:134-9.

Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A. M., Cinatl, J., Bickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Muller, S., Rickerts, V., Stürmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H., and Doerr, H. W. (2003). "Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome." *New England J Med* 348, 1967-76.

Gallaher, W., Fermin, C., Henderson, L., Montelaro, R., Martin, A., Qureshi, M., Ball, J., Luo-Zhang, H., and Garry, R. (1992). Membrane interactions of HIV: Attachment, fusion and cytopathology. *Adv. Membrane Fluidity* 6, 113-142.

Gallaher, W. R. (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 50(3), 327-8.

Gallaher, W. R. (1996). Similar structural models of the transmembrane glycoproteins of Ebola and avian sarcoma viruses. *Cell* 85, 1-2.

38
39

- Gallaher, W. R., Ball, J. M., Garry, R. F., Griffin, M. C., and Montelaro, R. C. (1989). A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 5(4), 431-40.
- Gallaher, W. R., DiSimone, C., and Buchmeier, M. J. (2001). The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol* 1(1), 1.
- Gallaher, W.R. and Garry, R.F. (2003). Model of the pre-insertion region of the spike (S2) fusion glycoprotein of the human SARS coronavirus: implications for antiviral therapeutics. <www.virology.net/Articles/sars/s2model.html> May 1, 2003.
- Gonzalez-Scarano, F., Waxham, M. N., Ross, A. M., and Hoxie, J. A. (1987). Sequence similarities between human immunodeficiency virus gp41 and paramyxovirus fusion proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 3(3), 245-52.
- Guan, Y., Peiris, J.S., Zheng, B., Poon, L.L., Chan, K.H., Zeng, F.Y., Chan, C.W., Chan, M.N., Chen, J.D., Chow, K.Y., Hon, C.C., Hui, K.H., Li, J., Li, V.Y., Wang, Y., Leung, S.W., Yuen, K.Y., and Leung, F.C. (2004). Molecular epidemiology of the novel coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 363, 99-104.
- Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J., Butt, K.M., Wong, K.L., Chan, K.W., Lim, W., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Peiris, J.S., and Poon, L.L. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302, 276-278.
- Henderson, Coy and Garry, U.S. Pat. No. 5,67,805, "The Cellular Receptor for the CS3 Peptide of HIV"
- Jaysinghe, S., Hristova, K., and White, S. H. (2000). Membrane Protein Explorer. www.blanco.biomol.uci.edu/mpex.
- Johnson, K. M., McCormick, J. B., Webb, P. A., Smith, E. S., Elliott, L. H., and King, I. J. (1987). Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients. *J Infect Dis* 155(3), 456-64.
- Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M. R., Nowak, M. A., Shaw, G. M., and Saag, M. S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 4(11), 1302-7.
- Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991). Attenuation of HIV-1 cytopathic effect by mutation affecting the transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 65, 281-291.
- Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M., LeDuc, J. W., Bellini, W. J., and Anderson, L. J. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348, 1953-66.
- Lambert, D. M., Barney, S., Lambert, A. L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D. E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G., and Petteway, S. R., Jr. (1996). Peptides from conserved regions of

39
20

- paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5), 2186-91.
- Liu, S., G. Xiao, Y. Chen, Y. He, J. Niu, C. Escalante, H. Xiong, J. Farmer, A.K. Debnath, P. Tien, Jiang, S. 2004. Interactions between the heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implication for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet* 363:938-947.
- Malashkevich, V. N., Schneider, B. J., McNally, M. L., Milhollen, M. A., Pang, J. X., and Kim, P. S. (1999). Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6), 2662-7.
- Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S., Khatri, J., Asano, J. K., Barber, S. A., Chan, S. Y., Cloutier, A., Coughlin, S. M., Freeman, D., Girm, N., Griffith, O. L., Leach, S. R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S. B., Pandoh, P. K., Petrescu, A. S., Robertson, A. G., Schein, J. E., Siddiqui, A., Smailus, D. E., Stott, J. M., Yang, G. S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T. F., Bowness, D., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S., Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G. A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R. C., Kraiden, M., Petric, M., Skowronski, D. M., Upton, C., and Roper, R. L. (2003). The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300, 1399-1404.
- McCormick, J. B., King, I. J., Webb, P. A., Scribner, C. L., Craven, R. B., Johnson, K. M., Elliott, L. H., and Belmont-Williams, R. (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med* 314(1), 20-6. .
- Monath, T. P., Newhouse, V. F., Kemp, G. E., Setzer, H. W., and Cacciapuoti, A. (1974). Lassa virus isolation from *Mastomys natalensis* rodents during an epidemic in Sierra Leone. *Science* 185(147), 263-5.
- Murphy, F. A., and Whitfield, S. G. (1975). Morphology and morphogenesis of arenaviruses. *Bull World Health Organ* 52(4-6), 409-19.
- Owens, R. J., Tanner, C. C., Mulligan, M. J., Srinivas, R. V., and Compana, R. W. (1990). Oligopeptide inhibitors of HIV-induced syncytium formation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6(11), 1289-96.
- Peiris, J. S., Lai, S. T., Poon, L. L., Guan, Y., Yam, L. Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W. K., Yan, W. W., Cheung, M. T., Cheng, V. C., Chan, K. H., Tsang, D. N., Yung, R. W., Ng, T. K., and Yuen, K. Y. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1319-25.
- Pozniak, A. (2001). HIV fusion inhibitors. *J HIV Ther* 6(4), 91-4.
- Poutanen, S. M., Low, D. E., Henry, B., Finkelstein, S., Rose, D., Green, K., Tellier, R., Draker, R., Adachi, D., Ayers, M., Chan, A. K., Skowronski, D. M., Salit, I., Simor, A. E., Slutsky, A. S., Doyle, P. W., Kraiden, M., Petric, M., Brunham, R. C., and McGeer, A. J. (2003). Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *New England J Med* 348, 1995-2005.

40
41

- Qureshi, N., Coy, D., Garry, R., and LA, H. (1990). Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *AIDS* 4, 553-558.
- Richardson, C. D., Scheid, A., and Choppin, P. W. (1980). Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology* 105(1), 205-22.
- Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M. H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C., Burns, C., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A. D., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., and Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Science*, 300, 1394-1399.
- Silburn, K. A., McPhee, D. A., Maerz, A. L., Pountourios, P., Whittaker, R. G., Kirkpatrick, A., Reilly, W. G., Manthey, M. K., and Curtain, C. C. (1998). Efficacy of fusion peptide homologs in blocking cell lysis and HIV-induced fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(5), 385-92.
- Sodroski, J. G. (1999). HIV-1 entry inhibitors in the side pocket. *Cell* 99(3), 243-6.
- Suarez, T., Gallaher, W. R., Agirre, A., Goni, F. M., and Nieva, J. L. (2000). Membrane interface-interacting sequences within the ectodomain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: putative role during viral fusion. *J Virol* 74(17), 8038-47.
- Watanabe, S., Takada, A., Watanabe, T., Ito, H., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2000). Functional importance of the coiled-coil of the Ebola virus glycoprotein. *J Virol* 74(21), 10194-201.
- Weissenhorn, W., Carfi, A., Lee, K. H., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1998). Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell* 2(5), 605-16.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387(6631), 426-30.
- Wild, C., Greenwell, T., and Matthews, T. (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Research & Human Retroviruses* 9(11), 1051-3.
- Wild, C., Oas, T., McDanal, C., Bolognesi, D., and Matthews, T. (1992). A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21), 10537-41.
- Wilson, I. A., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289(5796), 366-73.
- Young, J. K., Li, D., Abramowitz, M. C., and Morrison, T. G. (1999). Interaction of peptides with sequences from the Newcastle disease virus fusion protein heptad repeat regions. *J Virol* 73(7), 5945-56.
- Yuan, K., L. Yi, J. Chen, X. Qu, T. Qing, X. Rao, P. Jiang, J. Hu, Z. Xiong, Y. Nie, et al. 2004.

41
42

- 34 -

Suppression of SARS-CoV entry by peptide corresponding to heptad regions on spike glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319:746-752.

Zhu, J., G. Xiao, Y. Xu, F. Yuan, C. Zheng, Y. Liu, H. Yan, D.K. Cole, J.I. Bell, Z. Rao, 2004. Following the rule: formation of the 6-helix bundle of the fusion core from severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein and identification of potent peptide inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319:283-288.

42
43

- 35 -

CLAIMS:

1. A method of identifying a compound capable of preventing or inhibiting viral infection of a host cell, the method comprising:
 - (a) preparing a target comprising the amino acid sequence of a viral fusion initiation region (FIR), wherein the FIR is from a virus having a membrane fusion protein comprising: (i) at least two extended alpha helices, (ii) a fusion peptide, and (iii) a fusion initiation region;
 - (b) screening a plurality of compounds to identify at least one compound that binds to the target, a target-binding compound;
 - (c) screening at least one target-binding compound to identify a target-binding compound capable of preventing or inhibiting viral infection of a host cell by a virus with a fusion protein comprising the FIR.
2. The method of claim 1 further comprising identifying a virus having a membrane fusion protein comprising: two or more alpha helices, a fusion peptide, and a fusion initiation region (FIR).
3. The method of claim 1 wherein the target is a peptide analog, a peptide derivative, or a peptide mimic.
4. The method of claim 1 wherein the compound is an antibody or functional fragment thereof.
5. The method of claim 1 wherein the virus is from a family of viruses selected from the group consisting of arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses.
6. The method of claim 1 wherein the virus is selected from the group consisting of Lassa Virus, Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV), Junin Virus, Machupo Virus, Guanarito Virus, Sabia Virus, Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Virus, Murine Hepatitis Virus (MHV), Bovine Coronavirus, Canine Coronavirus, Feline Infectious Peritonitis Virus, Ebola Virus, Marburg Virus, Influenza A Virus, Influenza B

43
84

- 36 -

Virus, Influenza C Virus, Measles Virus, Mumps Virus, Canine Distemper Virus, Newcastle Disease Virus, Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1), Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2), Human T-cell Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1), Human T-cell Lymphotropic Virus 2 (HTLV-2), Human Intracisternal A-type Particle 1 (HIAP-1), and Human Intracisternal A-type Particle 2 (HIAP-2).

7. An isolated peptide comprising:
 - (a) an amino acid sequence or analogous sequence thereto of a viral fusion initiation region (FIR); or
 - (b) a functional segment of a FIR or analogous sequence thereto from a virus belonging to one of the group of virus families consisting of arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses, wherein the functional segment does not include HIV-1 TM CS3.
8. The peptide of claim 7 comprising an amino acid sequence or analogous sequence thereto of a viral fusion initiation region from a virus in a virus family selected from the group of virus families consisting of arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses.
9. The peptide of claim 7 wherein the FIR is from a virus selected from the group consisting of Lassa Virus, Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV), Junin Virus, Machupo Virus, Guanarito Virus, Sabia Virus, Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Virus, Murine Hepatitis Virus (MHV), Bovine Coronavirus, Canine Coronavirus, Feline Infectious Peritonitis Virus, Ebola Virus, Marburg Virus, Influenza A Virus, Influenza B Virus, Influenza C Virus, Measles Virus, Mumps Virus, Canine Distemper Virus, Newcastle Disease Virus, Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1), Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2), Human T-cell Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1), Human T-cell Lymphotropic Virus 2 (HTLV-2), Human Intracisternal A-type Particle 1 (HIAP-1), and Human Intracisternal A-type Particle 2 (HIAP-2) or the functional FIR fragment is from the a virus selected from the group consisting of Lassa Virus, Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV), Junin Virus, Machupo Virus, Guanarito Virus, Sabia Virus, Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Virus, Murine Hepatitis

44
45

- 37 -

Virus (MHV), Bovine Coronavirus, Canine Coronavirus, Feline Infectious Peritonitis Virus, Ebola Virus, Marburg Virus, Influenza A Virus, Influenza B Virus, Influenza C Virus, Measles Virus, Mumps Virus, Canine Distemper Virus, Newcastle Disease Virus, Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1), Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2), Human T-cell Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1), Human T-cell Lymphotropic Virus 2 (HTLV-2), Human Intracisternal A-type Particle 1 (HIAP-1), and Human Intracisternal A-type Particle 2 (HIAP-2).

10. The peptide of claim 7 having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 1-7, 8-15, 22-25 and 30.
11. The peptide of claim 7 having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 22-25 and 30.
12. The peptide of claim 7 having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 1-7 or a functional segment of any one of SEQ ID NOs 1-7.
13. A method of treating or preventing a viral infection comprising administering to a patient a compound identified by any of the methods of claims 1 to 6.
14. A method of treating or preventing a viral infection comprising administering to a patient a peptide of any of claims 7 to 12.
15. A method of treating or preventing a viral infection comprising administering to a patient an effective amount of a composition comprising of a recombinant DNA molecule that enables or stimulates the patient to produce the peptide of any of claims 7 to 12.
16. A method of treating or preventing a viral infection comprising administering to a patient an effective amount of antibody that binds specifically to a fusion initiation region.
17. An isolated antibody identified by the method of claim 1.
18. An antibody according to claim 17 capable of inhibiting membrane fusion of a virus having membrane fusion proteins comprising at least two extended alpha-helices and a

45
26

- 38 -

fusion peptide, wherein these proteins comprise a fusion initiation region (FIR) requisite for cell fusion, wherein the antibody binds to amino acid sequences within the FIR.

19. An isolated nucleic acid sequence capable of encoding a polypeptide having the sequence of a viral FIR or a sequence analogous thereto from a virus belonging to family of viruses selected from the group consisting of arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses.
20. A method of producing an antibody comprising:
 - (a) providing an antigen capable of eliciting an antibody that specifically recognizes
 - (i) a viral fusion initiation region (FIR), or
 - (ii) an antigenic fragment of a FIR from a virus belonging to one of the group of virus families consisting of arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses, wherein the fragment does not include HIV-1 TM CS3;
 - (b) introducing said antigen into an animal so as to elicit an immune response thereto;
 - (c) collecting antibodies from said animal; and
 - (d) identifying those antibodies that specifically recognize a FIR or antigenic fragment thereof.
21. The method of claim 20 wherein the antigen consists of an amino acid sequence or analogous sequence thereto of a viral fusion initiation region (FIR) from a virus in a virus family selected from the group of virus families consisting of arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses.
22. The method of claim 20 wherein the antigen comprises a peptide analog; a peptide derivative; or a peptide mimic of a fusion initiation region (or antigenic fragment thereof).
23. The method of claim 20 wherein the antigen comprises an isolated virus or an envelope fusion protein from an isolated virus.

24. A method of identifying a viral fusion initiation region (FIR) in a viral fusion protein sequence, the method comprising;
- (a) fitting the viral fusion protein sequence to the HIV transmembrane fusion protein scaffold
 - (b) identifying the FIR's amino terminus; and
 - (c) Identifying the FIR's carboxy terminus
25. The method of claim 24 wherein the viral FIR from a virus belonging to family of viruses selected from the group consisting of arenaviruses, coronaviruses, filoviruses, orthomyxoviruses, paramyxoviruses, and retroviruses.

27

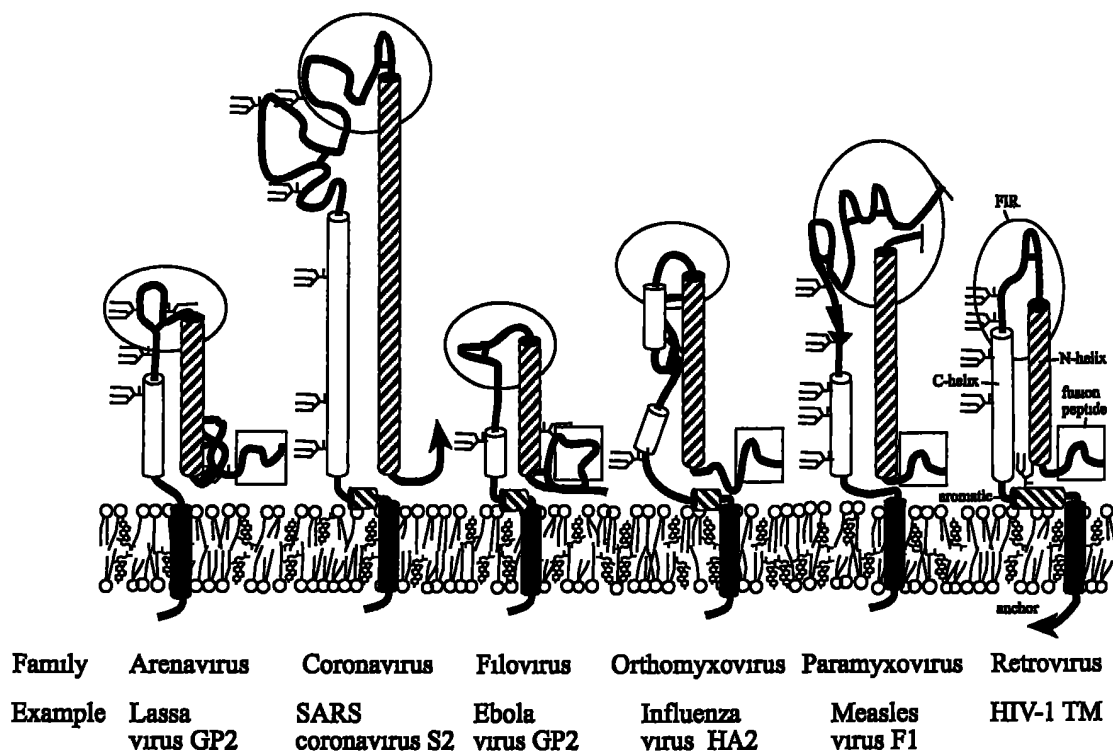
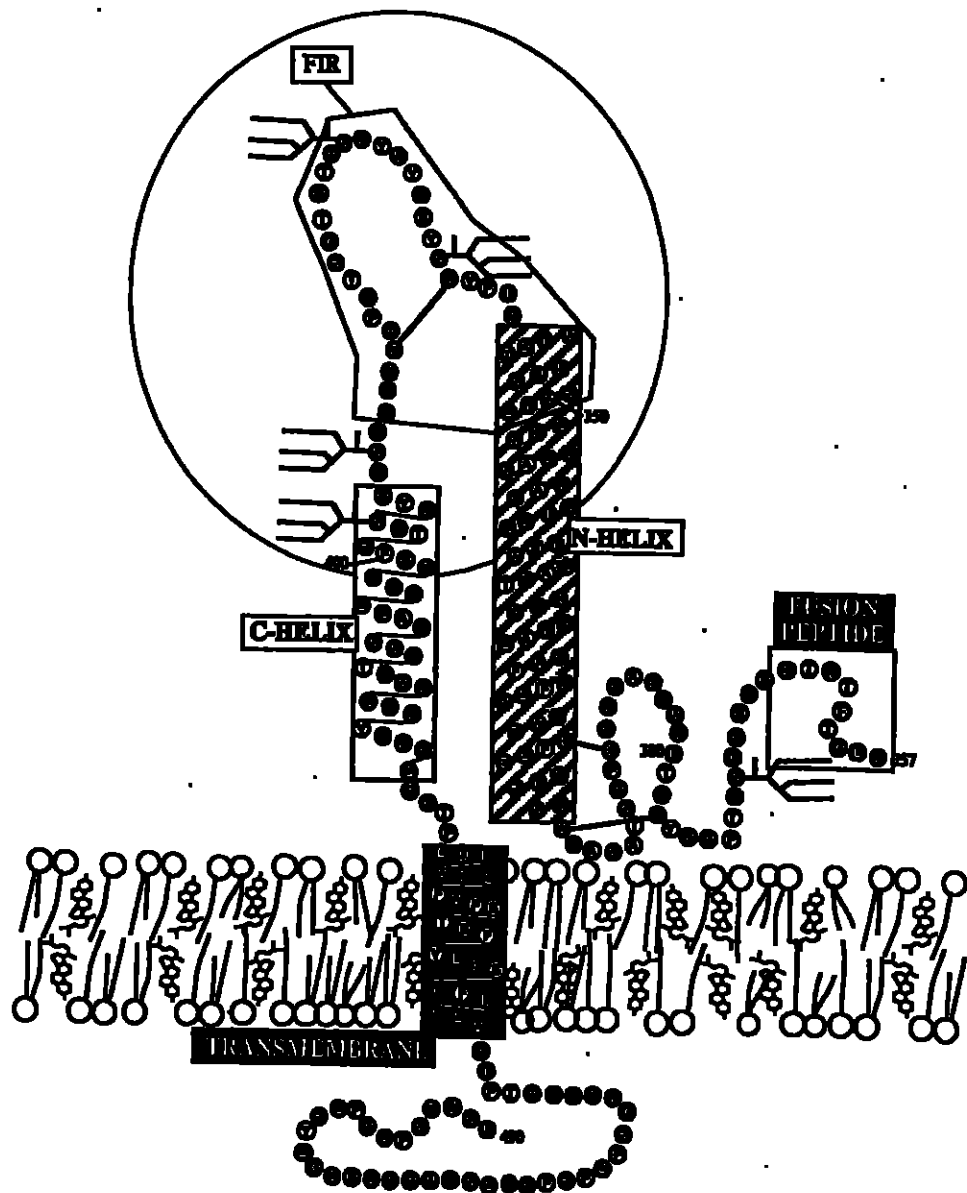


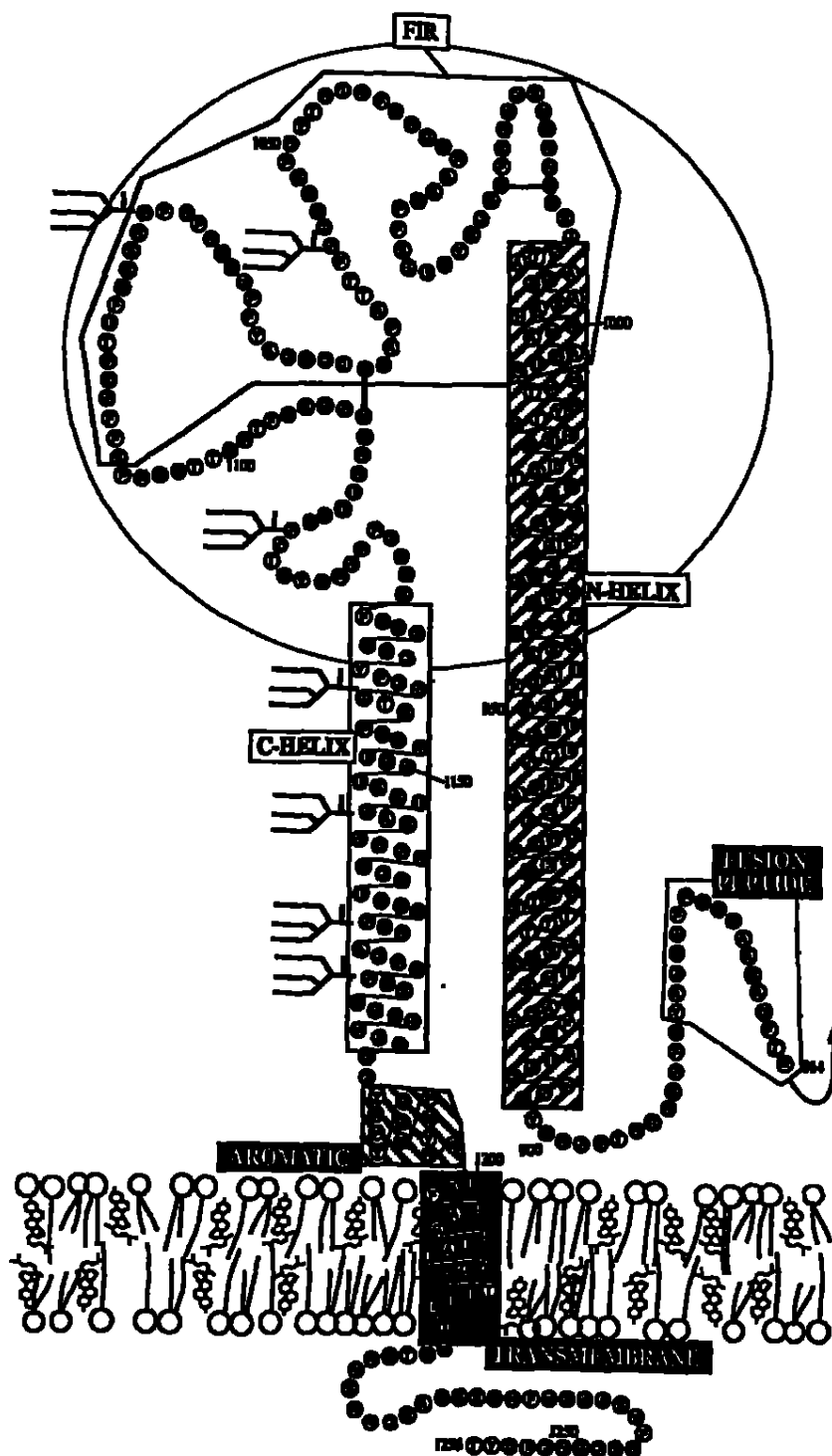
Figure 1

48
29



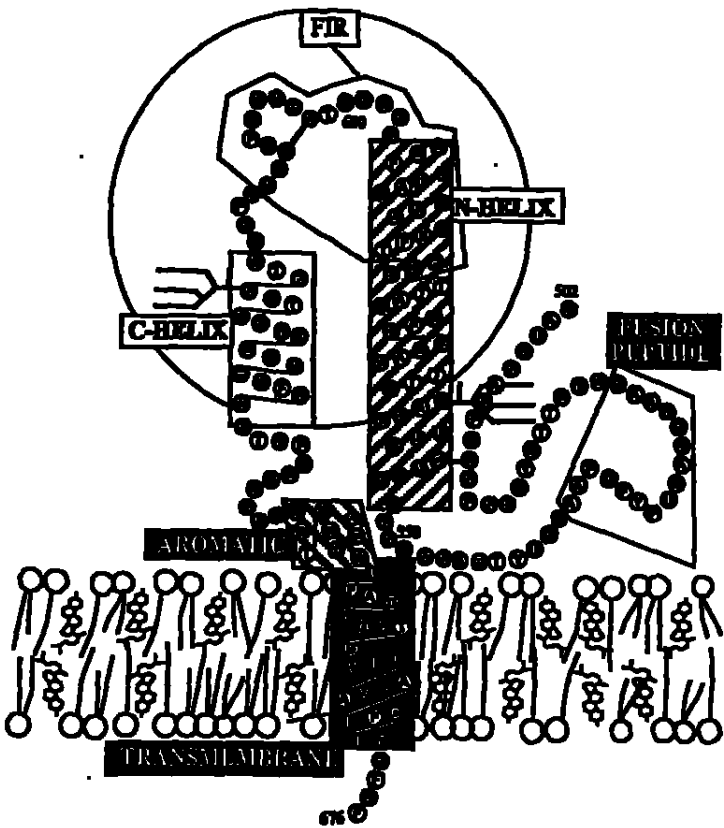
Lassa virus GP2
Figure 2

49
50



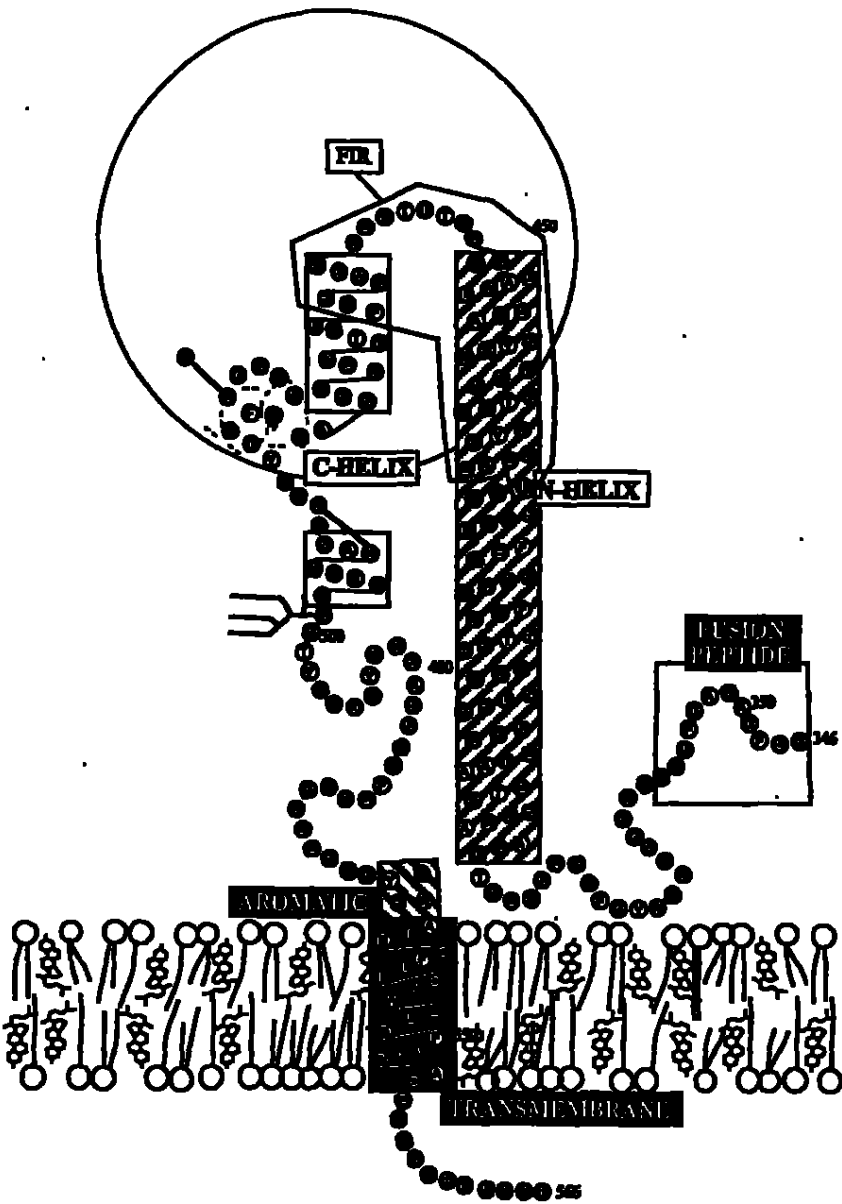
SARS CoV S
Figure 3

50
51

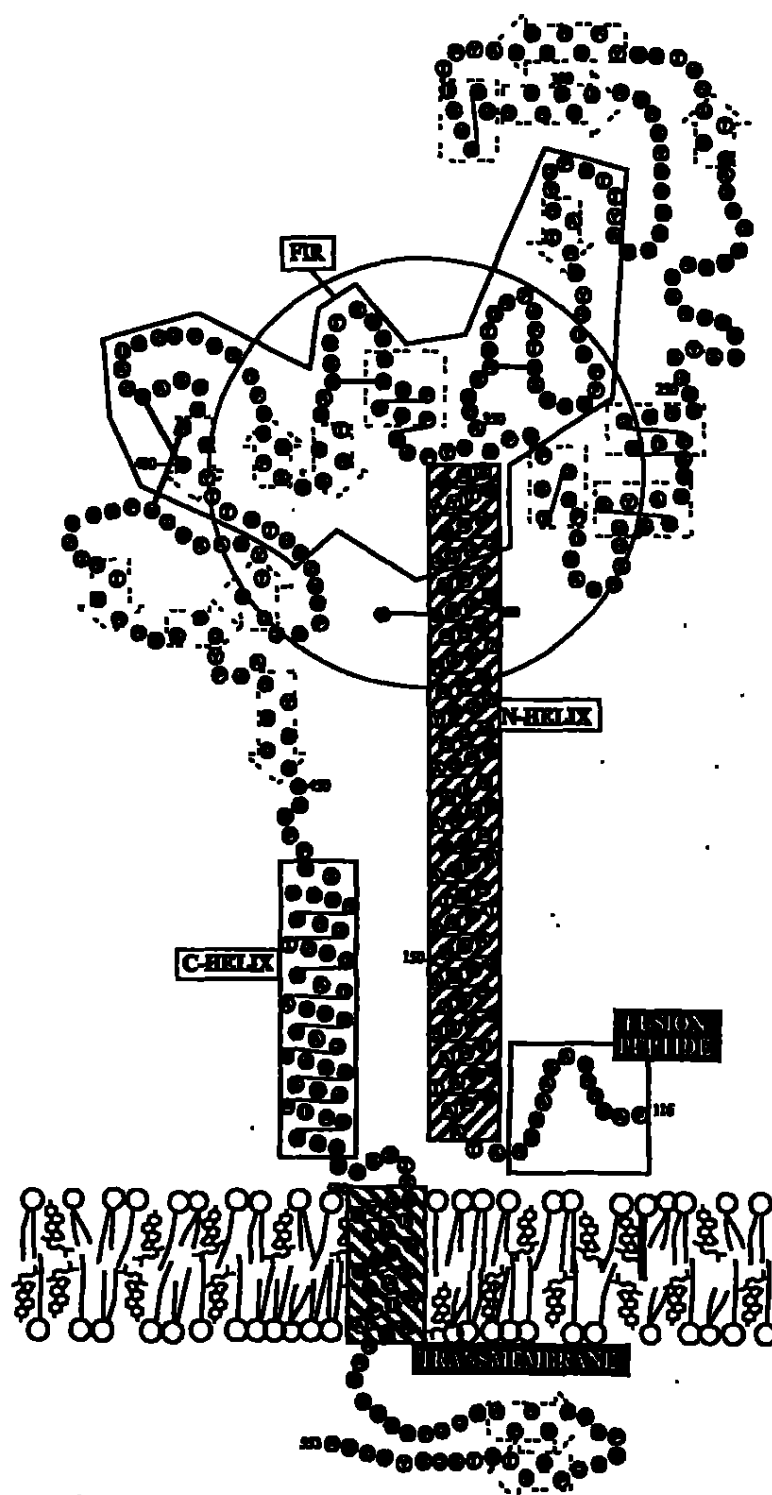


Ebola virus GP2
Figure 4

SA
52



influenza virus HA2
Figure 5



measles virus F1
Figure 6

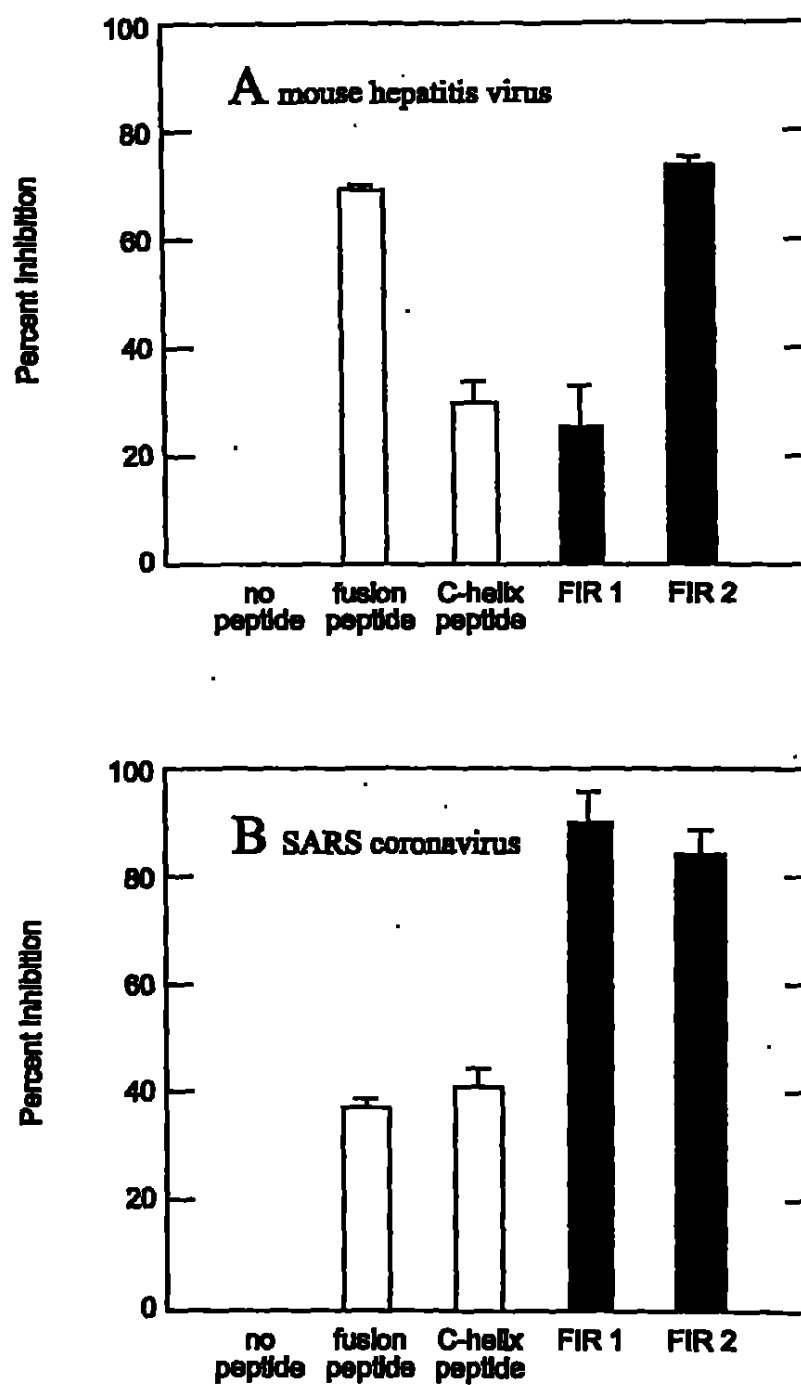
54
55

Figure 8

~~58~~
56

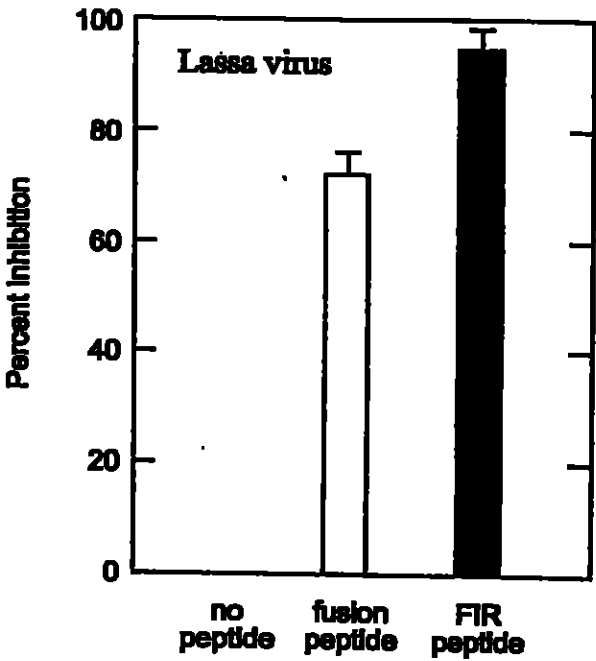


Figure 9

SEQUENCE LISTING

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

<120> METHOD OF PREVENTING VIRUS:CELL FUSION BY INHIBITING THE FUNCTION
OF THE FUSION INITIATION REGION IN RNA VIRUSES HAVING CLASS I
MEMBRANE FUSOGENIC ENVELOPE PROTEINS

<130> 12920.0013.00PC00

<150> US 60/517,181

<151> 2003-11-04

<160> 31

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 3
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<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

<210> 4
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 4

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
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<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
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

58
59

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 7

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 8

Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

89
60

<223> Synthetic peptide

<400> 9

Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys
1 5

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 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

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 11

Leu Lys Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Glu
1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 12

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

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

60
61

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220> .
<223> Synthetic peptide

<400> 14

Cys Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser Cys
1 5

<210> 15
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<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

<210> 16
<211> 234
<212> PRT
<213> LASSA VIRUS

<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

61
62

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
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> SARS VIRUS
 <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

62
63

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
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> EBOLA VIRUS
 <400> 18
 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

63
64

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
<211> 191
<212> PRT
<213> INFLUENZA VIRUS

<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

<211> 438
<212> PRT
<213> MEASLES VIRUS

<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

10/13

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
<211> 199
<212> PRT
<213> HIV

<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
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<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
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 23

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
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<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
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial sequence

67
68

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 29

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial sequence

~~68~~

69

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 30

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

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

69
70

**MÉTODO PARA PREVENIR LA FUSIÓN VIRUS-CÉLULA AL INHIBIR LA
FUNCIÓN DE LA REGIÓN DE INICIACIÓN DE FUSIÓN EN VIRUS ARN QUE
TIENEN PROTEÍNAS DE CUBIERTA FUSOGÉNICA DE MEMBRANA CLASE I**

TÍTULO

[0001] Esta Solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Serie Número 60/517,181, presentada en noviembre 4, 2003, que se incorpora aquí como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se relaciona con un método para prevenir o inhibir la infección viral de una célula y/o la fusión entre la cubierta de un virus y las membranas de una célula que son blanco del virus (previniendo de esta manera el suministro del genoma viral dentro del citoplasma de la célula, una etapa que se requiere para la infección viral). La presente invención suministra métodos para identificar una región de iniciación de fusión, o FIR, de los virus. La presente invención suministra un método para identificar el FIR en estos virus. La presente invención suministra además los métodos para prevenir la infección de un virus Tipo I al interferir con su FIR.

INTRODUCCIÓN

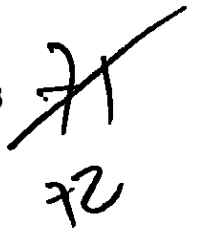
[0003] Todos los virus deben unirse e invadir sus células blanco para replicarse. Para los virus con cubierta de animales, que incluyen los virus ARN que tienen proteínas de fusión de membrana clase I (virus Tipo I), el proceso involucra

20
21

(a) unir el virión a la célula blanco (b) fusión de la cubierta del virus con la membrana del plasma o una membrana celular interna (c) desestabilización de la cubierta viral y de la membrana celular en el área fusionada para crear un poro de fusión, (d) transferir el ARN viral a través del poro y (e) modificación de la función celular por el ARN viral.

[0004] La fusión de la membrana viral y de la cubierta de la célula, etapas (b) y (c) anteriores están mediadas por la interacción de una glicoproteína de transmembrana viral (proteína de fusión) con proteínas y membranas de superficie de la célula blanco. Estas interacciones originan cambios conformacionales en la proteína de fusión que dan como resultado la inserción del péptido de fusión viral en la membrana de la célula blanco. Esta inserción es seguida por cambios conformacionales adicionales dentro de la proteína de fusión que llevan la cubierta viral y las membranas de la célula a una proximidad y que dan como resultado la fusión de las dos bicapas de membrana.

[0005] Un virus es incapaz de esparcirse y propagarse dentro de su huésped si este proceso de fusión se interrumpe. La interrupción intencional de este proceso de fusión se puede lograr al dirigir los péptidos y el péptido que semeja los homólogos a las secuencias de proteína de fusión, anticuerpos que reconocen la proteína de fusión, y otros factores que actúan contra la proteína de fusión.



ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Similitudes Estructurales entre la Proteínas de Fusión Clase I de los Virus ARN.

[0006] La hemaglutinina 2 (HA2) del virus de la influenza, un ortomixovirus, es una proteína de fusión clase I de un virus ARN prototípico y contiene un dominio hidrófobo amino terminal, denominado como el péptido de fusión, que está expuesto durante el clivage de la proteína precursora hemaglutinina. Las proteínas de fusión de la membrana de los virus ARN provenientes de varias familias diversas, incluyen arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus, comparten varias características estructurales comunes con el HA2 y se han denominado como proteínas de fusión viral Clase I. Se ha observado que la proteína de fusión del HIV-1, la glicoproteína de transmembrana y otras proteínas de transmembrana retrovirales, similares a aquellas de los ortomixovirus y paramixovirus, poseen un dominio de péptido de fusión hidrófobo expuesto durante el clivage de un precursor (gp 160) (Gallagher, 1987; González-Scarano *et al.*, 1987). Con base en estas similitudes y los algoritmos de computadora que predicen las configuraciones de la proteína, se ha sugerido (Gallagher *et al.*, 1989) que la porción externa (ectodominio amino terminal) de la proteína de transmembrana HIV-1 y las proteínas de transmembrana de otros retrovirus, todos podrían ajustarse al andamiaje de la estructura HA2 como se determinó mediante cristalografía de rayos x (Wilson, Skehel, and Wiley, 1981).

[0007] Con base en estas observaciones, se predijo que las proteínas de transmembrana retroviral contienen varias características estructurales además

72
73

del péptido de fusión en común con la estructura conocida del HA2, que incluye una hélice amino terminal extendida (hélice-N, usualmente un "repetición heptad" o "cremallera leucina"), una hélice carboxiloterminal (hélice-C), y un motivo aromático próximo al dominio de transmembrana. La presencia de al menos cuatro de estos cinco dominios define una proteína de cubierta viral como una proteína de fusión Clase I. El modelo de proteína de transmembrana retroviral fue confirmado subsecuentemente mediante las determinaciones estructurales y los análisis mutacionales (Chan *et al.*, 1997). Los motivos estructurales comunes están presentes no solamente en las proteínas de fusión de los ortomixovirus y los retrovirus, sino también en aquellos de paramixovirus, filovirus (tal como el virus del Ebola, Ebo V) (Gallaher, 1996) y arenavirus (Gallaher, DiSimone, y Buchmeier, 2001). El modelo estructural Gallaher de la proteína de fusión Ebo V (GP2) también ha sido confirmado mediante los métodos cristalográficos de rayos x (Malashkevich *et al.*, 1999), Weissenhorn *et al.*, 1998).

[0008] La figura 1 muestra los cinco dominios, previamente descritos, de las proteínas de fusión de las seis familias de los virus Tipo I. Las proteínas de fusión se originan en un péptido de fusión hidrófobo, terminan en un péptido ancla, e incorporan una alfa hélice amino terminal extendida (hélice N, usualmente una "repetición heptad" o "cremallera leucina"), una alfa hélice carboxilo terminal (hélice C) (Carr and Kim, 1993; Suarez *et al.*, 2000; Wilson, Skehel, y Wiley, 1981), y algunas veces un motivo aromático próximo a la cubierta del virión. También se muestra en el sexto dominio, la región de iniciación de fusión (FIR), descubierta por los presentes inventores.

73
74

Inhibición de Fusión en los Virus Tipo I

[0009] Los intentos previos de los presentes inventores (Garry) y otros de diseñar péptidos imitadores, anticuerpos, y otros factores que inhiben la fusión en los virus Tipo I se han enfocado 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, análogos de los ortomixovirus y paramixovirus (Richardson, Scheid, y Choppin, 1980) y los dominios de péptido de fusión del HIV-1 (Gallaher et al., 1992; Owens et al., 1990; Silburn et al., 1998) se ha encontrado bloqueo en la infección viral, presumiblemente al formar heteroagregados inactivos. Los péptidos que corresponden a la porción de la hélice N y la hélice C también se han encontrado como efectivos para inhibir la infección viral tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, un péptido de 17 aminoácidos que corresponde a la porción carboxi terminal de la hélice N de la proteína de fusión del HIV-1, definida como la región CS3, bloquea la infección HIV (Qureshi et al., 1990). Además, otros péptidos inhibidores de hélice N y hélice c se desarrollaron con base en el modelo estructural de la proteína de fusión (Wild, Greenwell, y Matthews, 1993; Wild et al., 1992), que incluye la droga peptídica anti-HIV-1 de hélice C DP178 (T-20 o FUZEON®). El DP178 traslapa la hélice C y el dominio próximo a ancla aromático e inhibe la fusión virion HIV-1: célula a concentraciones muy bajas (50% de la inhibición a 1.7 nM) logable *in vivo* luego de inyección. En un ensayo clínico, 100 mg/ día de DP178 originaron una reducción de aproximadamente 100 veces en la carga del HIV-1 en el plasma de individuos infectados (Kilby et al., 1998). Este resultado ha motivado grandemente la investigación de otros péptidos inhibidores de HIV-1 con base en la estructura de proteína de transmembrana (Pozniak, 2001; Sodroski, 1999). Los inhibidores peptídicos de los paramixovirus también han mostrado que inhiben la replicación viral (Lambert et al., 1996; Young et al., 1999).

JA
75

Estudios de Watanabe y colegas sugieren que una aproximación similar de tener como blanco la hélice N y la hélice C de Ebo V GP2 también puede conducir a inhibidores útiles (Watanabe *et al.*, 2000) . Neutralizando los anticuerpos dirigidos contra porciones de los dominios de proteína de fusión también ha mostrado que inhibe la fusión virión:célula.

Observaciones en HIV-1

[0010] Muchos de los estudios se han dedicado a la inhibición de la fusión en virus de la inmunodeficiencia humana HIV-1, uno de los virus ARN Tipo I. Bolognesi *et al* (5,464,933) y los presentes inventores (Garry, USPN 5,567,805) enseñan que la muerte celular mediada por HIV se puede inhibir al introducir péptidos que se unen a porciones de la proteína de fusión de transmembrana del virión HIV-1. La región de unión DP178 Bolognesi, marcada FUZEON® en la Figura 7, descansa primariamente sobre la hélice C y está por fuera de lo que se describe en la presente solicitud, la región de iniciación de fusión (FIR). Bolognesi demuestra inhibición pero no enseña un método de inhibición. Los actuales inventores (Garry) demostraron previamente la inhibición de la región CS3 del HIV-1 TM, marcado CS3 en la Figura 7, pero no identificaron un método de inhibición, sugiriendo solamente que la interacción del receptor CS3:CS3 se inhibió. El descubrimiento inesperado del FIR por los presentes inventores (como se describe normalmente aquí) y el hecho de que la secuencia SC3 descansan dentro del FIR indican que la unión del receptor CS3:CS3 descrita en la USPN 5,567,805 es de hecho una unión que ocurre entre la porción CS3 del FIR y las porciones de la membrana de la célula para las cuales la porción CS3 del FIR tiene una afinidad. Además, aunque Melikyan, Watanabe, Bewley, y otros han descrito la inhibición de la fusión con péptidos introducidos, ellos no han explicado

78.
76

los mecanismos a través de los cuales ocurre la inhibición. Correspondientemente, la locación del péptido FUZEON® es distante del FIR, lo que sugiere fuertemente que otros elementos del proceso de fusión operan en la región FUZEON®.

[0011] En vista de lo anterior, es claro que subsiste la necesidad en la técnica de medios más efectivos para identificar aquellas regiones de los virus que estén involucrados en el proceso de infección y de composiciones efectivas para prevenir o inhibir la infección viral. La invención descrita y muestra aquí suministra una solución efectiva a estas necesidades.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] varias modalidades de la presente invención suministran métodos para identificar "factores" (compuestos) capaces de inhibir la fusión de membrana entre los virus y sus células huésped y, por lo tanto, evitar o inhibir la infección de la célula huésped por el virus. Aspectos de ésta modalidad de la invención suministran métodos para identificar estos "factores" inhibidores donde el método comprende la etapa de (a) identificar un virus que tiene una proteína de fusión de cubierta que tiene 2, o más, alfa hélices extendidas, un péptido de fusión, y una región de iniciación de fusión (FIR); (b) preparar un "blanco" en donde el blanco comprende una secuencia de aminoácido del FIR, (c) exponer el "blanco" a uno o más compuestos de ensayo, (d) identificar aquellos compuestos de ensayo que interactúan físicamente con el "blanco". Por ejemplo, la interacción física se puede detectar utilizando un "blanco" unido a un sustrato sólido y a un compuesto de ensayo fluorescente o radiactivamente marcado en un ensayo de unión estándar. Los compuesto blanco y de ensayo que tienen coeficientes de disociación (K_d) en

26

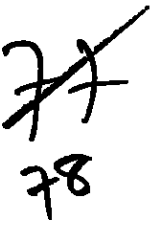
27

el rango micromolecular o inferior (es decir $\leq$ aproximadamente a 9×10^{-5}) se consideran como positivamente interactuantes.

[0013] Otros aspectos de la presente invención suministran composiciones que comprenden un péptido aislado que tiene una secuencia de aminoácido de una región de iniciación de fusión viral (FIR) o un segmento funcional del FIR o que tiene una secuencia de aminoácido que es análoga a la secuencia de un FIR o un segmento funcional de un FIR. Como se utiliza aquí, la secuencia de aminoácido análogo o de péptido es una secuencia que contiene una mayoría de aminoácidos idénticos o químicamente similares en el mismo orden que la secuencia primaria. Tales similitudes químicas son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica.

[0014] Otros aspectos de esta modalidad de la invención suministran péptidos aislados, típicamente sustancialmente purificados o análogos de péptidos que son capaces de prevenir o inhibir la infección viral de una célula huésped y/o inhibir la fusión de membrana de un virus con una célula huésped, donde el virus comprende una proteína de fusión de membrana que tiene dos hélices alfa (extendidas), un péptido de fusión y un FIR.

[0015] Las modalidades adicionales de la presente invención suministran métodos para tratar o prevenir la infección viral al administrar a un paciente uno o más de los compuestos identificados mediante los métodos descritos aquí capaces de inhibir la infección viral. En varios aspectos de esta modalidad de la invención los compuestos administrados son péptidos o análogos de péptidos que comprenden todos o un segmento funcional de una secuencia FIR. En cualquier aspecto de esta modalidad de la invención el compuesto administrado es



antigénico y administrado en una cantidad suficiente para elicitir una respuesta inmune.

[0016] Otras modalidades de la presente invención suministran un "factor molecular", tal como un plásmido, virus recombinante, u otra sustancia, que posibilita o estimula una célula u organismo a producir un péptido análogo de péptido que sea capaz de prevenir o inhibir una infección viral de esta célula u organismo. En cualquier aspecto de esta modalidad el "factor molecular" es capaz de prevenir o inhibir una infección viral cuando se administra a un paciente.

[0017] Otras modalidades de la presente invención suministran anticuerpos capaces de inhibir la fusión de membrana virus: célula de un virus que tiene una proteína de fusión que comprende dos, hélices alfa extendidas, un péptido de fusión y un FIR. En un aspecto de ésta modalidad de la invención los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a secuencias de aminoácido que comprenden la secuencia FIR, o fragmentos de estas de tamaño suficiente para permitir el reconocimiento del anticuerpo. Varios aspectos de esta modalidad en la invención suministran métodos para producir los anticuerpos. En ciertos aspectos de esta modalidad, el método para producir los anticuerpos comprende: (a) suministrar como el antígeno un péptido que comprende una región de iniciación viral (FIR) o un fragmento antigénico del FIR; (b) introducir el antígeno en un animal con el fin de elicitir una respuesta inmune; (c) recolectar anticuerpos del animal; y opcionalmente, (d) purificar los anticuerpos recolectados para identificar esa fracción de los anticuerpos recolectados que tienen una alta especificidad por el antígeno.

28
29

[0018] Otras modalidades de la presente invención suministra métodos para tratar pacientes, cuyos métodos comprenden administrar al paciente anticuerpos que reconocen específicamente y se unen a péptidos que comprenden la región FIR proveniente de virus o que comprenden un fragmento funcional de tal región FIR donde el fragmento funcional es de suficiente tamaño para permitir su reconocimiento específico por un anticuerpo (esto es, un fragmento antigénico).

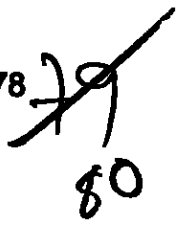
[0019] Otras modalidades de la presente invención suministra métodos para producir anticuerpos específicos para el FIR o fragmentos funcionales de este.

MODALIDADES ILUSTRATIVAS DE LA INVENCION

El Sexto Dominio de los Virus ARN que tiene Proteínas de Fusión de Membrana clase I.

[0020] Los arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus son seis familias de virus ARN habitualmente identificadas que tienen proteínas de cubierta de fusión de membrana Clase I. Las proteínas de fusión de estos virus Tipo I han sido mostradas previamente por los presentes inventores (Garry) y otros por incorporar cinco motivos conservados, o dominios (Carr and Kim, 1993; Gallaher *et al.*, 1989); Suárez *et al.*, 2000; Wilson, Skehel, and Wiley, 1981). Estos dominios comprenden un péptido de fusión, una hélice N, una hélice C, y un motivo aromático, todos los cuales son ectodominios, y un péptido ancla, que es un endodominio.

[0021] Utilizando análisis computacional, los modelos de estructura secundaria, los cálculos de hidrofobicidad interfacial y otras técnicas, los presentes



inventores han hecho un descubrimiento sorprendente de un sexto dominio altamente conservado que está presente en las proteínas de fusión de una amplia variedad de virus (el sexto dominio se describe aquí). Los virus que poseen este dominio incluyen, pero no están necesariamente limitados a las seis clases de virus ARN listados anteriormente. Para enfatizar la función crítica de este dominio recientemente identificado, que es un ectodominio, el dominio se denomina aquí como región de iniciación de fusión (FIR) de los virus.

[0022] Varias modalidades de la presente invención suministran métodos para identificar el FIR en las familias arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus de los virus. También se suministran métodos para determinar si el FIR está presente en otras familias de virus conocidas o en cualquier familia de virus recientemente descubierta.

[0023] Como se utiliza aquí el término hélice alfa "extendida" se refiere a una hélice alfa que tiene más de cuatro "vueltas de hélice alfa" (específicamente, más de 14 aminoácidos).

[0024] Otras modalidades suministran "factores" que los inventores han encontrado inesperadamente son efectivos para prevenir o inhibir la infección viral y/o la fusión virus:célula.

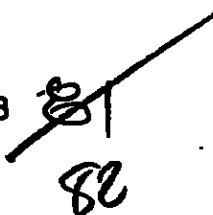
[0025] Como se utiliza aquí el término "factores" incluye, pero no está limitado a péptidos aislados o segmentos de péptido funcional (o análogos de péptido de estos) o Los dominios de región de iniciación de fusión recientemente descrita (FIR), ("péptidos semejantes" se refiere a cualquier compuesto o sustancia que podría servir como un sustituto para un péptido que interactúa con



el FIR, que es cualquier compuesto que semeja las propiedades de un segmento funcional de FIR), anticuerpos específicos para los dominios FIR funcionales (por ejemplo los anticuerpos idiotípicos o anti-idiotípicos) y otros compuestos moleculares que interfieren con la unión y/o fusión virus:célula.

[0026] Como se utiliza aquí 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 viral, capaz de elicitar un anticuerpo capaz de reconocer una unión específica al FIR y/o interferir con la infección de célula mediada por FIR.

[0027] Como se utiliza aquí, un "análogo de péptido" o "péptido modificado" es definido preferiblemente como un péptido FIR modificado que contiene un grupo amino, un grupo acetilo, un grupo hidrófobo (por ejemplo carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo) o un grupo portador macromolecular (por ejemplo conjugado lípido, polietilenglicol carbohidrato o proteína) en el terminal amino. Una clase adicional de análogo y de péptido FIR contiene un grupo carboxilo, un grupo amido, un grupo hidrófobo o un grupo portador macromolecular en el terminal carboxilo. Otros análogos de péptido se definen en los péptidos FIR en donde al menos una unión que enlaza residuos de aminoácidos adyacentes es una unión no péptido (por ejemplo una unión imido, éster, hidracina, semicarbazoide o azo), un péptido en donde al menos un residuo o aminoácido está en una de las configuraciones de isómero D o un péptido en el cual el orden de los aminoácidos se invierte. Los análogos de péptido adicionales son péptidos FIR que comprometen al menos una sustitución de aminoácido en donde el primer residuo de aminoácido está sustituido por un segundo, diferente residuo de aminoácido (la sustitución de aminoácido puede ser una sustitución conservada o una sustitución



no conservada). Como se utiliza aquí, tales análogos de péptido pueden comprender secuencias de aminoácido análogas en las cuales las secuencias análogas contienen una mayoría de aminoácidos idénticos o químicamente similares en el mismo orden que las secuencias primarias.

[0028] Como se utiliza aquí el término "región de iniciación de fusión" (FIR) se refiere generalmente a un régimen de proteína de fusión viral involucrado en la o etapas iniciales de la infección viral y/o la fusión con una célula huésped.

[0029] Como se utiliza aquí el término "péptido semejante" incluye, pero no está limitado a compuestos orgánicos u otros químicos que semejan la estructura o función del péptido FIR. Ejemplos de péptidos semejantes incluyen, pero no están limitados a compuestos orgánicos que comprenden los grupos laterales funcionales de un aminoácido o péptido, pero que les falta la estructura carbono/nitrógeno o las uniones péptido. Péptido semejante también se refiere a compuestos que semejan la acción de estos grupos laterales funcionales con otras porciones.

[0030] Otras moléculas, tales como los anticuerpos idiotipo o anti-idiotipo o las proteínas seleccionadas por vía de métodos que despliegan fago, que se unen a los péptidos, análogos de péptido o péptido semejantes descritos en la presente solicitud también pueden funcionar como inhibidores de la infección viral y/o la fusión virus:célula. También se contempla en la presente invención plásmidos, o virus recombinantes, u otras moléculas o compuestos que posibilitan o estimulan al paciente a producir un análogo de los compuestos inhibidores. Por ejemplo, una proteína recombinante, producida en una bacteria, hongo, o célula de mamífero trabajada por ingeniería se puede utilizar para producir un análogo inmunogénico

82
83

del FIR de una proteína de fusión viral. De manera similar, una respuesta anti-idiotípica se puede inducir en el individuo al utilizar proteínas trabajadas con ingeniería que comprenden una secuencia que corresponde al sitio de unión del anticuerpo específico de FIR.

[0031] Como se utiliza aquí el término "péptido de fusión" se refiere preferiblemente a una secuencia hidrófoba cerca del amino terminal de la proteína de fusión viral Clase I (ver Gallaher *et al.*, 1987; 1992). Como se utiliza aquí el término péptido "sustancialmente purificado" o análogo de péptido preferiblemente se refiere a un péptido o análogo de péptido que es mayor aproximadamente de 80% de pureza. Más preferiblemente, "sustancialmente purificado" se refiere a un péptido análogo de péptido que es mayor de aproximadamente 90% o mayor de aproximadamente 95% de pureza. Más preferiblemente este se refiere a un péptido análogo dipéptido que es mayor de 96%, 97%, 98%, o 99% puro. Funcionalmente, "sustancialmente purificado" significa que está libre de contaminantes a un grado que lo hace adecuado para el propósito suministrado aquí. Los métodos para evaluar la pureza son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los métodos adecuados incluyen, pero no están limitados a cromatografía de gas (GC) espectrometría de masa ligada, análisis de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), y ensayos funcionales en sistemas de cultivo de célula que, *inter alia*, evalúan la citotoxicidad.

[0083] Como se utiliza aquí el término "análogo estable" se refiere a un péptido que tiene vida media activa en sistemas biológicos. Se contemplan vidas medias biológicas mayores de 60 minutos.

83
84

[0034] Como se utiliza aquí el término "derivado de péptido" se refiere a un péptido que tiene aminoácidos sustituidos diferentes de aquellos en la secuencia FIR de una proteína de fusión viral. En donde las sustituciones no hacen al péptido inútil para la presente invención.

[0035] De acuerdo con varios aspectos de la presente modalidad de la invención los péptidos, análogos de péptido, péptido semejantes u otros factores pueden ser producidos por cualquiera medios conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, síntesis química, métodos de ADN recombinantes y combinaciones de éstos.

[0036] La presente invención suministra métodos para identificar el FIR de los virus Tipo I, y otros y para tratar o prevenir la infección por estos virus. Un posible mecanismo que la presente invención puede evitar y/o inhibir infecciones al interferir con la fusión virus:célula mediada por FIR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0037] La figura 1 muestra los dominios de las proteínas de fusión de un miembro de cada una de las seis familias virales a saber arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus. Los círculos de la figura 1 muestran un sitio aproximado del FIR en cada virus ilustrado.

[0038] Las figuras 2 a 7 muestran las secuencias de aminoácido de éstas proteínas de fusión (que corresponden a la SEQ ID NO: 16-21, respectivamente) y una representación esquemática de su estructura ectópica. Se muestran específicamente los cinco dominios previamente descritos que son los péptidos de

SA
85

fusión, es decir, la hélice N, la hélice C, el motivo aromático (está presente), y el péptido ancla. El sexto dominio recientemente descubierto, la región de iniciación de fusión, o el FIR también se identifica. Cada FIR se indica por un polígono en las figuras 2 a 7.

[0039] El área circulada detrás de las proteínas de fusión en cada una de las figuras 2-7 representa la proteína de unión virus:célula primaria (VCBP) del virus. El VCBP usualmente interactúa con la porción de la proteína de fusión que es la más distante de la membrana viral y muestra así que está así ubicada en las figuras. A diferencia de la proteína de fusión altamente conservada, el VCBP de cada familia de virus es más divergente. Este es usualmente el VSBP que dicta el rango de huésped del virus y determina cuales de los tipos de célula huésped son blanco para infección. El VCBP actúa en esta capacidad al reconocer y unirse con proteínas de superficie células específicas. La unión del VCBP a las proteínas de célula objetivo ocurre antes de y son típicamente un pre requisito de la fusión virus:célula.

[0040] Figura 8: Inhibición de infectividad de coronavirus mediante péptidos de región de iniciación de fusión. Entre 50 y 100 PFU de sepas de virus de hepatitis de ratón A59 o sepas coronavirus SARS Urbani fueron pre encubadas con o sin los péptidos indicados (~100µM) en DMEM libre de suero durante 1 h. Las células fueron entonces puestas a inóculo tratado con péptido o un control de vehículo (no péptido). Después de una hora de adsorción el inóculo se removió, las células se lavaron dos veces con solución salina amortiguada con fosfato IX, y las células se sobrepusieron con DMEM que contiene 10% de FBS y 0.5% de agarosa. Cuarenta ocho horas después de la infección, las monocapas infectadas se fijaron y tiñeron con violeta cristal para determinar los números de placa.



[0041] La figura 9: inhibición de la infectividad del virus Lassa mediante péptidos con región de iniciación de fusión. Entre 50 y 100 PFU de virus Lassa se preincubó con o sin los péptidos indicados (~100µM) en BME libre de suero durante 1 h. Las células fueron entonces expuestas al control de inóculo o vehículo tratado con péptido (sin péptido). Después de 1 h de adsorción, se removió el inóculo, las células fueron lavadas dos veces con IX solución salina amortiguada con fosfato y las células se sobrepusieron con BME que contiene el 5% de FBS, 10 mM de HEPES y 0.5% de agarosa. Cuatro días después de la infección una segunda cubierta que contiene 5% de rojo neutro se aplicó, y las placas fueron contadas 24 horas más tarde.

[0042] Las seis familias de virus ARN ahora conocidas por tener proteínas de fusión de membrana Clase I (VIRUS Tipo I) y los miembros representativos de cada familia son como sigue:

Virus ARN Representativos que tienen Proteínas de Fusión de Membrana Clase I (virus Tipo I)

Familia	Virus Representante	Mostrado en las Figuras
Arenavirus	Virus Lassa	Si
	Virus Linfotico Choriomeningitico (LCMV)	No
	Virus Junnin	No
	Virus Machupo	No
	Virus Guanarito	No
	Virus Sabia	No

Handwritten signature and initials in the top right corner.

Coronavirus	Virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS)	Si
	Virus de Hepatitis Murino de (MHV)	No
	Coronavirus de Bovino	No
	Coronavirus de Canino	No
Filovirus	Virus del Ébola	Si
	Virus Marburg	No
Ortomixovirus	Virus de la Influenza A	Si
	Virus de la Influenza B	No
	Virus de la Influenza C	No
Paramixovirus	Virus del Sarampión	Si
	Virus de las Paperas	No
	Virus del Moquillo Canino	No
	Virus de la Enfermedad de Newcastle	No
		No
Retrovirus	Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (HIV-1)	Si
	Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2(HIV-2)	No
	Virus Linfotrópico de Célula T humana 1(HTLV-1)	No
	Virus Linfotrópico de Célula T humana (2HTLV-1)	No
	Partícula Tipo A Intracisternal Humana 1 (HIAP-1)	No
	Partícula Tipo A Intracisternal Humana 2 (HIAP-2)	No

87
88

Los virus mostrados en las Figuras son como sigue:

Virus ARN Ilustrados que tienen Proteínas de Fusión de Membrana Clase I (Virus Tipo I)

Figura	Familia	Virus Mostrado	Proteína mostrada
Figura 2	Arenavirus	Lassa Virus	GP2
Figura 3	Coronavirus	Virus SARS	S
Figura 4	Filovirus	Virus de Ebola	GP2
Figura 5	Ortomixovirus	Virus de la Influenza A	HA2
Figura 6	Paramixovirus	Virus del Sarampión	F1
Figura 7	Retrovirus	HIV-1	TM

Lista de secuencia de las proteínas de fusión de Membrana Clase 1 Ilustrados (Virus Tipo 1)

LASSA GP2 (Número de Acceso al Genbank: A43492, aminoácidos 257-490)

LLGT FTWTLSDSEG NETPGGYCLT RWMLIEAELK CFGNTAVAKC
NEKHDEEFCD MLRLFDNFNKQ AIRRLKTEAQ MSIQLINKAV NALINDQLIM
KNHLRDIMGI PYCNYSRYWY LNHTSTGKTS LPRCWLISNG SYLNETKFSD
DIEQQADNMI TEMPLQKEYID RQGKTPLGLV DLFVFSTSFY LISIFLHLVK
IPTRHIVGK PCPKPHRLNH MGICSCGLYK QPGVPVRWKR (SEQ ID NO:16)

SARS S (Número Acceso Genbank: AAQ9406, aminoácidos 864-1256)

88
89

WTF GAGAALQIPF AMQMAYRFNG IGVTONVLYE NQKQIANQFN
KAISQIQESL TTTSTALGKL QDVVNQNAQA LNTLVKQLSS NFGAISSVLN
DILSRLDKVE AEVQIDRLIT GRLQSLQTYV TQQLIRAAEI RASANLAATK
MSECVLGQSK RVDPCGKGYH LMSFPQAAPH GVVFLHVTYV PSQERNFTTA
PAICHEGKAY FPREGVVFVN GTSWFITQRN FFSPQIITD NTFVSGNCDV
VIGIINNTVY DPLQPELDSF KEELDKYFKN HTSPDVDLGD ISGINASVVN
IQKEIDRLNE VAKNLNESLI DLQELGKYEQ YIKWPWYVWL GFIAGLIAIV
MVTILLCCMT SCCSCLKGAC SCGSCCKFDE DDSEFVLKGV KLHYT (SEQ ID NO:17)

EBOLA GP2 (número de acceso al Genbank: AAM76034, aminoácidos 502-676)

EAIVNAQPK CNPNLHYWIT QDEGAAIGLA WIPYFGPAAE GIYTEGLMHN
QDGLICGLRQ LANETTQALQ LFLRATTEL R TFSILNRKAI DFLLRWGGT
CHILGPDCCI EPHDWTKNIT DKIDQIIHDF VDKTLPDQGD NDNWWTGWRQ
WIPAGIGVTG VIIAVIALFC ICKFVF (SEQ ID NO:18)

INFLUENZA HA2 (Número Acceso Genbank: PO3437, aminoácidos 346-566)

GLFGA IAGFIENGWE GMIDGWYGR HONSEGTGQA ADLKSTQAAI
DQINGKLN RV IEKTNEKFHQ IEKEFSEVEG RIQDLEKYVE DTKIDLWSYN
AELLVALENQ HTIDLTDSEM NKLFEKTRRQ LRENAEEMGN GCFKIYHKCD
NACIESIRNG TYDHDVYRDE ALNNRFQIKG VELKSGYKDW RCNICI (SEQ ID
NO:19)

SARAMPIÓN F1 (Número Acceso Genbank: VGNZMV, aminoácidos 116-553)

FAGVV LAGAALGVAT AAQITAGIAL HQSMLNSQAI DNLRASLETT
NQAIEAIRQA GOEMILAVQG VQDYINNELI PSMNQLSCDL IGQKLGLKLL
RYYTEILSLF GPSLRDPISA EISIQALSVA LGGDINKVLE KLGYSGGDLL
GILESIRGIKA RITHVDTESY FIVLSIAYPT LSEIKGVIVH RLEGVSYNIG
SQEWYTTVPK YVATQGYLIS NFDESSCTFM PEGTVCSQNA LYFMSPLLQE
CLRGSTKSCA RTLVSQSFGN RFILSQGNLI ANCASILCKC YTTGTIINQD
PDKILTYIAA DHCPVVEVNG VTIQVGSRRY PDAVYLHRID LGPPISLERL
DVGTNLGNAI AKLEDKELL ESSDQILRSM KGLSSTSIYV ILIAVCLGGL
IGIPALICCC RGRCNKKGEQ VGMSRPGLKP DLTGTSKSYV RSL (SEQ ID NO:20)

HIV TM (Número Acceso Genbank: AAB50262, aminoácidos 864-1256)

89
90

AVGIGALFL GFLGAAGSTM GAASMTLTVQ ARQLLSGIVQ QQNNLLRAIE
AQOHLQLTV WGIKQLQARI LAVERYLKDQ QLLGIWGCSG KLICTTAVPW
NASWSNKSLE QIWNHTTWME WDREINNYTS LIHSLIEESQ NQQEKNEQEL
LELDKWLASLW NWFNITNWLW YIKLFIMIVG GLVGLRIVFA VLSIVNRVRQ (SEQ ID
NO:21)

Método para Identificar el FIR

[0043] Ciertas modalidades de la invención comprenden un método para identificar dentro de las proteínas de fusión de los virus un motivo conservado. El motivo conservado de las regiones FIR provenientes de diferentes virus tendrá similar estructura y función. Adicionalmente, en regiones FIR de los virus relacionados pueden, pero no necesariamente tendrán respuestas de aminoácido primaria altamente similares. La presente invención suministra medios para identificar estas regiones, con o sin confiar en su identidad/similitud con las secuencias conocidas.

[0044] Otras modalidades de la presente invención suministran métodos útiles para prevenir o inhibir la infección viral y/o la fusión de virus:célula que utiliza péptidos, semejantes, anticuerpos u otros factores que son blanco del FIR del virus específico e interfiere con la función ión del FIR.

[0045] El FIR tiene típicamente entre 50 y 100 aminoácidos de longitud, aunque puede ser mayor en algunos virus. Varios aspectos de las modalidades habituales suministran métodos para identificar el FIR de una proteína de fusión viral en donde los métodos comprenden las siguientes etapas:

(1) la secuencia de la proteína de fusión se ajusta primero al andamiaje de la proteína de fusión de transmembrana HIV, que comprende las hélices N, la

90.
a1

hélice C, y otros dominios previamente descritos, con el fin de identificar las hélices N y la hélice C en la proteína de fusión objeto. Este proceso de ajuste se facilita al buscar la secuencia de aminoácido primaria de la proteína para dos o más cisteínas que tiene la propensión a formar al menos un aro covalentemente unido, que estará presente en la mayoría pero no en todas estas secuencias. La hélice N puede ser entonces identificada en la región que precede a este aro de cisteína al examinar la región para aminoácidos cargados y otros aminoácidos que tienen la propensión de formar una hélice alfa (por ejemplo glutamina (Q), alanina (A), triptófano (W), lisina (K) y leucina (L)).

(2) El terminal amino del FIR se identifica entonces sobre la hélice N. El terminal descansará usualmente dentro de los 10 a 20 aminoácidos finales de la hélice N y tendrá un núcleo que comprende típicamente 3 o 4 aminoácidos hidrófobos (tales como leucina (L) o alanina (A)), un aminoácido positivamente cargado (tal como lisina (K) o arginina (R), o un aminoácido cargado negativamente (tal como glutamato (E), y un aminoácido aromático, (tal como tirosina (Y)).

(3) El carboxi terminal del FIR es entonces identificado. En el caso de todas las familias excepto los coronavirus y paramixovirus, el terminal es el carboxiterminal de la primer secuencia de péptido con hidrofobicidad interfacial positiva que se encuentra más allá de la hélice N. Este terminal está usualmente localizado más allá del aro de cisteína, si el aro está presente, y algunas veces traslapa la hélice C o está ubicada sobre la hélice C. Las secuencias de hidrofobicidad interfacial positiva tienen un alto porcentaje de aminoácidos aromáticos (tal como triptófano (W), fenilalanina (F), y tirosina (Y) y aminoácidos hidrófobos pequeños (tal como glicina (G)). El grado de hidrofobicidad interfacial

91
92

de esta secuencia se puede determinar al utilizar la escala de hidrofobicidad interfacial Wimley-White, preferiblemente con un programa de computador actual como el programa MPEX que incorpora esta escala. ("Hidrofobicidad Interfacial" es una medida de la capacidad del péptido a transferirse desde la solución acuosa a la interfase bicapa de la membrana y está basado en la escala de hidrofobicidad de residuo completo Wimley-White experimentalmente determinada (Jaysinhe, Hristova, y White, 2000). El programa de computadora que utiliza esta escala puede identificar una secuencia de péptido de una cadena de péptido que tiene calificaciones o niveles de hidrofobicidad interfacial positiva y están por lo tanto más probablemente asociados con la superficie de las membranas). Ver Ejemplo 1, como un ejemplo de la solicitud de este método a la identificación del FIR en el virus del Ébola.

[0046] En el caso de los coronavirus, que tienen mayores hélices alfa y generalmente mayores escalas, los paramixovirus, en los cuales el FIR es discontinuo en razón de un inserto de secuencia no FIR, el terminal carboxi del IFR es el terminal carboxi de la segunda secuencia de péptido 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 mayor que las secuencias interhélices de otros virus con las proteínas de fusión viral Clase 1. La proteína F2 de los paramixovirus que sirve una función de unión de receptor, es correspondiente más corta. Luego de dispersión de los modelos de computadora, es obvio para aquellos expertos en la técnica que la proteína F1 contiene un inserto de secuencia entre la hélice N y la hélice C. consecuentemente, el FIR de los paramixovirus contiene dos aros de cisteína y dos secuencias de hidrofobicidad interfacial alta y es discontinua en razón a que los aminoácidos adicionales que son característicos solamente de los paramixovirus y aparecen

92
a3

cerca de la hélice N y la primer secuencia de hidrofobicidad interfacial alta están excluidos del FIR.

SECUENCIAS FIR

[0047] La secuencia de la proteína de fusión del FIR para cada uno de los seis virus representados mostrados en la figura 2 a la figura 7 es dada en la figura respectiva y en la lista de secuencia suministrada adelante (SEQ ID NO:16 a SEQ ID NO: 21 suministran las proteínas de fusión respectivas; y la SEQ ID NO:1 a la SEQ ID NO:7 suministran la FIR respectiva). Aunque existe alguna variación de secuencia menor entre los virus hermanos de dentro de cada una de estas seis familias, el FIR en cualquier virus Tipo 1 puede ser fácilmente identificado utilizando la secuencia representativa dada en la figura apropiada.

Métodos para Inhibir La Fusión en estos Virus

[0048] Otras modalidades de la presente invención suministra métodos para inhibir la fusión de virus:célula para interferir con la función del IFR. Varios aspectos de estas modalidades incluyen tener como blanco el FIR con péptidos, péptido semejante y otros factores que pueden o pueden no ser análogos al FIR, con el fin de interferir con la fusión virus:célula. En los varios aspectos de esta modalidad de la presente invención los péptidos, péptidos semejantes, y análogos de péptido tienen entre aproximadamente 6 y 150 residuos de aminoácido de largo. Más preferiblemente, ellos tienen desde 8 a 50 residuos de largo, aún más preferiblemente ellos tienen desde aproximadamente 8 a 40 aminoácidos de largo o de la longitud tal que sea necesaria para suministrar la inhibición efectiva de la infección viral. Como se utiliza aquí el término "de longitud tal que sea necesaria

93
94

para suministrar la inhibición efectiva del virus, preferiblemente se refiere a longitud suficiente para suministrar una reducción de 5 veces o más la inefectividad viral, cuando se utiliza de acuerdo con la presente invención. Los métodos para cuantificar la reducción de la inefectividad viral son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las reducciones de la actividad viral se pueden determinar mediante reducción de placa, inhibición de unión, ensayos de reducción de título, o mediante estudios de infección en animales.

[0049] Los péptidos FIR, los péptidos de secuencia de análogos, o fragmentos o derivados de estos, contemplados como parte de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, aquellos que comprenden como secuencia de aminoácidos primarias, todas o una parte eficaz de uno o más de los siguientes:

LASSA

X-LIMKNHLRDMGIPYCNYSRYWYLNHTSTGKTLPRCWL-Z (SEQ ID NO:1)

SARS

X-LIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPH

GVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFS-Z

(SEQ ID NO: 2)

ÉBOLA

X-LRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCI-Z (SEQ ID NO:3)

INFLUENZA

X-IQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTSEMKNKLF-Z (SEQ ID NO:4)

9/4
as**SARAMPIÓN****X-LGLKLLRYYTEILSLFG-Z (SEQ ID NO:5)****—****X-WYTTVPKYVATQGYLISNFDESSCTFMPEGTVCSQNALYPMSPLLQE****CLRGSTKSCCARTLVSGSFGNRFILSQGNLIANCASILCKCYTTGII-Z (SEQ ID NO:6)****(El "—" indica que el FIR del sarampión es discontinuo)****HIV****X-LQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLE****QIVNHTTWMEWD-Z (SEQ ID NO:7)**

En cada una de las secuencias anteriores el "X" y el "Z" designa respectivamente un terminal amino o carboxi-terminal, respectivamente, del péptido o una porción adicional, como se describe adelante.

[0050] Otros péptidos suministrados por la presente invención incluyen aquellos que tienen la secuencia de una región FIR. En un aspecto preferido de esta modalidad la región FIR va desde un virus que pertenece a una de las familias virales seleccionadas del grupo que consiste de arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus. En un aspecto más preferido de esta modalidad, el FIR va desde un virus seleccionado del grupo que consiste de Virus de Lassa, Virus linfocítico Coriomeningítico (LCMV), Virus Junin, Virus Machupo, Virus Guanarito, Virus Sabia, Virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), Virus de la Hepatitis de Murino (MHV), Coronavirus de Bovino,

98
96

Coronavirus de Canino, Virus de Peritonitis Infecciosa en Felino, VIRUS DEL Ébola, Virus Marbug, Virus de la Influenza A, Virus de la Influenza B, Virus de la Influenza C, Virus del Sarampión, Virus de las Paperas, Virus del Moquillo Canino, Virus de la Enfermedad de Newcastle. Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (HIV-1), Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2 (HIV-2), Virus Linfotrópico de Célula T Humano 1 (HTLV-1), Virus Linfotrópico de Células T Humano 2 (HTLV-2), Partícula Tipo A Intracisternal Humana 1 (HIAP-1), y Partícula Tipo A Intracisternal Humana 2 (HIAP-2).

[0051] Otros aspectos de esta modalidad de la invención suministran secuencias que comprenden un fragmento funcional de una secuencia FIR o análogos de secuencia a éstos, particularmente de un virus que pertenece a una de las familias virales seleccionadas del grupo que consiste de arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus. (Con la excepción del péptido HIV-1 TM CS3 previamente descrito por los presentes inventores (Garry) y descritos en la Figura 7). En otro aspecto preferido de esta modalidad, el péptido comprende un fragmento funcional (excepto el fragmento HIV-1 TM CS3) o unos análogos de secuencia a un fragmento funcional de un virus seleccionado del grupo que consiste del Virus de Lassa, Virus linfocítico Coriomeningítico (LCMV), Virus Junin, Virus Machupo, Virus Guanarito, Virus Sabia, Virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), Virus de la Hepatitis de Murino (MHV), Coronavirus de Bovino, Coronavirus de Canino, Virus de Peritonitis Infecciosa en Felino, Virus de Ébola, Virus Marbug, Virus de la Influenza A, Virus de la Influenza B, Virus de la Influenza C, Virus del Sarampión, Virus de las Paperas, Virus del Moquillo Canino, Virus de la Enfermedad de Newcastle. Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (HIV-1), Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2 (HIV-2), Virus Linfotrópico de Célula T Humano 1 (HTLV-1), Virus Linfotrópico de

96
97

Células T Humano 2 (HTLV-2), Partícula Tipo A Intracisternal Humana 1 (HIAP-1), Y Partícula Tipo A Intracisternal Humana 2 (HIAP-2).

[0052] Como se anotó anteriormente la presente invención también contempla derivados de los péptidos FIR descritos anteriormente y secuencias análogas a estas. Estos péptidos derivados pueden comprender secuencias alteradas en las cuales son sustituidos residuos aminoácidos funcionalmente equivalentes por residuos dentro de la secuencia que resultan en un cambio silencioso. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácido dentro de la secuencia se pueden sustituir por otro aminoácido de una polaridad similar que actúa como un equivalente funcional, que resulta en una alteración silenciosa (por ejemplo sustitución de metionina por isoleucina). Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia se pueden seleccionar de otros miembros de la clase a los cuales pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobo) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosona, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básico) incluyen arginina, lisina, y histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácido) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Por vía de ejemplo adicional, y no por vía de limitación, tales péptidos también pueden comprender los aminoácidos D, y /o ellos pueden comprender una proteína portadora ineficiente, o una proteína no portadora de ninguna forma.

[0053] Los péptidos FIR pueden comprender péptidos en las cuales "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 o un grupo hidrófobo o un grupo portador macromolecular. Varios aspectos de la

97
98

presente invención son dibujados a los péptidos en donde la porción "X" también se puede seleccionar del grupo que comprende: una porción hidrófoba, una porción carbobenzoxilo, una porción dansilo, o una porción-butiloxicarbonilo. En cualquiera de los péptidos de la presente invención la porción "Z" se puede seleccionar del grupo que comprende: una porción hidrófoba, una porción t-butiloxicarbonilo.

[0054] En otros aspectos de esta modalidad de la invención la porción "X" puede comprender un grupo portador macromolecular. Tales grupos portadores macromoleculares se pueden seleccionar del grupo que comprende, pero no está limitado a: un conjugado de lípido, una porción de polietilenglicol, o una porción de carbohidrato. De manera similar, el "Z" también puede comprender un grupo portador macromolecular, en donde dicho portador macromolecular se selecciona del grupo que comprende, pero no está limitado a: un conjugado de lípido, una porción de polietilenglicol, o una porción de carbohidrato.

[0055] Varias modalidades de este aspecto de la invención también contemplan péptidos en donde uno o más de las uniones moleculares que enlazan residuos de aminoácidos adyacentes es una unión no péptido. Tales uniones no péptidas incluyen, pero no están limitadas a: uniones imido, éster, hidracina, semicarbozoide y azo.

[0056] Aún otros aspectos de la presente invención suministran péptidos en donde el péptido comprende uno o más residuos de aminoácido que es/están en el aminoácido D-isómero.

98
29

[0057] Otros aspectos de la presente invención suministran péptidos que comprenden uno o más sustituciones de aminoácido en donde el primer residuo de aminoácido es sustituido por un segundo, diferente residuo de aminoácido, en la secuencia suministrada anteriormente (o un fragmento funcional de esta). En varios aspectos de esta modalidad, la sustitución de aminoácido es una sustitución conservadora. En otros aspectos de esta invención la sustitución de aminoácido es una sustitución no conservadora. Aún otros aspectos de esta modalidad de la invención suministra péptidos como se describió anteriormente excepto que uno o más residuos de aminoácido han sido suprimidos.

[0058] En varios aspectos preferidos de las presentes modalidades los péptidos FIR comprenden al menos tres residuos contiguos de un FIR. Más preferiblemente el péptido FIR comprende al menos 8 residuos contiguos de un FIR. Como se utiliza aquí el término "péptido o péptidos inhibidores FIR" se refiere preferiblemente a un péptido o péptidos que tienen la secuencia de un FIR (a un segmento funcional de éste) y a tales péptidos FIR o segmentos funcionales en los cuales uno o más aminoácidos es/están sustituidos por aminoácidos funcionalmente equivalentes o químicamente similares (ver infra). También se refiere a derivados de estos péptidos, que incluyen pero no están limitados a, derivados benzilados, derivados glicosilados, y péptidos que incluyen enantiómeros de aminoácidos de ocurrencia natural. En un aspecto preferido de esta modalidad el péptido se selecciona de aquellos que tienen la secuencia de cualquiera de la SEQ ID NOs 1-7, 8-15, 22-25, y 30. En aspectos particularmente preferidos de esta modalidad el péptido tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NOs 22-25 y 30.

99
100

[0059] En aún otros aspectos de esta modalidad de la invención, en los péptidos FIR se pueden enlazar a una molécula portadora tal como una proteína, que incluye pero no está limitado a, sero albúmina humana (HSA).

[0060] Adicionalmente, la presente invención contempla moléculas que comprenden cualquier combinación de las porciones X y Z y/o u otras modificaciones de péptido descritas anteriormente.

[0061] Los péptidos de acuerdo con la presente invención se pueden producir de proteínas virales de ocurrencia natural o recombinantes. Ellas también se pueden producir utilizando técnicas de ADN recombinante estándar (por ejemplo la expresión del péptido por un microorganismo que contiene una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica el péptido deseado, expresado bajo el control de un promotor transcripcional adecuado, y la cosecha del péptido deseado de dicho micro organismo). En un aspecto preferido de la invención, cualquiera de los péptidos de la invención se puede preparar utilizando cualquier metodología de síntesis química conocida en la técnica que incluye, pero no está limitada a, síntesis de fase sólida Merrifield (Clark-Lewis *et al.*, 1986, Science 231:134-139).

[0062] Las modalidades de la presente invención también suministra otros compuestos útiles para tratar o prevenir la infección de una célula por un virus. Estos incluyen anticuerpos (o segmentos activos de estos, significando porciones de los anticuerpos capaces de reconocer específicamente una región FIR o un segmento funcional de éste) y otras moléculas. Ciertos aspectos de esta modalidad de la invención suministran anticuerpos que reconocen específicamente un FIR, o un fragmento antigénico de éste y/o son capaces de

~~100.~~
101

interferir con la interacción virus:célula suficiente para evitar o reducir la infección de la célula por el virus. Los anticuerpos de acuerdo con estas modalidades de la invención pueden ser monoclonales o policlonales.

[0063] Varias modalidades de la invención suministran métodos para producir anticuerpos capaces de reconocer específicamente un FIR y/o prevenir o reducir la infección de la célula por el virus. Los métodos generales para producir anticuerpos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los métodos para producir anticuerpos de acuerdo con la presente invención comprenden las etapas de (i) suministrar un antígeno que comprende un FIR o un fragmento antígeno de estos (tales antígenos pueden ser un péptido no modificado, un péptido semejante, un análogo dipéptido, o un derivado de péptido); (ii) exponer el sistema inmune de un animal al antígeno con el fin de inducir una respuesta inmune; (iii) recolectar los anticuerpos del animal e identificar los anticuerpos o reconocer específicamente un FIR (o un segmento funcional de este) y/o ser capaz de inhibir o reducir la infección virus:célula de una manera que responda a dosis en ensayos que miden la infectibilidad viral.

[0064] Otra modalidad de la presente invención suministra métodos para identificar compuestos capaces de prevenir o inhibir la infección por un virus que comprende un FIR o que son útiles como drogas que conducen al desarrollo de drogas para prevenir o inhibir la infección viral. Tales métodos comprenden las etapas de: (i) identificar un virus que tiene al menos una proteína de fusión de membrana que comprende una región de iniciación de fusión que es requisito para la fusión virus:célula; (ii) preparar un blanco, en donde el blanco comprende una secuencia de aminoácido de un FIR o un segmento funcional de FIR; (iii) seleccionar una pluralidad de compuestos para identificar al menos un compuesto

101
02

que se une al blanco, identificando de esta manera un compuesto que se une al blanco; (iv) seleccionar al menos un compuesto que se une al blanco para identificar el compuesto que se une al blanco que es capaz de prevenir específicamente o reducir la infección viral por el virus del cual fue obtenido el blanco o que es útil como un virus. Como se utiliza aquí la frase "prevenir o reducir específicamente las infecciones virales" significa que el compuesto previene específicamente la infección por el virus blanco, sin ningún efecto sustancial o un virus no relacionado. Por ejemplo, si un compuesto que específicamente previene la infección por el virus SARS no prevendría la infección por el virus HIV-1.

[0065] Como se utilizan aquí los compuestos (por ejemplo drogas o derivados de drogas) identificados por los métodos descritos anteriormente pueden ser de cualquier tipo, por vía de una lista no exclusiva ellos pueden ser cualquier péptido (o derivado, análogo, o semejante de este) este incluye péptidos cortos como son típicamente empleados en librerías de despliegue de fago, cualquier anticuerpo o fragmento activo de este (es decir cualquier fragmento, tal como un F_{ab} que es capaz de reconocer específicamente el blanco) o cualquier otra molécula orgánica o inorgánica.

[0066] En cualquier modalidad de la presente invención el FIR puede ser desde cualquier virus que tenga una proteína en fusión de membrana que comprenda al menos dos hélices alfa extendidas, un péptido de fusión, y una región de iniciación de fusión. Preferiblemente, el virus se selecciona de una familia de virus, en donde la familia de virus se selecciona del grupo que consiste de: arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus. Más preferiblemente, el virus se selecciona del grupo que consiste de: Virus Lassa, virus SARS (síndrome respiratorio agudo severo) virus de Ébola, virus de la

~~102~~
103

influenza, virus del sarampión, y HIV-1 (virus de la inmunodeficiencia Humana Tipo 1).

[0067] De acuerdo con varios aspectos de la presente invención, los péptidos y/o los factores de la presente invención útiles para tratar o prevenir la infección viral de una célula pueden apuntar al blanco de los aminoácidos que circundan y están dentro del aro de cisteína FIR, la porción distante de la hélice N FIR, cualquiera de las regiones de hidrofobicidad interfacial de FIR, otras áreas del IFR o cualquier combinación de estos. Estos factores, anticuerpos, péptidos y análogos de péptidos (colectivamente compuestos) puede ser utilizado individualmente, alternativamente ellos se pueden utilizar en combinaciones de dos o más para evitar o inhibir la infección de la célula por el virus. Los métodos para prevenir o inhibir la infección viral de la célula al interferir con la función de FIR suministrada por la presente invención también incluye el uso de anticuerpos neutralizantes, producidos exógenamente o endógenamente, contra todas las porciones de del FIR. El propósito de tal uso es interferir con la función del FIR, inhibiendo de esta manera la infección viral de la célula y/o la fusión de la membrana virus:célula.

[0068] Otras modalidades de la presente invención suministran composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden cualquiera y todos los compuestos, péptidos (que incluyen análogos, derivados, y semejantes de estos), anticuerpos, o cualquier otra moléculas de la presente invención identificada por métodos de la presente invención o identificada por métodos de la presente invención. Estos incluyen, pero no están limitados a composiciones que contienen cualquier molécula que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un FIR, o un segmento funcional de un FIR. Este

~~103~~
104

incluye adicionalmente, pero no está limitado a composiciones que comprenden cualquier compuesto que reconoce específicamente, se une a, o interfiere con la función del FIR viral. De un FIR viral. Como se utiliza aquí, la frase "que interfiere con la función del FIR" significa que un compuesto interactúa con el FIR o con la proteína celular que sirve como receptora que reconoce el FIR con el fin de prevenir o reducir la infección de la célula por el virus. Adicionalmente, se contempla que las composiciones pueden comprender una de las moléculas descritas o mezclas de dos o más de las moléculas.

[0069] Modalidades adicionales de la presente invención suministran métodos para tratar o prevenir infecciones de una célula por un virus (donde el virus comprende un FIR) que utiliza cualquiera de los compuestos de la presente invención y/o cualquier compuesto identificado por cualquiera de los métodos de la presente invención. Varios aspectos de esta modalidad de la invención suministran una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas aquí a un paciente que se sospecha está expuesto a un virus (o que tiene potencial de estar expuesto a un virus) en donde el virus comprende un FIR. En varios aspectos de la invención la composición farmacéutica comprende un anticuerpo que reconoce específicamente y se une a un FIR (o a un segmento funcional de FIR) o a un fragmento de tal anticuerpo que reconoce específicamente y se une a un FIR, o un segmento funcional de un FIR.

[0070] Aún otros aspectos de esta modalidad de la invención suministran los métodos que comprenden administrar a un paciente una cantidad efectiva de una composición que comprende al menos una molécula de ADN o ARN recombinante, donde el ARN o el ADN codifica un FIR (o segmento funcional de este) o una molécula capaz de unirse específicamente a un FIR o un receptor

104
105

celular que reconoce un FIR con el fin de prevenir o reducir la infección por el virus. En un aspecto preferido de esta modalidad la molécula de ARN o ADN recombinante y la composición farmacéutica comprende además los elementos necesarios para permitirle a la proteína codificada por la molécula de ARN o ADN ser expresada en una célula humana. Por vía de ejemplo no exclusivo, en ciertos aspectos de esta modalidad de la invención la molécula de ARN o ADN recombinante es parte del plan medio recombinante o un virus recombinante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación del FIR en el virus del Ebola

[0071] El método para identificar el FIR de proteínas de fusión viral Clase I se puede ilustrar por dos ejemplos. El primer ejemplo de identificación del FIR en la glicoproteína 2 de la proteína de fusión Clase 1 mínima (GP2) del virus del Ébola, un filovirus. Los límites de la hélice N y la hélice C del virus del Ebola GP2 se han determinado mediante métodos cristalográficos de rayos x (Malashkevich et al., 1999). Los aminoácidos terminales de la hélice N contienen la secuencia ILNRKAIDF (SEQ ID NO:8) que se ajusta al consenso de un núcleo que comprende 3 o 4 aminoácidos hidrófobos, un aminoácido cargado Positivamente, un aminoácido cargado negativamente, un aminoácido aromático. Entre estas dos hélices están dos cisteínas en la secuencia CHILGPDC (SEQ ID NO:9). Definiendo los extremos del virus de FIR del virus del Ébola GP2 esta la secuencia FLLQRWGGTHCILGPDCCI (SEQ ID NO:10), que tiene una calificación de hidrofobicidad interfacial Wimley-White 2.59 determinada mediante el programa MPEX (Jaysinghe et al, 2002). Así, el FIR del virus del Ébola GP2 se extiende desde los aminoácidos 579 a 610.

~~105~~
106**EJEMPLO 2: Identificación del FIR en virus de sarampión**

[0072] El segundo ejemplo es una proteína de fusión Clase I compleja, la proteína F1 del virus del sarampión, un paramixovirus. Las hélices N y C del virus del sarampión F1 se pueden identificar al examinar la secuencia primaria de los aminoácidos con la propensión de formar hélices. El alineamiento de la secuencia primaria del virus del sarampión F1 con la secuencia de aminoácido primaria de la proteína F1 de otro paramixovirus, el virus de la enfermedad de Newcastle F1, también puede ayudar en la identificación de los límites de la hélice. La estructura de la proteína F1 del virus de la enfermedad de Newcastle se ha determinado por métodos cristalográficos de rayos x (Chen et al., 2001). Los límites de las hélices N- y C- pueden ser así predichos por los aminoácidos 131-217 y 455-491. Como contraste al virus del Ébola GP2 y la mayoría de las otras proteínas de fusión Clase I virales, la secuencia primaria entre las hélices N y C en el virus del sarampión es mayor de 100 amino ácidos. La región FIR del virus del sarampión F1 contiene una inserción la cual, luego de la inspección de los modelos en computadora, es obvia para aquellos expertos en la técnica, y así la estructura FIR se forma por una disposición secundaria que lleva juntas dos partes de la secuencia primaria. La secuencia insertada forma un aro externo al FIR. Los aminoácidos terminales de la hélice N contienen la secuencia LKLLRYYTE (SEQ ID NO: 11) que se ajusta al consenso de un núcleo que comprende 3 o 4 aminoácidos hidrófobos, un aminoácido cargado positivamente, un aminoácido cargado negativamente, y un aminoácido aromático. Existen 8 residuos de cisteína en el virus del sarampión F1 entre las hélices N- y C-. Sobre la base del alineamiento con el virus de la enfermedad de Newcastle F1 se puede determinar que las primeras dos cisteínas y las segundas dos cisteínas forman aros

106

107

enlazados con disulfuro. El primer par de cisteínas en la secuencia CTFMPEGTV (SEQ ID NO: 12) es parte del FIR por que este se une por una secuencia WYTTVPKYVATQGYLISNF (SEQ ID NO: 13) con la calificación de hidrofobicidad interfacial Wimley-White de 3.36, determinada mediante el programa MPEX. El segundo par de cisteínas en la secuencia, CLRGSTKSC (SEQ ID NO:14), también es parte del FIR por que este es adyacente a una secuencia TLVSGSFGNRFILSQQNLIANCASILCKCYTTGTII (SEQ ID NO: 15) con una hidrofobicidad interfacial Wimley-White de 2.54, determinada por el programa MPEX. Así, el FIR del virus del sarampión F1 se extiende desde los aminoácidos 205 a 407, representando los aminoácidos 221 a 314 una inserción que no participa en la función FIR.

Ejemplo 3: Identificación De los Péptidos Inhibidores de Fusión de Coronavirus

Antecedente.

[0073] El síndrome respiratorio agudo severo (SARS) es una enfermedad recientemente reconocida que se esparce desde el sudeste de la china al final del 2002 comienzos del 2003 a varios países de Asia, Europa, y Norteamérica (Guan et al., 2004). El SARS usualmente inicia con una fiebre mayor de 38°C. Los síntomas iniciales también pueden incluir dolor de cabeza, malestar y síntomas respiratorios medios. Entre los días y una semana, el paciente de SARS puede desarrollar una tos seca y tener una respiración dificultosa. Los pacientes en etapas más avanzadas de SARS desarrollan neumonía o síndrome de dolor respiratorio. En el foco inicial hubo 8098 casos en el mundo con una mortalidad total de 9.6%. Un coronavirus previamente no reconocido (CoV) ha sido

~~167~~
108

demostrado como el causante de la nueva enfermedad (Poutanen et al., 2003; Peiris et al., 2003; Drosten et al., 2003; Rota et al., 2003; Mara et al., 2003). Las intervenciones en salud Pública, tales como la supervisión, restricciones de los viajes y cuarentenas, contuvieron la expansión original del SARS CoV en el 2003 y de nuevo parece haberse detenido la expansión del SARS después de la aparición de nuevos pocos casos en el 2004. Es desconocido, sin embargo, si estas medidas de contención draconiana pueden ser sostenidas con cada aparición del SARS CoV en humanos. Adicionalmente, el potencial de este nuevo y algunas veces el letal CoV como amenaza de bioterrorismo es obvio.

[0074] Los coronavirus son virus ARN de hebra positiva largos típicamente con un rango de huésped amplio. Como otros virus con cubierta, el CoV entra a las células blanco mediante fusión entre las membranas viral y celular, un proceso mediado por la proteína de clavo viral (S). Las proteínas CoV S caracterizadas hasta la fecha, parecen consistir de dos sub unidades no covalentemente asociadas, S1 y S2. Utilizando análisis computacional, Garry y Gallaher (2003) primero propusieron que la porción de la proteína SARS-CoV S que corresponde a la sub unidad S2 se ajusta al moldeo prototípico de la proteína de fusión viral Clase 1 con base en la presencia de dos regiones de hélice alfa predichas en las regiones N- y C- terminales del S2 (hélice N, hélice C) y una región rica en aminoácido aromático justo antes del dominio del ancla de transmembrana.

Materiales y Métodos

[0075] Las células L2 o las células Vero E6 se mantuvieron en monocapas en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene 0.15% de HCO_3^- suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) penicilina G (100

~~108~~
109

U/mL), estreptomycin (100 mg/mL), y 2mM L-glutamina a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. La cepa de virus de la hepatitis de ratón (MHV) a59 o la sepa SARS CoV o HK se propagó a células L2. Para ensayos de placa, las células L2 o las células Vero E6 se sembraron a una densidad de 1x10⁶ células en cada pozo de una placa de 6 pozos. De cincuenta a 100 placas que forman unidades (p.f.u) del MHV o SARS CoV se preincubaron con o sin aproximadamente 100 µg/ml del péptido en DMEM libre de suero durante 1 h. Las células fueron entonces infectadas con inóculo tratado con péptido o inóculo de control de vehículo. Después de 1 h de adsorción, el inóculo se removió, las células fueron lavadas dos veces con 1X de solución salina amortiguada con fosfato, y las células fueron sobrepuestas con 10% de FBS¹/DMEM que contiene 0.5% de agarosa SEAPLAQUE® (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME). Las monocapas se fijaron con 3.7% de formalina y se tificaron con 1X bioleta cristal 2 días post infección, y los números de placa se determinaron mediante microscopia de luz-

Resultados y Discusión

[0076] Los péptidos científicos que corresponden a los dominios de la proteína MHV o SARS CoV S fueron ensayados por su capacidad para inhibir la infección de estos coronavirus. La capacidad para inhibir la formación de placas en monocapas de célula es el ensayo in vitro más estricto de una droga inhibidora de infección potencial. Dos péptidos (GNHILSLVQNAPYGLYFIHFSW, SEQ ID NO: 22 y GYFVQDDGEWKFTGSSYYY, SEQ ID NO: 23) provenientes del FIR del MHV pueden inhibir la formación de placa mediante MHV, aunque el primer péptido FIR del MHV es más eficiente, (ver figura .8A). Dos péptidos provenientes del FIR del SARS, CoV, (GYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTY, SEQ ID NO: 24 y

~~210~~
111

sintéticos que inhiban la fusión/infectividad de los miembros de la familia Coronaviridae

Ejemplo 4: Identificación De Péptidos Inhibidores De Fusión de Arenavirus.

Antecedentes

[0077] La fiebre de Lassa es una enfermedad hemorrágica a menudo fatal denominada por el pueblo del valle del Río Yedseram de Nigeria en el cual ocurrieron los primeros casos descritos en 1969 (Buckley and Casals, 1970). Partes de Guinea, Sierra Leona, Nigeria y Liberia son endémicas para el agente etiológico, el virus de Lassa, (LasV). El impacto sobre la salud pública del LasV en áreas endémicas es inmenso. Los centros para control de enfermedades, y prevención (CDC) han estimado que existen 100,000-300,000 casos de Lassa por año en África Occidental y 5,000 muertes. En algunas partes de Sierra Leona, 10-15% de los pacientes admitidos en los hospitales tenían fiebre de Lassa. La proporción de fatalidad de los casos para la fiebre de Lassa es típicamente del 15% al 20%, aunque la mortalidad total en epidemia puede ser tan alta como del 45%. La proporción de la mortalidad para mujeres en el último mes de embarazo es siempre alta, aproximadamente 90%, y la infección LasV origina altas proporciones de muerte fetal en todas las etapas de gestación. La proporción de mortalidad para Lassa parece ser mayor en no Africanos, que es la preocupación por que en Lassa es la fiebre hemorrágica más comúnmente exportada. En razón de la alta proporción de casos fatales y de la capacidad de esparcirse fácilmente en contacto humano-humano, el LasV es clasificado por nivel de Bioseguridad 4 y como agente categoría A de Biodefensa NIAID.

~~112~~
112

[0078] El LasV es un miembro de la familia *Arenaviridae*. El genoma de arenavirus consiste de dos segmentos de ARN ambisentido de hebra simple. Cuando se ve mediante microscopía electrónica de transmisión, los virus esféricos recubiertos (diámetro 110-130 nm) muestran partículas de grano que son ribosomas adquiridos de las células huésped (Murphy y Whitfield, 1975). De esta manera, el uso del nombre de la familia en el Latín "arena", que significa "arenoso". Además del LasV, otros arenavirus que originan enfermedad en humanos incluyen el virus Junin (fiebre hemorrágica Argentina), el virus Machupo (fiebre hemorrágica Boliviana), el virus Guanarito (fiebre hemorrágica Venezolana) y el virus Sabiá (fiebre hemorrágica Brasileña). Los arenavirus son zoonóticos; cada virus está asociado con especies específicas de roedores (Bowen, Peter, y Nichol, 1997). El reservorio del LasV es la "rata multimammata" del género *Mastomys* (Monath et al., 1974). La amplia distribución de *mastomys* en África hace la erradicación de este reservorio del roedor impráctica y ecológicamente indeseable.

[0079] Los signos y síntomas de la fiebre del Lassa, que ocurre 1-3 semanas después de la exposición al virus, son altamente variables, pero pueden incluir fiebre, dolor en la espalda o abdominal en la parte posterior del tórax, dolor de garganta, tos, vómito, diarrea, infección de la conjuntiva, e hinchamiento facial. El LasV infecta las células endoteliales, dando como resultado una permeabilidad capilar creciente, disminución del volumen de circulación efectivo, shock, y falla sistémica multiorgánica. El sangrado Frank, usualmente de la mucosa (gomas etc.) ocurre en menos de un tercio de los casos, pero le confiere una pobre prognosis. Los problemas neurológicos también han sido descritos, incluyendo pérdida de audición, temores, y encefalitis. Los pacientes que sobreviven inician la defervescencia 2-3 semanas después del ataque de la

~~112~~
113

enfermedad. La mayoría de las complicaciones comunes de la fiebre de Lassa es sordera. Sordera unilateral o bilateral temporal o permanente ocurre en ~30% de los pacientes con fiebre de Lassa durante la convalecencia, y no está asociada con la severidad de la enfermedad aguda. La droga antiviral ribavirina es efectiva en el tratamiento de fiebre de Lassa, pero solamente si se administra tempranamente, (hasta a los 6 días) en el curso de la enfermedad (Johnson, et al., 1987; McCormick et al., 1986) . Es desconocido si la ribavirina es efectiva contra otros arenavirus, tales como los virus de Junin, Machupo, Guanarito, o Sabiá. Ninguna vacuna contra LasV está actualmente disponible.

Materiales y Métodos

[0080] Las células Vero fueron mantenidas en monocapas en Medio Basal Eagle (BME) que contiene 10 mM HEPES y 5% de FBS. El virus de Lassa (sepa Josiah) se propagó sobre las células Vero. Para las placas de ensayo, las células Vero fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 células en cada pozo de placa a 6 pozos. Cincuenta de 100 p.f.u. del LasV fueron pre incubadas con o sin péptido en BME libre de suero durante 1 h. Las células fueron entonces infectadas por inóculo tratado con péptido o inóculo de control de vehículo. Después de 1 h de adsorción, el inóculo se removió, las células fueron lavadas 2 veces con 1X de solución salina amortiguada con fosfato, y las células fueron sobre puestas sobre 2 ml de agarosa al 0.5% en BME que contiene 10 mM de HEPES y 5% de FBS, e incubadas durante 4 días. Una segunda sobre posición que contiene 5% de rojo neutro se aplicó, y las placas fueron contadas 24 h después.

~~113~~
114

Resultados y Discusión

[0081] Los péptidos sintéticos que corresponden al dominio FIR de la glicoproteína de LasV 2 (GP2) fueron ensayados por su capacidad para inhibir la infección de este arenavirus. Un péptido (NYSKYWYLNHTTTGR), SEQ ID NO: 30 análogo a la secuencia NYSRYWYLNHTSTGK. SEQ ID NO: 1 (LASSA FIR) puede inhibir la formación de placa por el LasV (Figura 9). Un péptido análogo a la otra región GP2, el péptido de fusión, (GTFTWTLSDSEGKDTPGGY, SEQ ID NO:31) también inhibió la infección del LasV pero en una proporción menor (Fig 9). Ninguno de los péptidos inhibidores de arenavirus ha sido reportado. Colectivamente, este resultado sugiere que nuestras aproximaciones pueden identificar péptidos sintéticos que inhiben la fusión/infectibilidad de los miembros del Arenaviridae. Estos resultados, en combinación con nuestros resultados con péptidos inhibidores FIR de coronavirus, establecen la prueba del principio de que los péptidos de las regiones FIR pueden funcionar como inhibidores virales.

~~114~~
115

REFERENCIAS

[0082] Cada uno de los siguientes documentos se incorpora aquí como referencia.

Bolognesi *et al.* US Pat. No. 5,464, 933 0 "*Synthetic Peptide Inhibitors of HIV Transmission*"

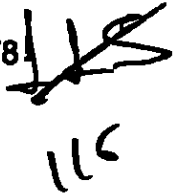
Bosch, B. J. B. E. Martina, Z. R. Van Der, J. Lepault, B. J. Haijema, C. Versluis, A. J. Heck, R. DeGroot, A. D. Osterhaus, and P. J. Rottier. 2004. "Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides" *PROC. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 101:8455-8460.

Bosch, B. J. , Z. R. van der, C. A. de Haan, and P. J. Rottier. 2003. "The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* 77:8801-8811:

Bowen M. D., Peters, C. J., and Nichol, S. T. (1997). "Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts." *Mol Phylogenet Evol* 8 (3), 301-16.

Buckley, S. M., and Casals, J. (1970). "Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus." *Am J Trop Med Hyg* 19 (4), 680-91.

Carr, C. M. and Kim, P. S. (1993). A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* 73 (4), 823-32.

Handwritten signature and initials, possibly 'JL' and '116'.

Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. , and Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89 (2), 263-73.

Chen, L., Gorman, J. J., McKimm-Breschkin, J. , Lawrence, L. J. , Tulloch, P. A. , Smith, B. J., Colman, P. M. , and Lawrence, M. C. (2001). The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm of the molecular mechanism of membrane fusion *Structure* 9 (3), 255-266.

Clark-Lewis I, Aebersold R, Ziltener H, Schrader JW, Hood LE, Kent SB. (1986). Automated chemical synthesis of a protein growth factor for hemopoietic cells, interleukin-3. *Science*. 231: 134-9.

Drosten, C. , Gunther, S. , Preiser, W. , van der Werf, S. , Brodt, H. R., S. , Rabenau, H., Panning, M. , Kolesnikova, L. , Fouchier, R. A. , Berger, A. , Burguiere, A. M., Cinatl, J. , Eickmann, M. , Escriu, N. , Grywna, K. , Kramme, S., J. C. , Muller, S., Rickerts, V., Stunner, M. , Vieth, S., Klenk, H. D. , Osterhaus, A. D. , Schmitz, H., and Doerr, H. W. (2003). "Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome." *New England J Med* 348, 1967-76.

Gallaher, W., Fermin, C., Henderson, L. , Montelaro, R. , Martin, A. , Qureshi, M. , Ball, J. , Luo- Zhang, H. , and Garry, R. (1992). Membrane interactions of HIV: Attachment, fusion and cytopathology. *Adv. Membrane Fluidity* 6, 113-142.

Gallaher, W. R. (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* (3), 327-8.

116
117

Gallaher, W. R. (1996). Similar structural models of the transmembrane glycoproteins of Ebola and avian sarcoma viruses. *Cell* 85, 1-2.

Gallaher, W. R., Ball, J. M., Garry, R. F., Griffin, M. C. , and Montelaro, R. C. (1989). A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 5 (4), 431-40.

Gallaher, W. R., DiSimone, C. , and Buchmeier, M. J. (2001). The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol* 1.(1), 1

Gallaher, W. R. and Garry, (2003). Model of the pre-insertion region of the spike (S2) fusion glycoprotein of the human SARS coronavirus: implications for antiviral therapeutics.

<[www. Virology.net/Articles/sars/2model.html](http://www.Virology.net/Articles/sars/2model.html)>May 1, 2003.

Gonzalez-Scarano, F., Waxham, M. N., Ross, A. M. , and Hoxie, J. A. (1987). Sequence similarities between human immunodeficiency virus gp41 and paramyxovirus fusion proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 3 (3), 245-52.

Guan, Y. , Peiris, J. S. , Zheng, B. , Poon, L. L. , Chan, K. H. , Zeng, F. Y. , Chan, C. W. , Chan, M. N., Chen, J. D. , Chow, K. Y. , Hon, C. C. , Hui, K. H. , Li, J. , Li, V. Y. , Wang, Y. , Leung, S. W., Yuen, K. Y. and Leung, F. C. (2004). Molecular epidemiology of the novel coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 363,99-104.

Guan, Y. , Zheng, B. J. , He, Y. Q. , Liu, X. L. , Zhuang, Z. X. , Cheung, C. L. , Luo, S. W. , Li, P. H., Zhang, L. J. , Guan, Y. J. , Butt, K. M. , Wong, K. L. , Chan, K. W. , Lim, W. , Shortridge, K. F., Yuen, K. Y. , Peiris, J. S. , and Poon, L.

L. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302,276-278.

Henderson, Coy and Garry, U. S. Pat. 567, 805 "the cellular Receptor for the CS35 Péptide of HIV"

Jaysinghe, S., Hristova, K., and White, S. H. (2000). Membrane Protein Explorer.

www.blanco.biomol.uci.edu/mpex.

Johnson, K. M. , McCormick, J. B. , Webb, P. A. , Smith, E. S. , Elliott, L. H. , and King, I. J. (1987). Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients. *J Infect Dis* 155 (3), 456-64.

Kilby, J. M. , Hopkins, S. , Venetta, T. M. , DiMassimo, B. , Cloud, G. A. , Lee, J. Y. , Alldredge, L. , Hunter, E. , Lambert, D. , Bolognesi, D. , Matthews, T. , Johnson, M. R. , Nowak, M. A., Shaw, G. M. , and Saag, M. S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat.Med* 4 (11), 1302-7.

Kowalski, M.,Potz, J. , Basiripour, L.,Dorfman, T. , Haseltine, W. , and Sodroski, J. (1991). Attenuation of HIV-1 cytopathic effect by mutation affecting the transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 65,281-291.

Ksiazek, T. G. , Erdman, D. , Goldsmith, C. S. , Zaki, S. R. , Peret, T. , Emery, S. , Tong, S. , Urbani, C. , Comer, J. A. , Lim, W. , Rollin, P. E. , Dowell, S. Ling, A. E. , Humphrey, C. D. , Shieh, W. J., Guamer, J. , Paddock, C. D. , Rota, P. , Fields, B. , DeRisi, J. , Yang, J. Y. , Cox, N., Hughes, J. M. , LeDuc, J. W. , Bellini, W. J. , and Anderson, L. J. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N engl Med* 348, 1953-66

118
119

- Lambert, D. M., Barney, S. , Lambert, A. L. , Guthrie, K. , Medinas, R. , Davis, D. E. , Bucy, T., J. , Merutka, G. , and Petteway, S. R. , Jr. (1996). Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (5),2186-91 .
- Liu, S.,G. Xiao, Y. Chen, Y. He, J. Niu, C. Escalante, H. Xiong, J. Farmer, A. K. Debnath, P. Tien, Jiang, S. 2004. Interactions between the heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implication for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet* 363: 938-947.
- Malashkevich, V. N. , Schneider, B. J. , McNally, M. L., Milholen, M. A. , Pang, J. X. , and Kim, P. S. (1999). Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (6), 2662-7.
- Marra, M. A. , Jones, S. J. , Astell, C. R. , Holt, R. A. , Brooks-Wilson, A. , Butterfield, Y. S., Khattri, J. , Asano, J. K. , Barber, S. A. , Chan, S. Y. , Cloutier, A. , Coughlin, S. M. , Freeman, D. , Gim, N. , Griffith, O L. , Leach, S. R. , Mayo, M. , McDonald, H. , Montgomery, S. B., Pandoh, P. K. , Petrescu, A. S. , Robertson, A. G. , Schein, J. E. , Siddiqui, A. , Smailus, D. E., Stott, J. M. , Yang, G. S. , Plummer, F., Andonov, A. , Artsob, H. , Bastien, N. , Bernard, K., Booth, T. F., Bowness, D. , Drebot, M., L. , Flick, R. , Garbutt, M. , Gray, M., Grolla, A. , Jones, S. , Feldmann, H. , Meyers, A. , Kabani, A. , Li, Y. , Normand, S. , Stroher, U., Tipples, G. A., Tyler, S. , Vogrig, R. , Ward, D. , Watson, B. , Brunham, R. C. , Kraiden, M., M. , Skowronski, D. M. , Upton, C. , and Roper, R. L. (2003). The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300,1399-1404.

P. 19
120

McCormick, J. B., King, J. , Webb, P. A. , Scribner, C. L. , Craven, R. B. , Johnson, K. M., Elliott, L. H. , and Belmont-Williams R. (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl J Med* 314 20-6..

Monath, T. P., Newhouse, V. F., Kemp, G. E. , Setzer, H. W. , and Cacciapuoti, A. (1974). Lassa virus isolation from *Mastomys natalensis* rodents during an epidemic in Sierra Leone. *Science* 185 (147), 263-5.

Murphy, F. A., and Whitfield, S. G. (1975). Morphology and morphogenesis of arenaviruses.

Bull World Health Organ 52 (4-6), 409-19.

Owens, R. J., Tanner, C. C. , Mulligan, M. J. , Srinivas, R. V. , and Compans, R. W. (1990). Oligopeptide inhibitors of HIV-induced syncytium formation. *AIDS Re Hum Retoviruses* 6 (11), 1289-96.

Peiris, J. S. , Lai, S. T. , Poon, L. L. , Guan, Y., Yam, L. Y. , Lim, W. , Nicholls, J. , Yee, W. K., Yan, W. W. , Cheung, M. T. , Cheng, V. C. , Chan, K. H. , Tsang, D. N. , Yung, R. W. , Ng, T. K. , and Yuen, K. Y. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361,1319-25.

Pozniak, A. fusion inhibitors. *J HIV Ther* 6(4) 91-4.

Poutanen, S. M. , Low, D. E. , Henry, B. , Finkelstein, S. , Rose, D. , Green, K. , Tellier, R., Draker, R. , Adachi, D. , Ayers, M. , Chan, A. K., Skowronski D. M. , Salit, Simor, A. E., Slutsky, A. S. , Doyle, P. W. Kraiden, M. , Petric, M. , Brunham, R. C. , and McGeer, A. J. (2003).

120
121

Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *New England J Med* 348, 1995-2005.

Qureshi, N. Coy, D. , Garry, R. , and LA, H. (1990). Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *AIDS* 4,553-558.

Richardson, C. D., Scheid, A. , and Choppin, P. W. (1980). Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the FI or HA2 viral polypeptides. *Virology* 105 205-22.

Rota, P. A. , Oberste, M. S. , Monroe, S. S. , Nix, W. A. , Campagnoli, R. , Icenogle, J. P., Penaranda, S. , Bankamp, B. , Maher, K. , Chen, M. H. , Tong, S., Tamin, A. , Lowe, L. , Frace, M. , DeRisi, J. L. , Chen, Q. , Wang, D. , Erdman, D. D. , Peret, T. C., Burns, C. , Ksiazek, T. G., Rollin, P. E. , Sanchez, A. , Liffick, S. , Holloway, B. , Limor, J. , McCaustland, K. , Olsen-Rasmussen, M. , Fouchier, R. , Gunther, S. , Osterhaus, A. D. , Drosten, C. , Pallansch, M. A., Anderson, L. J. , and Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Science*, 300,1394-1399.

Silburn K. A., McPhee, D. A. , Maerz, A. L. , Pountourios, P. , Whittaker, R. G. , Kirkpatrick, A., Reilly, W. G. , Manthey, M. K. , and Curtain, C. C. (1998). Efficacy of fusion peptide homologs in blocking cell lysis and fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 (5), 385-92.

Sodroski, J. G. (1999). entry inhibitors in the side pocket. *Cell* 99 (3), 243-6.

121
122

Suarez, T.,Gallaher, W. R. , Agirre, A. , Goni, F. M. , and Nieva, J. L. (2000).

Membrane interface-interacting sequences within the ectodomain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: putative role during viral fusion. *J Virol* 74 (17), 8038-47.

Watanabe, S.,Takada, A. , Watanabe, T. , Ito, H. , Kida, H. , and Kawaoka, Y.

(2000). Functional importance of the coiled-coil of the Ebola virus glycoprotein. *J Virol* 74 (21), 10194-201.

Weissenhorn, W., Carfi, A.,Lee, K. H. , Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1998).

Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell* 2 (5), 605-16.

Weissenhorn, W., Dessen, A. , Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C.

(1997). Atomic structure of the ectodomain from *Nature* 387 (6631), 426-30.

Wild, C.,Greenwell, T. , and Matthews, T. (1993). A synthetic peptide from is a

potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Research Retroviruses* 9 (11), 1051-3.

Wild, C.,Oas, T. , McDanal, C. , Bolognesi, D. , and Matthews, T. (1992). A

synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (21), 10537-41

Wilson, I. A Skehel, J. J.,and Wiley, D. C. (1981) Structure of the haemagglutinin

membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289 (5796), 366-73.

~~122~~
123

Young, J. K. Li, D., Abramowitz, M. C. , and Morrison, T. G. (1999). Interaction of peptides with sequences from the Newcastle disease virus fusion protein heptad repeat regions. *J Virol* 73 (7), 5945-56.

Yuan, K., L. Yi, J. Chen, X. Qu, T. Qing, X. Rao, P. Jiang, J. Hu, Z. Xiong, Y. Nie, et al. 2004.

Suppression of SARS-CoV entry by peptide corresponding to heptad regions on spike glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 746-752.

Zhu, J., G. Xiao, Y. Xu, F. Yuan, C. Zheng, Y. Liu, H. Yan, D. K. Cole, J. Bell, Z. Rao, 2004. Following the rule: formation of the 6-helix bundle of the fusion core from severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein and identification of potent peptide inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 283-288.

~~123~~
124**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar un compuesto capaz de prevenir o inhibir la infección viral de una célula huésped, el método comprende:
 - (a) preparar un blanco que comprende una secuencia de aminoácido de una región de iniciación de fusión viral (FIR), en donde el FIR es de un virus que tiene una proteína de fusión de membrana que comprende:
 - (i) al menos dos hélices alfa extendida, (ii) un péptido de fusión, y (iii) una región de iniciación de fusión;
 - (b) seleccionar una pluralidad de compuestos para identificar al menos un compuesto que se une al blanco, un compuesto que se une al blanco;
 - (c) seleccionar al menos un compuesto que se une a un blanco para identificar un compuesto que se une a un blanco capaz de prevenir o inhibir la infección viral de una célula huésped mediante un virus con una proteína de fusión que comprende el FIR.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende además identificar un virus que tiene una proteína de fusión de membrana que comprende: dos o más hélices alfa, un péptido de fusión, y una región de iniciación de fusión (FIR).
3. El método de la reivindicación 1 en donde el blanco es análogo de péptido, un derivado de péptido, o un péptido semejante.
4. El método de la reivindicación 1 en donde el compuesto es un anticuerpo o un fragmento funcional de este.

124
125

5. El método de la reivindicación 1 en donde el virus es de una familia de virus seleccionado del grupo que consiste de arenavirus, coronavirus, filovirus ortomixovirus, paramixovirus y retrovirus.
6. El método de la reivindicación 1 en donde el virus se selecciona del grupo que consiste de Virus de Lassa, Virus Linfocítico Coriomeningítico (LCMV), Virus Junin, Virus Machupo, Virus Guanarito, Virus Sabia, Virus del Síndrome respiratorio Agudo Severo (SARS), Virus de la hepatitis de Murino (MHV), coronavirus de Bovino, Coronavirus de Canino, Virus de Peritonitis Infecciosa de Felino, Virus del Ebola, Virus de Marburg, Virus de la Influenza A, Virus de la Influenza B, Virus de la Influenza C, Virus del Sarampión, Virus de las Paperas, Virus del Moquillo Canino, Virus de la Enfermedad de Newcastle, Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (HIV-1), Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2 (HIV-2), virus linfotrópico de célula T Humano 1 (HTLV-1), Virus Linfotrópico de Célula T Humana 2 (HTLV-2), partícula tipo A Intracisternal Humana 1 (HIAP-1), y partícula Tipo A Intracisternal Humana 2 (HIAP-2).
7. Un péptido aislado que comprende:
 - (a) Una secuencia de aminoácido o una secuencia análoga a este de una región de iniciación de fusión viral (FIR); o
 - (b) Un segmento funcional de un FIR o una secuencia análoga a este de un virus que pertenece a uno de los grupos de las familias de virus que consisten de arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus, en donde el segmento funcional no incluye HIV*1 TM CS3.

~~125~~
126

8. El péptido de la reivindicación 7 que comprende una secuencia de aminoácido a una secuencia análoga a este de una región de iniciación de fusión viral de un virus en una familia de virus seleccionada del grupo de las familias de virus que consisten de arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus.
9. El péptido de la reivindicación 7 en donde el FIR es de un virus seleccionado del grupo que consiste de Virus de Lassa, Virus Linfocítico Coriomeningítico (LCMV), Virus Junin, Virus Machupo, Virus Guanarito, Virus Sabia, Virus del Síndrome respiratorio Agudo Severo (SARS), Virus de la hepatitis de Murino (MHV), coronavirus de Bovino, Coronavirus de Canino, Virus de Peritonitis Infecciosa de Felino, Virus del Ebola, Virus de Marburg, Virus de la Influenza A. Virus de la Influenza B, Virus de la Influenza C, Virus del Sarampión, Virus de las Paperas, Virus del Moquillo Canino, Virus de la Enfermedad de Newcastle, Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (HIV-1), Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2 (HIV-2), virus linfotrópico de célula T Humano 1 (HTLV-1), Virus linfotrópico de Célula T Humana 2 (HTLV-2), partícula Tipo A Intracisternal Humana 1 (HIAP-1), y partícula Tipo A Intracisternal Humana 2 (HIAP-2). o el fragmento FIR funcional es de un virus seleccionado del grupo que consiste de virus de Lassa, Virus Linfocítico Coriomeningítico (LCMV), Virus Junin, Virus Machupo, Virus Guanarito, Virus Sabia, Virus del Síndrome respiratorio Agudo Severo (SARS), Virus de la hepatitis de Murino (MHV), coronavirus de Bovino, Coronavirus de Canino, Virus de la Peritonitis Infecciosa de Felino, Virus del Ebola, Virus de Marburg, Virus de la Influenza A. Virus de la

~~126~~
127

Influenza B, Virus de la Influenza C, Virus del Sarampión, Virus de las Paperas, Virus del Moquillo Canino, Virus de la Enfermedad de Newcastle, Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (HIV-1), Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2 (HIV-2), virus linfotrópico de célula T Humano 1 (HTLV-1), Virus linfotrópico de Célula T Humana 2 (HTLV-2), partícula Tipo A Intracisternal Humana 1 (HIAP-1), y partícula Tipo A Intracisternal Humana 2 (HIAP-2).

10. El péptido de la reivindicación 7 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NOs: 1-7, 8-15, 22-25 y 30.
11. El péptido de la reivindicación 7 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 22-25 Y 30.
12. El péptido de la reivindicación 7 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NOs: 1-7 o un segmento funcional de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7.
13. Un método para tratar o prevenir una infección viral que comprende administrar a un paciente un compuesto identificado por cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 6.
14. Un método para tratar o prevenir una infección viral que comprende administrar a un paciente un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12.

~~128~~
128

15. Un método para tratar o prevenir una infección viral que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de una composición que comprende una molécula de ADN recombinante que posibilita o estimula al paciente para producir el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12.
16. El método para tratar o prevenir una infección viral que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de anticuerpo que se une específicamente a una región de iniciación de fusión.
17. Un anticuerpo aislado identificado mediante el método de la reivindicación 1.
18. Un anticuerpo de acuerdo a la reivindicación 17 capaz de inhibir la fusión de membrana de un virus que tiene proteínas de fusión de membrana que comprende al menos dos hélices alfa extendidas y un péptido de fusión, en donde estas proteínas comprenden una región de iniciación de fusión (FIR) requisito para fusión de célula, en donde el anticuerpo se une a unas secuencias de aminoácidos dentro del FIR.
19. Una secuencia de ácido nucleico aislada capaz de codificar un polipéptido que tiene la secuencia de un FIR viral o una secuencia análoga a esta de un virus que pertenece a la familia de los virus seleccionados del grupo que consiste de arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus.
20. Un método para producir un anticuerpo que comprende:

~~128~~
129

- (a) suministrar un antígeno capaz de elicitar un anticuerpo que reconoce específicamente
 - (i) una región de iniciación de fusión viral (FIR), O
 - (ii) un fragmento de antígeno de un FIR proveniente de un virus que pertenece a uno de los grupos de las familias de virus que consisten de arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus, en donde el fragmento no incluye HIV-1 TM CS3;
 - (b) Introducir dicho antígeno en un animal con el fin de elicitar una respuesta inmune a esta.
 - (c) Recolectar anticuerpos de dicho animal
 - (d) Identificar aquellos anticuerpos que reconocen específicamente un FIR o un fragmento antigénico de este.
21. El método de la reivindicación 20 en donde el antígeno consiste de una secuencia de aminoácido o secuencia análoga a este de una región de iniciación de fusión viral (FIR) de un virus en una familia de virus seleccionado del grupo de las familias de virus consisten de arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomoxovirus, paramixovirus, y retrovirus.
22. El método de la reivindicación 20 en donde el antígeno comprende un análogo de péptido; un derivado de péptido; o un péptido semejante de una región de iniciación de fusión (o un fragmento antigénico de éste).
23. El método de la reivindicación 20 en donde el antígeno comprende un virus aislado o una proteína de fusión de cubierta de un virus aislado.

~~129~~
130

24. Un método para identificar una región de iniciación de fusión viral (FIR) en una secuencia de proteína de fusión viral, el método comprende;
- (a) ajustar la secuencia de proteína de fusión viral andamiaje de proteína de fusión de las membranas HIV
 - (b) identificar el terminal amino del FIR; y
 - (c) identificar el terminal carboxi del FIR.
25. El método de la reivindicación 24 en donde el FIR viral de un virus que pertenece a la familia de virus seleccionada del grupo que consiste de arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus.

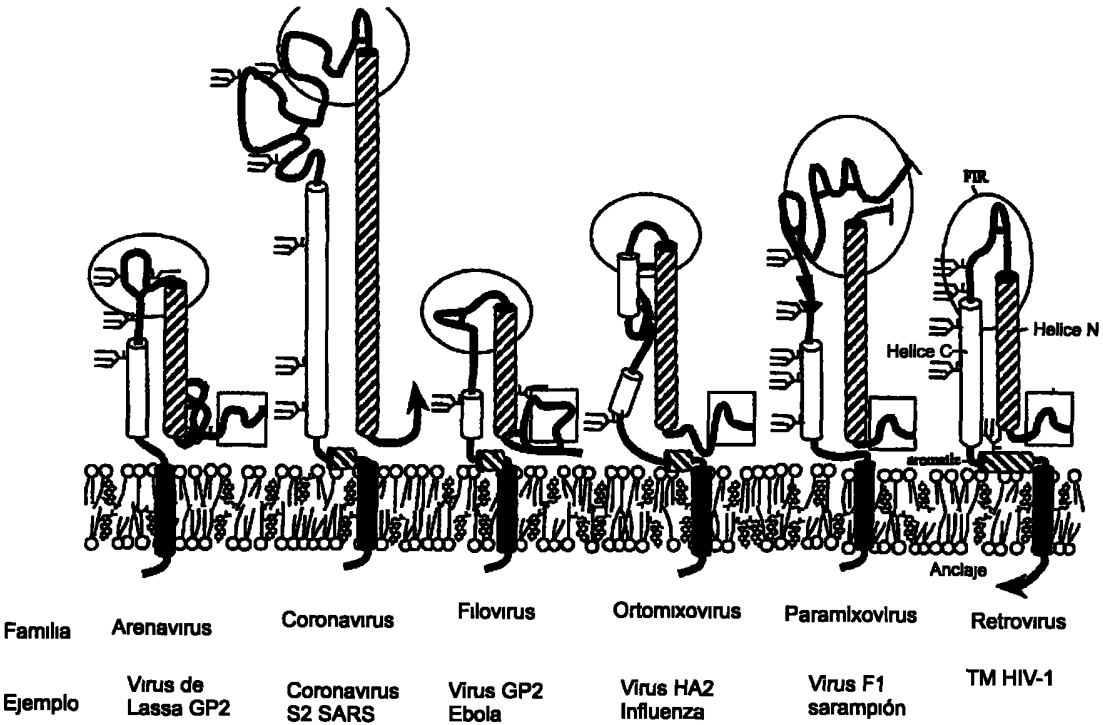
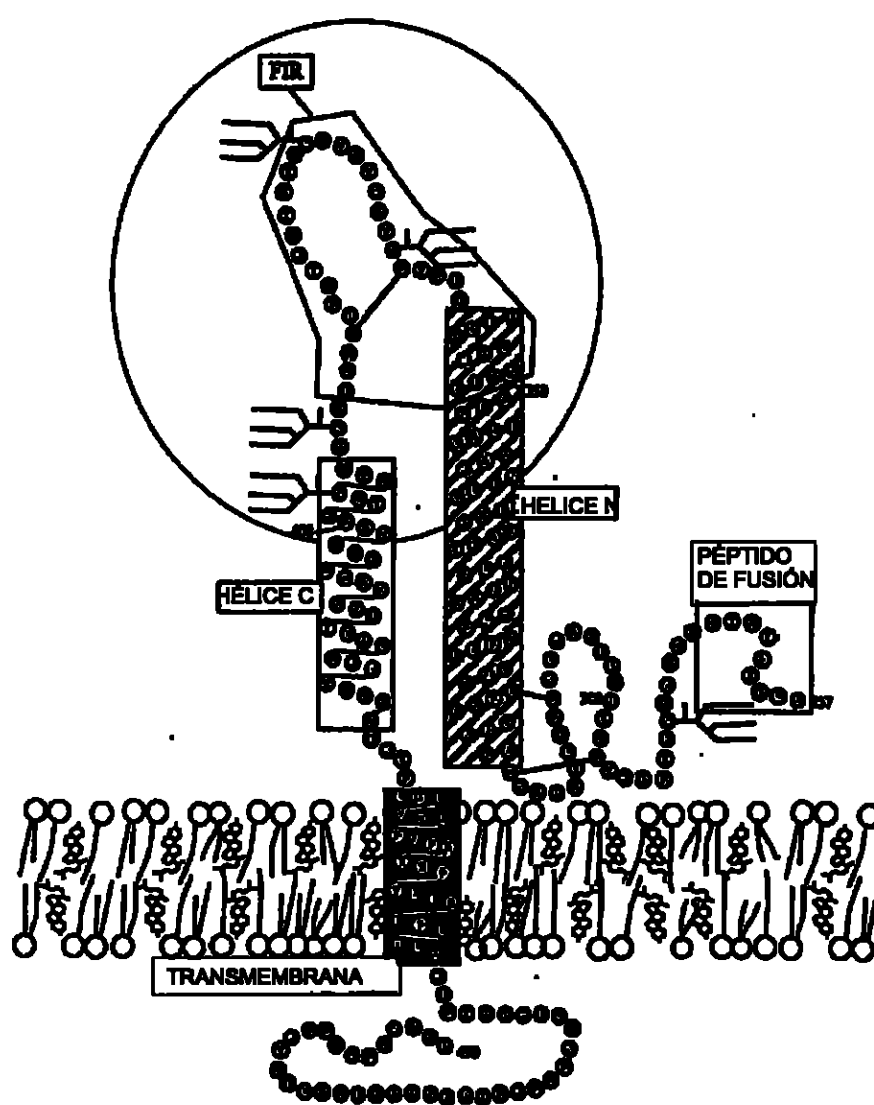


Figura 1

130

132

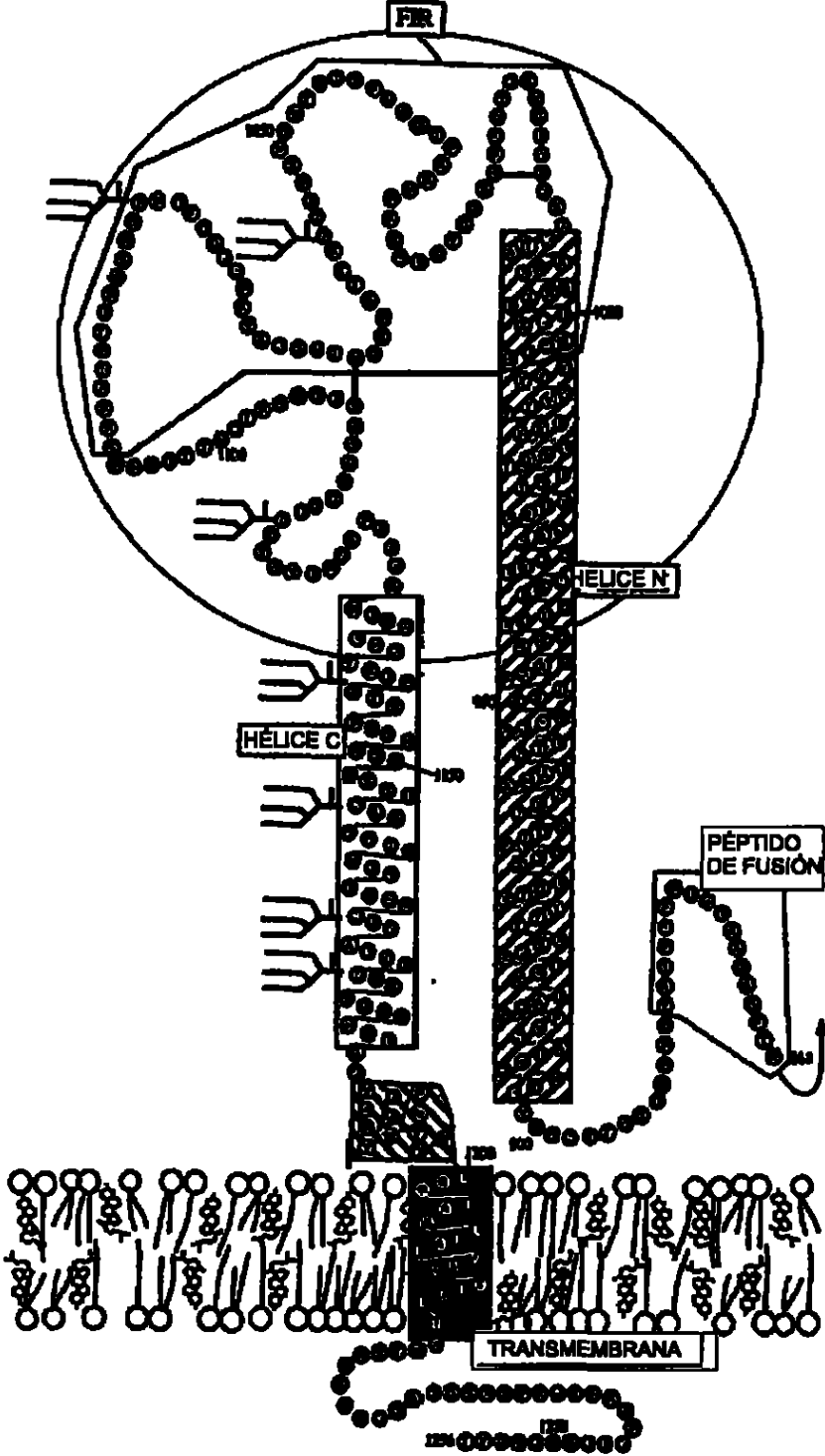
132



Virus de Lassa GP2

Figura 2

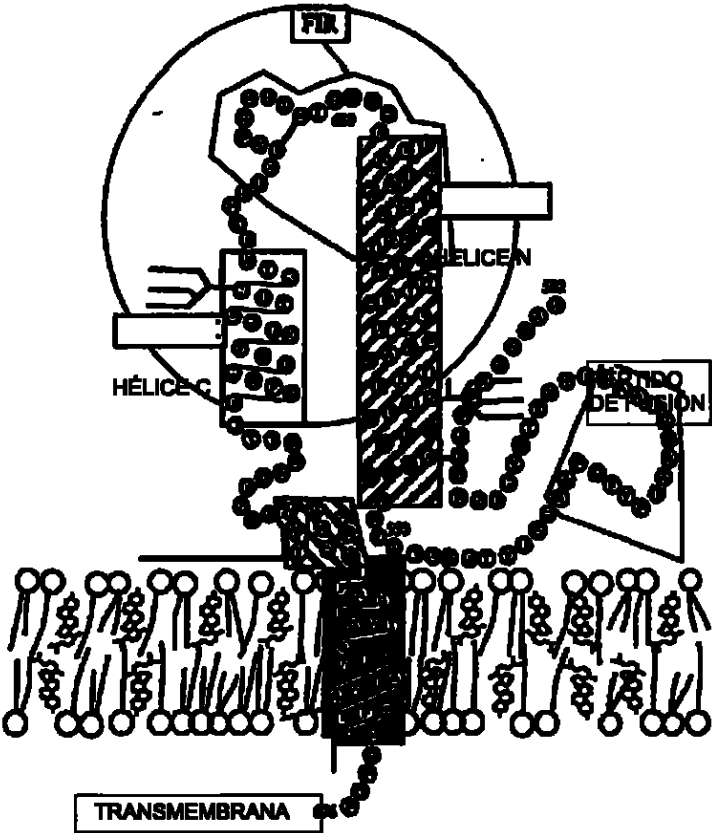
132
133



SARS CoV S
Figura 3

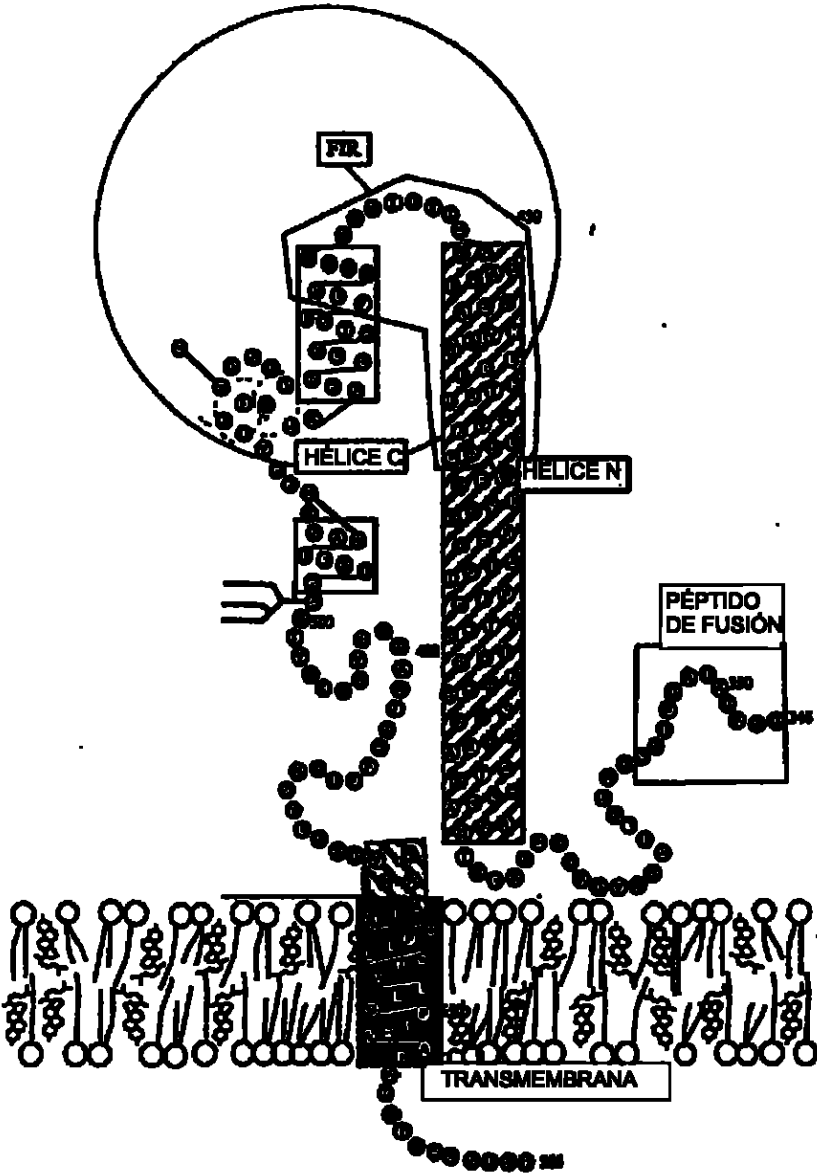
133

134



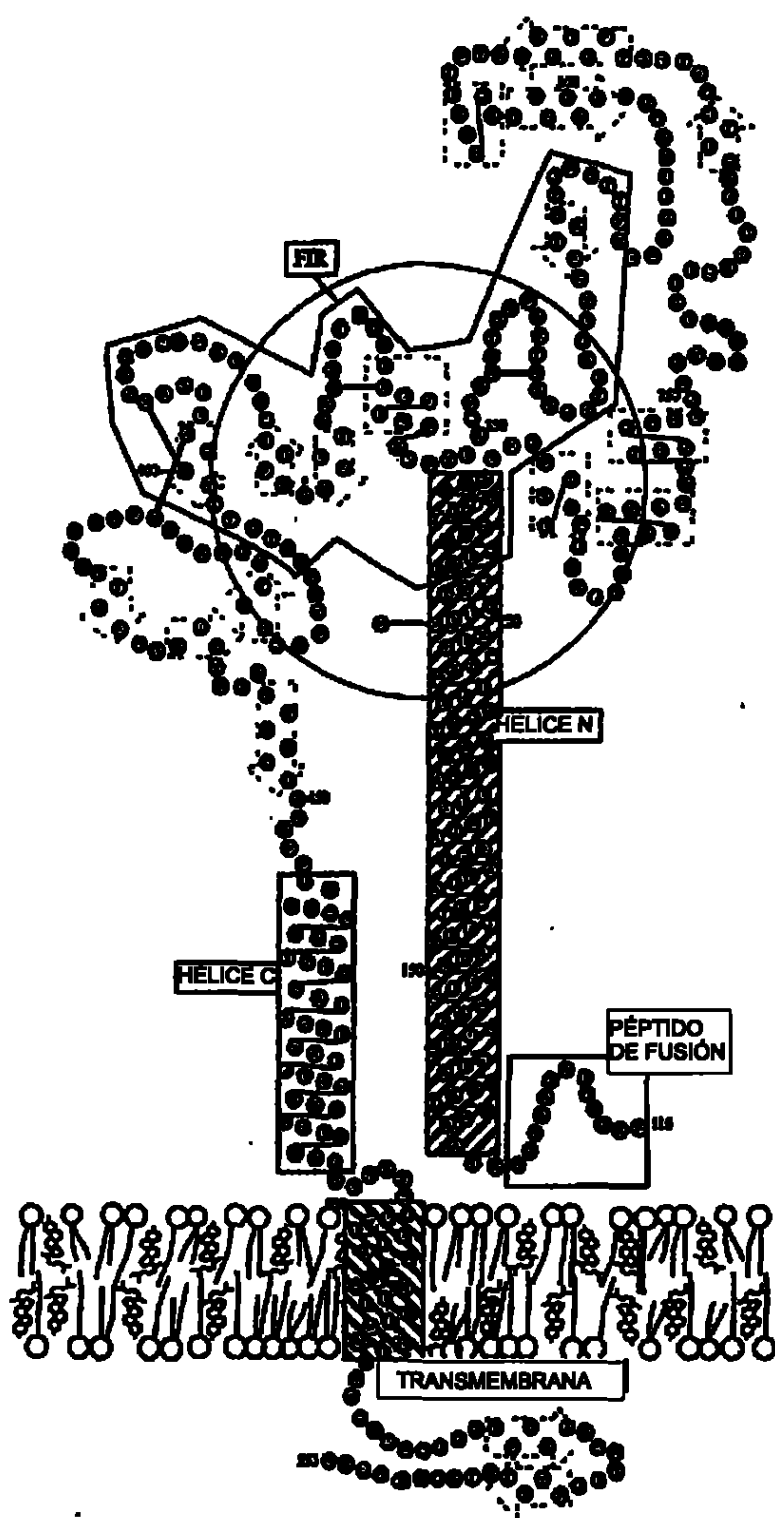
Virus Ébola GP2
Figura 4

134
135



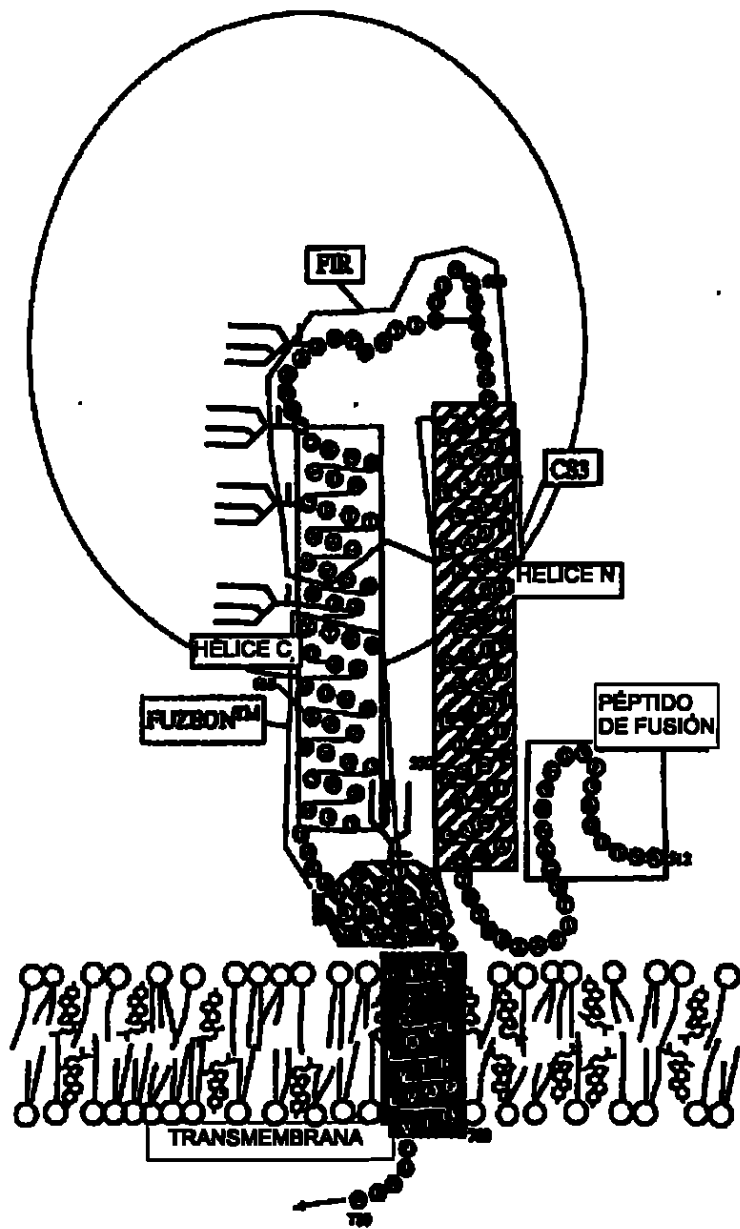
Virus de influenza HA2
Figura 5

135
136



Virus de sarampión F1
Figura 6

~~136~~
137



HIV-1 TM
Figura 7

~~137~~
138

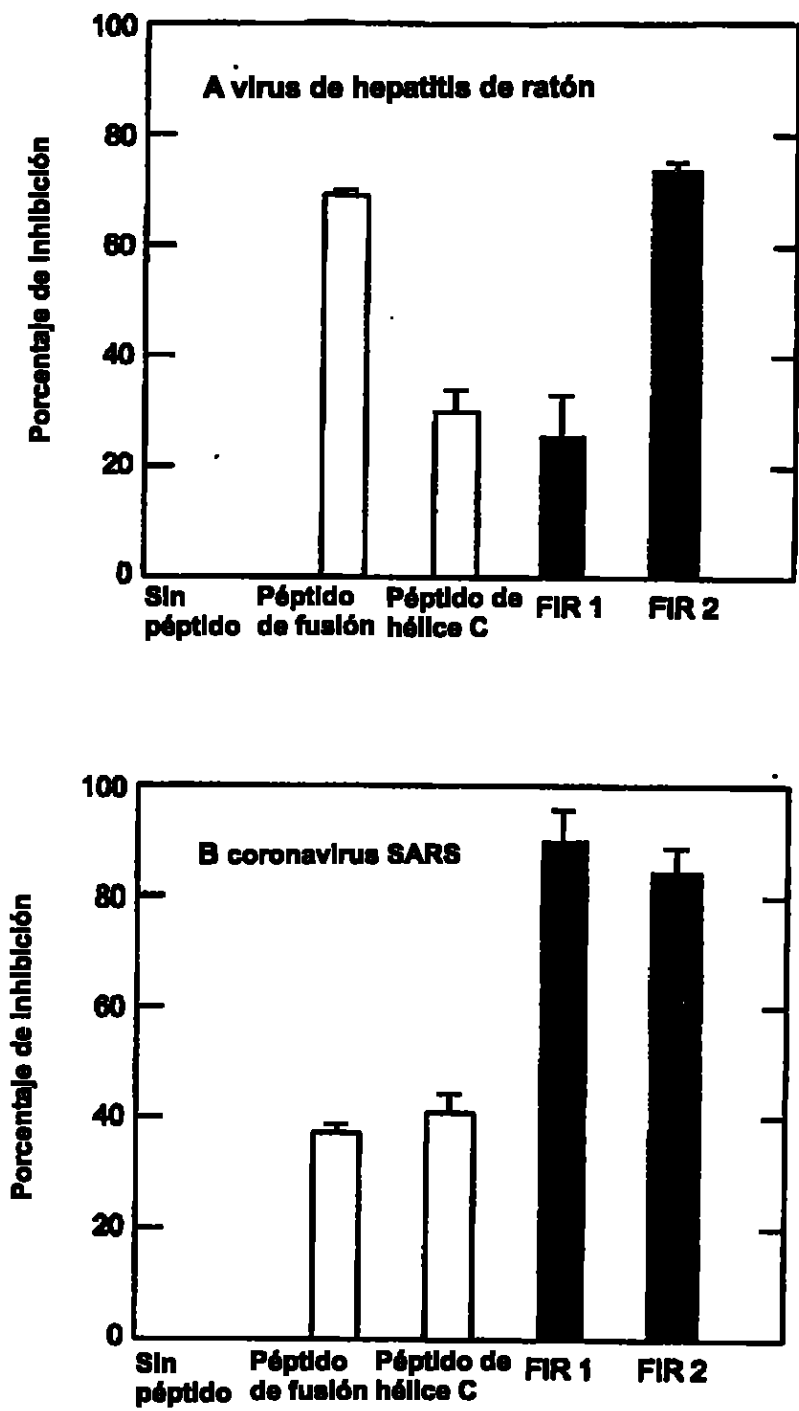


Figura 8

~~138~~
139

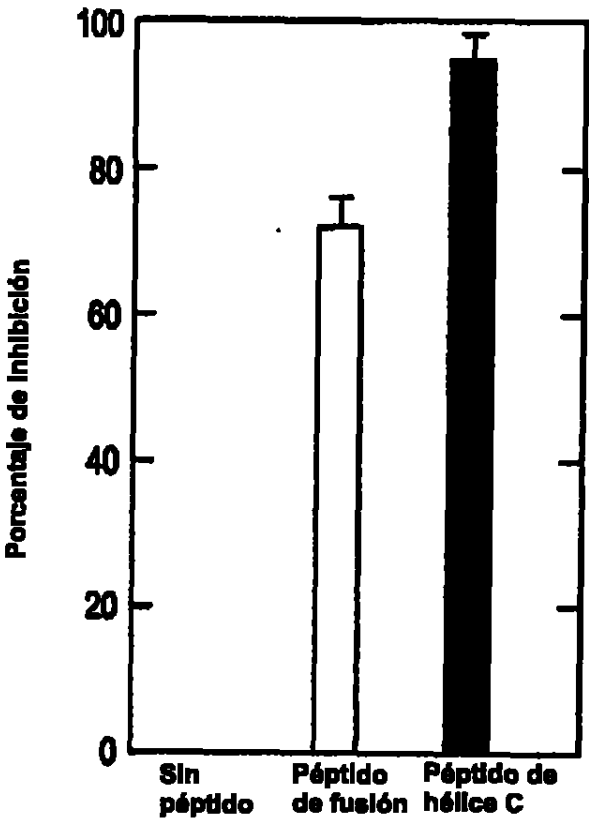


Figura 9

SEQUENCE LISTING

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

<120> METHOD OF PREVENTING VIRUS:CELL FUSION BY INHIBITING THE FUNCTION
OF THE FUSION INITIATION REGION IN RNA VIRUSES HAVING CLASS I
MEMBRANE FUSOGENIC ENVELOPE PROTEINS

<130> 12920.0013.00PC00

<150> US 60/517,181

<151> 2003-11-04

<160> 31

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 3
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<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

<210> 4
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 4

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
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<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
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

142

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 7

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 8

Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 9

Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys
1 5

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 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

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 11

Leu Lys Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Glu
1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 12

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

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

~~143~~
144

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220> .
<223> Synthetic peptide

<400> 14

Cys Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser Cys
1 5

<210> 15
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220> .
<223> Synthetic peptide

<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

<210> 16
<211> 234
<212> PRT
<213> LASSA VIRUS

<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

149
145

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
<211> 388
<212> PRT
<213> SARS VIRUS

<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

7/13

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
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> EBOLA VIRUS
 <400> 18
 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

246

147

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
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> INFLUENZA VIRUS

<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

147
148

<211> 438
<212> PRT
<213> MEASLES VIRUS

<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

10/13

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
<211> 199
<212> PRT
<213> HIV

<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

149
150

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
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<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
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 23

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
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<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
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial sequence

151

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<210> 29

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial sequence

~~PSI~~
152

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 30

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

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<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

152
153

PC Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12N	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND	
(30) Prioridad (31) 60/517,181 (32) 04/11/03 (33) US		(72) Inventor(es) ROBERT R. GARRY WILSON RUSSELL	
		(74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 04/08/2006		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 19/05/2005	
Fecha de presentación de la solicitud: 03/11/2004		N° publicación: WO 2005/044992 A2	
No. de solicitud PCT/US2004/036578			
(54) Título: METODO PARA PREVENIR LA FUSION VIRUS-CELULA AL INHIBIR LA FUNCION DE LA REGION DE INICIACION DE FUSION EN VIRUS ARN QUE TIENEN PROTEINAS DE CUBIERTA FUSOGENICA DE MEMBRANA CLASE I			

Reivindicación(es):

1. Un método para identificar un compuesto capaz de prevenir o inhibir la infección viral de una célula huésped, el método comprende:
- (a) preparar un blanco que comprende una secuencia de aminoácido de una región de iniciación de fusión viral (FIR), en donde el FIR es de un virus que tiene una proteína de fusión de membrana que comprende: (i) al menos dos hélices alfa extendida, (ii) un péptido de fusión, y (iii) una región de iniciación de fusión;

(b) seleccionar una pluralidad de compuestos para identificar al menos un compuesto que se une al blanco, un compuesto que se une al blanco;

(c) seleccionar al menos un compuesto que se une a un blanco para identificar un compuesto que se une a un blanco capaz de prevenir o inhibir la infección viral de una célula huésped mediante un virus con una proteína de fusión que comprende el FIR.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende además identificar un virus que tiene una proteína de fusión de membrana que comprende: dos o más hélices alfa, un péptido de fusión, y una región de iniciación de fusión (FIR).
3. El método de la reivindicación 1 en donde el blanco es análogo de péptido, un derivado de péptido, o un péptido semejante.
4. El método de la reivindicación 1 en donde el compuesto es un anticuerpo o un fragmento funcional de este.
5. El método de la reivindicación 1 en donde el virus es de una familia de virus seleccionado del grupo que consiste de arenavirus, coronavirus, filovirus ortomixovirus, paramixovirus y retrovirus.
6. El método de la reivindicación 1 en donde el virus se selecciona del grupo que consiste de Virus de Lassa, Virus Linfocítico Coriomeningítico (LCMV), Virus Junin, Virus Machupo, Virus Guanarito, Virus Sabia, Virus del Síndrome respiratorio Agudo Severo (SARS), Virus de la hepatitis de Murino (MHV), coronavirus de Bovino, Coronavirus de Canino, Virus de Peritonitis Infecciosa de Felino, Virus del Ebola, Virus de Marburg, Virus de la Influenza A, Virus de la Influenza B, Virus de la Influenza C, Virus del Sarampión, Virus de las Paperas, Virus del Moquillo Canino, Virus de la Enfermedad de Newcastle, Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (HIV-1), Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2 (HIV-2), virus linfotrópico de célula T Humano 1 (HTLV-1), Virus Linfotrópico de Célula T Humana 2 (HTLV-2), partícula tipo A Intracisternal Humana 1 (HIAP-1), y partícula Tipo A Intracisternal Humana 2 (HIAP-2).
7. Un péptido aislado que comprende:
- (a) Una secuencia de aminoácido o una secuencia análoga a este de una región de iniciación de fusión viral (FIR); o

(b) Un segmento funcional de un FIR o una secuencia análoga a este de un virus que pertenece a uno de los grupos de las familias de virus que consisten de arenavirus, coronavirus, filovirus, ortomixovirus, paramixovirus, y retrovirus, en donde el segmento funcional no incluye HIV*1 TM CS3.



FORMATO DE DIGITALIZACI N
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S.A.

154

Expediente No		06 052 822	No de Follo
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA X	7	✓
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		
Observaciones:			
contiene arte final			

155

ISA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-052822- -00000-0000
Fec: 2006-06-01 16:46:44 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII
Cve: 379 FASCNACIONALI
Act.411 PRESENTACION
Folios: 164

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 38,522
FECHA : MAYO 22 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54982577	22/05/2006	34,522,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Gob 11876-841-003.7

156

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

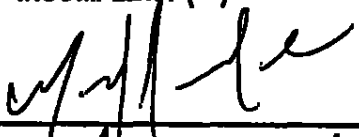
Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
	()	()
PATENTE DE INVENCION () MODELO DE UTILIDAD ()		
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Descripción de la invención.	()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
 DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
 ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Fecha:


11/ junio 06

157

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND

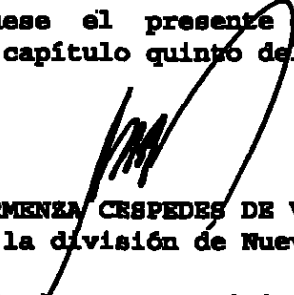
REFERENCIA	Radicación No.	6 52822
	Solicitud internacional	PCT/US2004/036578
	Fecha inicio fase nacional	04/06/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	9836

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 01 SET. 2020
adpali