

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 005 559**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/03**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2019** **PCT/EP2019/069562**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2020** **WO20016433**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2019** **E 19742045 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024** **EP 3823979**

54 Título: **Métodos para cribar e identificar agentes que inhiben o modulan el complejo de salida nuclear de los herpesvirus**

30 Prioridad:

**20.07.2018 EP 18184806**

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

**14.03.2025**

73 Titular/es:

**AICURIS ANTI-INFECTIVE CURES AG (50.00%)**  
**Friedrich-Ebert-Str. 475**  
**42117 Wuppertal, DE y**  
**FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT**  
**ERLANGEN-NÜRNBERG (50.00%)**

72 Inventor/es:

**MARSCHALL, MANFRED;**  
**MULLER, YVES;**  
**STICHT, HEINRICH y**  
**EICHLER, JUTTA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 3 005 559 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para cribar e identificar agentes que inhiben o modulan el complejo de salida nuclear de los herpesvirus

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a un campo de diseño racional de fármacos para afectar a/inhibir la formación del complejo de salida nuclear (NEC, por sus siglas en inglés) en virus de la familia de los *Herpesviridae*, en particular el citomegalovirus humano (HCMV, por su siglas en inglés), el virus de Epstein-Barr (EBV, por su siglas en inglés) y/o el virus de la varicela zóster (VZV, por su siglas en inglés).

Específicamente, la presente invención se refiere a métodos para el cribado de inhibidores de interacciones generales proteína-diana o péptido-diana incluyendo, pero sin limitación, interacciones proteína-proteína, fragmento de proteína-fragmento de proteína, péptido-péptido, fragmento de péptido-fragmento de péptido, proteína-ácido nucleico, proteína-péptido y proteína-molécula pequeña, así como interacciones péptido-molécula pequeña, pero sin limitación, con aplicación particular a la inhibición de la interacción de las proteínas del NEC central pUL50 y pUL53 u homólogos de las mismas del NEC de virus del grupo de los *Herpesviridae*, y en particular en citomegalovirus, más en particular en el citomegalovirus humano (HCMV), y/o BFRF1 y/o BFLF2 u homólogos de las mismas del EBV, y/o el marco de lectura abierto 24 (ORF24) y/o el marco de lectura abierto 27 (ORF27) u homólogos de los mismos del VZV.

Anteriormente, era difícil reunir información suficiente sobre la estructura del complejo NEC. Los intentos de dilucidar la estructura cristalina de estos complejos no proporcionaron resultados suficientemente claros para que pudieran usarse en métodos bioinformáticos para el diseño y la identificación de moléculas que interactúen y, en particular, afecten a o inhiban la formación del NEC en los herpesvirus, con la excepción del HCMV, del que se disponía de información, aunque no suficiente para su uso con los fines anteriores.

En el presente documento se proporcionan proteínas de fusión que comprenden las respectivas subunidades del NEC, que permiten ventajosamente proporcionar datos estructurales mejorados de los NEC de los respectivos virus que ayudarán a identificar fármacos que interactúen con al menos uno de estos NEC, pero preferentemente con más de los NEC de diferentes herpesvirus.

Häge, S.B., "*Analysis of the functional conservation of herpesviral core NEC proteins*", tesis de máster, abril de 2018, muestra que las subunidades de proteína del NEC derivado de diferentes miembros de la familia de los herpesvirus no tienden a coprecipitar, es decir, no forman heterodímeros funcionales, a excepción de las subunidades de proteína derivadas de CMV humanos y de ratón. Por ejemplo, los heterodímeros entre las subunidades proteicas derivadas del HCMV y el EBV no pudieron coimmunoprecipitar. Esto condujo a suponer que las subunidades respectivas de los diferentes herpesvirus son estructuralmente muy distintos. Sin embargo, debido al uso de las nuevas proteínas de fusión descritas en el presente documento, fue sorprendentemente posible determinar que las estructuras cristalinas de herpesvirus no relacionados son bastante similares. Esto sugiere también funciones similares, que se pueden modular y/o inhibir por compuestos que también son bastante similares para más de un tipo de virus. En consecuencia, las estructuras descritas en el presente documento proporcionan la base para el establecimiento de métodos que usan las proteínas de fusión como herramientas para identificar dichos compuestos, que interactúan con al menos un herpesvirus de la familia *Herpesviridae*, es decir, de HHV-1 a HHV-8, MCMV y/o PrV, en particular con diferentes herpesvirus, por ejemplo, aquellos que pertenecen a diferentes subgrupos de herpesvirus, por ejemplo, con los betaherpesvirus.

En consecuencia, la presente invención se refiere en particular a métodos para el cribado de agentes capaces de modular/inhibir la actividad de las interacciones proteína-proteína y/o péptido-proteína de BFRF1 y/o BFLF2 u homólogos de las mismas del EBV, y/o marco de lectura abierto 24 (ORF24) y/o marco de lectura abierto 27 (ORF27) u homólogos de los mismos del VZV, y/o pUL50 y pUL53 del HCMV u homólogos de las mismas, basándose en un novedoso mecanismo de gancho N-terminal de pUL53 o un homólogo de la misma que es extensible a mecanismos del NEC homólogos de virus del grupo de los *Herpesviridae*, tal como en las especies HHV-1 a HHV-8 y/o PrV, pero sin limitarse a las mismas, y en particular en el citomegalovirus humano (HCMV), el EBV y/o el VZV, o con betaherpesvirus.

En este sentido, la Figura 4 muestra regiones respectivas altamente conservadas del CR1-CR de entre cepas específicas del grupo de especies *Herpesviridae* HCMV, MCMV, HSV, HHV-6, VZV, EBV y PrV. Es razonable suponer que un alto grado de homología de regiones proteicas altamente conservadas proporciona motivos proteicos o peptídicos funcionales que pueden aprovecharse en tecnologías de cribado para encontrar nuevos fármacos antivíricos basados en los motivos proteicos o peptídicos funcionales como diana única, por ejemplo, un fármaco (pan-)anti-herpesvirus.

Anteriormente se describió una estructura de gancho N-terminal de 29aa de pUL53 (Walzer *et al.*, *J. Biol. Chem.* Vol. 290, N.º 46, págs. 27452-27458) como estructura diana. Otro hallazgo clave fue la determinación de fosfo-sitios específicos basados en aminoácidos de pUL50 que se sitúan fuera de la región de interacción pUL50-pUL53, y que son decisivos para la fosforilación durante los mecanismos basados en NEC, es decir, la multimerización del NEC.

La presente invención proporciona herramientas y métodos para identificar moléculas/agentes/compuestos que enmascaran, bloquean o protegen dichos fosfo-sitios específicos basados en aa para afectar a/modular/inhibir los fosfo-sitios ya sea solos o en combinación para influir en la estructura y/o función de la multimerización del NEC vírico dentro del grupo de los *Herpesviridae*, por ejemplo, en especies seleccionadas de un grupo HHV-1 a HHV-8, MCMV y/o PrV. Esto también puede aprovecharse en estrategias antivíricas novedosas.

#### Antecedentes de la invención

Las interacciones proteína-proteína o péptido-proteína o péptido-péptido desempeñan una función clave en la mayoría de los procesos biológicos, incluyendo la salida nuclear de las cápsides empaquetadas para promover una mayor maduración del virión, por lo que ofrecen oportunidades atractivas para la intervención terapéutica.

Pueden inhibirse diferentes tipos de interacciones proteína-proteína o péptido-proteína o péptido-péptido usando moléculas pequeñas similares a fármacos/moléculas pequeñas diseñadas por ordenador/proteínas/fragmentos de proteínas/péptidos/fragmentos de péptidos/anticuerpos/armazones no IgG, etc.

Dentro de la familia de los *Herpesviridae*, y específicamente para el HCMV, el miembro prototipo humano de dicha familia, el NEC vírico representa una posición clave reguladora de la replicación vírica y una diana putativa para estrategias antivíricas novedosas (4-9). En particular, Leigh *et al.* (9) describen la estructura de una subunidad del complejo de salida nuclear de herpesvirus, que es un surco de interacción esencial para la replicación vírica. Bigalke *et al.* (47) divulgan nuevos conocimientos sobre la función del complejo de salida nuclear de los herpesvirus. De acuerdo con la presente invención, el NEC vírico no es sólo una diana para el HCMV, sino también para el EBV y el VZV, y muy probablemente también para otros herpesvirus.

Como rasgo característico de la mayoría de los virus ADN, el HCMV inicia la replicación genómica en el núcleo de la célula hospedadora, donde se empaquetan cápsides preformadas y se exportan al citoplasma para la posterior maduración del virión. La transición de las cápsides a través de la envoltura nuclear (es decir, la salida nuclear) es un proceso regulador de múltiples etapas que implica una distorsión de la lámina nuclear desencadenada por la fosforilación (10-17). La proteína cinasa pUL97 codificada por el HCMV se identificó como la primera cinasa herpesvítica con actividad fosforiladora de laminas (11, 16, 17; véase la FIG. 6).

Es importante destacar que el reclutamiento de cinasas víricas y celulares de fosforilación de la lámina, así como de otros factores del hospedador modificadores de la lámina (tales como la prolil cis/trans isomerasa Pin1; (13)) se logra mediante dos proteínas víricas conservadas de salida nuclear, pUL50 y pUL53. Como etapa esencial en la replicación del HCMV, pUL50 y pUL53 se hetero-dimerizan y forman el centro del NEC que sirve como almacén para el reclutamiento de un grupo de proteínas víricas y celulares asociadas al NEC (véanse las FIG. 3 y 6). La composición del NEC multimérico de los citomegalovirus (CMV) humano y murino se ha definido recientemente mediante análisis proteómicos (15, 18). El documento WO 2014/089158 divulga el citomegalovirus que detecta la replicación condicional (rdCMVhet) que comprende una proteína de fusión que es una proteína esencial del CMV fusionada a una proteína desestabilizadora.

Adicionalmente, ambas proteínas de salida nuclear pUL50 y pUL53 se modifican postraduccionalmente de forma compleja, en particular por fosforilación. La cinasa vírica pUL97 es una de las cinasas responsables, pero se sugiere que las cinasas celulares están implicadas en la fosforilación del NEC central vírico, asimismo. El estado correctamente fosforilado de pUL50 y pUL53 es importante para su actividad proteica, transporte intracelular e interacción entre sí y con otras proteínas del NEC víricas y celulares, así como para la estabilidad proteica.

El citomegalovirus humano (HCMV, familia *Herpesviridae*) es un patógeno humano importante de distribución mundial. En ocasiones se ha subestimado su importancia clínica, ya que la infección del hospedador inmunocompetente puede limitarse a formas leves de síntomas (1). La patogenia principal del HCMV se manifiesta por una enfermedad sistémica grave o incluso potencialmente mortal en hospedadores inmunodeprimidos y tras la infección congénita de neonatos (2, 3). La patogenia del HCMV está determinada por diversos parámetros de control inmunitario, productividad vírica, viremia, tropismo tisular y daño orgánico, así como múltiples eventos reguladores de la interacción virus-hospedador (1).

Por ende, el ciclo de replicación productivo vírico está en gran medida corregulado por la interacción entre proteínas víricas y celulares y por la formación de complejos multiproteicos virus-hospedador. De este modo, el NEC representa una posición clave reguladora de la replicación vírica y una diana putativa para estrategias antivíricas novedosas (4-9).

Existe, por lo tanto, una necesidad continua de un método eficaz y sencillo para identificar compuestos (preferentemente moléculas pequeñas similares a fármacos) que puedan interferir en dichas interacciones proteína-proteína/péptido, proteína-ácido nucleico y proteína-molécula pequeña de señalización, etc., que desempeñan papeles críticos en el reconocimiento macromolecular.

En particular, sigue existiendo la necesidad de un método eficaz y sencillo para identificar compuestos que puedan interactuar con dichas proteínas esenciales, tales como BFRF1 y BFLF2 del EBV, y/u ORF24 y ORF27 del VZV, y/o pUL50 y pUL53 del HCMV, y sus homólogos, y por lo tanto puedan usarse en el desarrollo de terapias a medida para suprimir la maduración del virión más eficientemente y más específicamente. Sin embargo, el desarrollo de fármacos que inhiben la formación del armazón del NEC ha progresado lentamente hasta ahora.

Por lo tanto, es necesario profundizar en el conocimiento de los componentes decisivos de la formulación del NEC y sus vías resultantes. En consecuencia, componentes recién descubiertos del NEC, que parecen estar altamente conservados en virus que comprenden un mecanismo basado en el complejo de salida nuclear para la transferencia de las cápsides víricas empaquetadas del núcleo al citoplasma, pueden servir entonces como dianas novedosas para el diseño de fármacos a medida.

Se sabe que, particularmente entre el grupo vírico de los *Herpesviridae*, tales como HHV-1 a HHV-8, MCMV y/o PrV, por ejemplo, los betaherpesvirus, pero sin limitación, el mecanismo basado en el complejo de salida nuclear para la transferencia de las cápsides víricas empaquetadas con ADN del núcleo al citoplasma desempeña una función fundamental en la maduración del virión y, por lo tanto, parece una diana farmacológica prometedora para agentes farmacéuticos de amplio espectro.

A la vista de los problemas, necesidades y objetivos descritos anteriormente, los inventores han ideado realizaciones de la presente invención en las que pueden identificarse eficazmente moduladores/inhibidores de interacciones proteicas (proteína-proteína, péptido-péptido, proteína-ácido nucleico, proteína-molécula pequeña, etc.) basándose en métodos de cribado novedosos que se basan en las estructuras del NEC divulgadas en el presente documento, (véanse las FIG. 1 y 2 para una ilustración de la estructura de tipo gancho del HCMV y para detalles estéricos) entre la interacción pUL50 y pUL53 durante la salida nuclear.

## Sumario de la invención

La replicación nuclear de herpesvirus en general, y específicamente del EBV y/o el VZV y/o el citomegalovirus, depende de mecanismos elaborados de salida nucleocitoplasmática de las partículas víricas; es decir, ADN vírico empaquetado en cápsides que se transfieren del núcleo de una célula hospedadora al citoplasma. Por esto, dos tipos de proteínas están muy conservadas y son esenciales para construir el núcleo de un complejo de salida nuclear entre los virus del grupo de los *Herpesviridae* (véanse, por ejemplo, la FIG. 4 y las SEQ ID NO: 7-39). Específicamente, el papel de dos proteínas de salida nuclear víricas esenciales y conservadas, pUL50 y pUL53, es fundamental para el citomegalovirus, en particular para el HCMV. Dichas pUL50 y pUL53 se hetero-dimerizan y forman el complejo de salida nuclear (NEC) central, que se ancla a la membrana nuclear interna y proporciona un armazón para el ensamblaje de un NEC vírico-celular multimérico (véase la FIG. 3 para consultar la ilustración del mismo). Las proteínas correspondientes son, por ejemplo, BFRF1 y BFLF2 del EBV, y ORF24 y ORF27 del VZV, respectivamente.

En la presente invención, los inventores divulgan la estructura cristalina detallada del NEC central del EBV y el HCMV, así como el mecanismo de interacción proteína-proteína de BFRF1 y BFLF2 y pUL50 y pUL53, respectivamente, basándose en proteínas de fusión nuevas y truncadas como se representan en las SEQ ID NO: 1-6.

Las proteínas conservadas pUL50 y pUL53 del citomegalovirus, BFRF1 y BFLF2 del EBV, y ORF24 y ORF27 del VZV se hetero-dimerizan y forman un complejo de salida nuclear central. Fragmentos funcionalmente relevantes de las mismas, es decir, pUL50 y pUL53, BFRF1 y BFLF2 del EBV, y ORF24 y ORF27 del VZV se coprodujeron en *E. coli*, se copurificaron y se cocrystalizaron para determinar la estructura tridimensional a alta resolución.

También se divulgan implicaciones para el ensamblaje detallado del NEC multimérico en vista de la interacción de gancho observada entre pUL53 y pUL50 (véanse las FIG. 1 y 2) y el ensamblaje más grande divulgado de los heterodímeros pUL50-pUL53 en estructuras hexaméricas de tipo anillo dentro de los cristales (véase la FIG. 2 C para consultar una ilustración y para consultar detalles estéricos).

Los inventores descubrieron previamente que la interacción de gancho de las proteínas esenciales pUL50 y pUL53 es una diana prometedora para el desarrollo de estrategias antivíricas novedosas, por ejemplo, contra el CMV en general y el HCMV en particular, y debido al alto grado de analogía y homología contra otros virus del grupo de los *Herpesviridae*, en general (véase la información de alineación en la FIG. 4 y las secuencias SEQ ID NO: 7-39 para consultar detalles de secuencia con respecto a la homología).

Las nuevas estrategias terapéuticas podrían apuntar a una inhibición estérica directa de interacciones proteína-proteína, péptido-péptido mediante, por ejemplo, inhibidores de molécula pequeña diseñados por ordenador, y/o a una interferencia con los mecanismos reguladores que controlan el ensamblaje del NEC, como la inhibición de la fosforilación de proteínas del NEC a través de inhibidores de cinasas en sitios de fosforilación de aminoácidos específicamente divulgados en el presente documento (6, 43; véase más adelante).

Los inventores descubrieron que la información estructural cristalina divulgada en el presente documento, por ejemplo, para el complejo pUL50-pUL53 del HCMV o para el complejo BFRF1-BFLF2 del EBV, puede usarse como base de

nuevos enfoques en métodos de cribado de agentes que inhiben el NEC como diana (pan-)anti-herpesvítica única, por ejemplo, para la inhibición de la replicación del EBV y/o del VZV y/o del HCMV. En un aspecto particular de la invención, los compuestos descritos en el presente documento son para su uso en la inhibición del NEC en betaherpesvirus. En consecuencia, los métodos de cribado divulgados en el contexto de la invención permiten el desarrollo de tipos novedosos de fármacos dirigidos al NEC para virus seleccionados del grupo de los *Herpesviridae*, específicamente para fármacos contra Pan-Herpes.

Dichos métodos de cribado pueden comprender generalmente las etapas de

- (a) proporcionar al menos una célula infectada con al menos un virus de los *Herpesviridae*, caracterizada porque dicha una o más células expresan BFRF1 y/o BFLF2 del EBV o un homólogo funcional de las mismas, y ORF24 y/u ORF27 del VZV o un homólogo funcional de las mismas, o una pUL50 y/o pUL53 o un homólogo funcional de las mismas,
- (b) poner en contacto dicha una o más células con un agente candidato a ser sometido a ensayo,
- (c) y determinar si el agente candidato impide/inhíbe la salida nuclear de dicho uno o más virus al citoplasma.

Otro método de cribado de agentes que modulan/inhiben la actividad de la interacción BFRF1 y BFLF2, y/u ORF24 y ORF27 y/o pUL50 y pUL53 comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra *in vitro*, caracterizada por que dicha muestra comprende al menos una o más proteínas BFRF1 y/o BFLF2 y/u ORF24 y/u ORF27 y/o pUL50 y/o pUL53 o uno o más homólogos funcionales de las mismas,
- (b) poner en contacto dicha muestra *in vitro* con un agente candidato a ser sometido a ensayo, y
- (c) determinar si el agente candidato impide/inhíbe la interacción proteínica respectiva.

Las proteínas conservadas del citomegalovirus BFRF1 y BFLF2, u ORF24 y ORF27, o pUL50 y pUL53 se heterodimerizan y forman un centro del complejo de salida nuclear (NEC). Los inventores resolvieron la estructura cristalina de los complejos proteicos de las nuevas proteínas de fusión proporcionadas en el presente documento a una resolución de 1,48 Å para pUL50 y pUL53 del HCMV y a una resolución de 1,75 Å para BFRF1 y BFLF2 del EBV.

Los inventores descubrieron previamente una extensión de gancho N-terminal de pUL53, es decir, basándose en la estructura primaria del péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 de la secuencia de pUL53 como que es la arquitectura del NEC central, que proporciona un almacén para interacciones de proteínas del NEC víricas-celulares y para la construcción del NEC multimérico.

Las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias resultantes de las proteínas de los virus pueden servir como dianas para el desarrollo de estrategias antivíricas novedosas, que puede impedir la salida nuclear de las cápsides empaquetadas con ADN del núcleo al citoplasma y, por lo tanto, pueden ser útiles contra virus del grupo de los *Herpesviridae* en general, y en particular entre las especies HHV-1 a HHV-8, MCMV y PrV, por ejemplo, para los betaherpesvirus, pero sin limitación, en donde el mecanismo basado en el complejo de salida nuclear para la transferencia de las cápsides víricas empaquetadas con ADN del núcleo al citoplasma desempeña una función fundamental en la maduración del virión.

Con este enfoque, basándose en nuevos datos sobre las estructuras cristalinas de los complejos de salida nuclear del VEB, del VVZ y del citomegalovirus humano, los inventores proporcionan nuevos enfoques para métodos de cribado a medida de agentes que explotan específicamente este mecanismo.

#### Breve descripción de las figuras/dibujos

FIG. 1: Estructura cristalina del complejo pUL50-pUL53.

FIG. 1 A: Representación en cinta del complejo pUL50-pUL53. pUL50 se muestra en la sección a continuación; pUL53 se muestra en la sección anterior. Los elementos de estructura secundaria de la extensión N-terminal de tipo gancho de pUL53 (basándose en la SEQ ID NO: 7) están marcados con  $\alpha_{531}$ ,  $\alpha_{532}$  y  $\beta_{531}$ .

FIG. 1 B: Visualización de una porción del mapa de densidad electrónica de diferencia anómala en fase que valida la ubicación de los restos metionina en el modelo final. El mapa se muestra con un corte de 5 sigma y se calcula con las diferencias anómalas observadas en el conjunto de datos de picos SeMet.

FIG. 1 C: Vista ampliada del sitio de unión a cinc de la proteína pUL53.

FIG. 1 D: Representación detallada de la interacción de la extensión N-terminal de tipo gancho de pUL53 con pUL50; mostrada en dos orientaciones diferentes. Los restos representados en forma de barra contribuyen a la interacción con más de 50 Å<sup>2</sup> de su área de superficie.

FIG. 2: Implicaciones de la estructura cristalina de pUL50-pUL53.

FIG. 2 A: pUL53 del HCMV muestra un parecido estructural con el dominio GHKL, como se representa mediante una superposición de pUL53 (las cintas grandes circundantes) y el dominio GHKL de VraS de *Staphylococcus aureus* (las cintas centrales en la porción superior de la FIG. 2 A; código de PDB 4GT8). La molécula de ADP unida a la proteína VraS se muestra en forma de barras en el centro de la FIG. 2 A. El ion de cinc unido a pUL53 se representa como esfera en el centro de la FIG. 2 A. La búsqueda de homólogos estructurales y la superposición se realizó con PDBeFold (36).

FIG. 2 B: Superposición de la estructura cristalina de pUL50 y la estructura por RMN de pM50 (pdb 5A3G) (9). Se muestran pUL50, pUL53 y pM50, respectivamente. En comparación con la estructura de pM50, la hélice C-terminal de pUL50 está desplazada por las hélices  $\alpha_{531}$  y  $\alpha_{532}$  de pUL53 que forman una extensión de tipo gancho.

FIG. 2 C: Estructura hexamérica de tipo anillo formada por el complejo pUL50-pUL53 en los cristales. Se muestran representaciones en cinta y en superficie de pUL50 y pUL53, respectivamente. Aunque las moléculas de pUL50 forman un anillo contiguo, las moléculas de pUL53 se muestran individualmente formando el borde del anillo. Las ubicaciones de los extremos de las proteínas están marcadas con puntos de color negro.

FIG. 3: Ilustración esquemática de la salida nuclear del HCMV - etapas secuenciales del reclutamiento de proteínas del NEC y actividades enzimáticas de reorganización de la lámina nuclear. La replicación genómica del HCMV conduce a la acumulación nuclear de cápsides víricas empaquetadas que se someten a etapas secuenciales de exportación nucleocitoplasmática atravesando la envoltura nuclear (lámina nuclear, membranas nucleares interna y externa MNI/MNE y espacio perinuclear). Un reordenamiento de la lámina nuclear conduce a la formación de áreas de lámina agotada (LDA, por sus siglas en inglés) que sirven como sitios preformados de salida nuclear. El complejo de salida nuclear (NEC) se ensambla mediante la asociación de un grupo recientemente definido de componentes del NEC víricos y celulares (incluyendo pUL50-pUL53, p32/gC1qR, emerina, pUL97, PKC $\alpha$ /quinasas celulares, Pin1 y otros candidatos a NEC putativos (12, 13, 14, 15). Es importante destacar que el NEC central está formado por el heterodímero pUL50-pUL53 (etapa 1) que posteriormente recluta a otros constituyentes del NEC multimérico a través de interacciones directas o indirectas (etapa 2). La función de reclutamiento puede ser desempeñada principalmente por pUL50, que ha demostrado poseer una actividad de unión multiproteica (unión directa de pUL53, p32/gC1qR, emerina y PKC $\alpha$ ). El desensamblaje de la lámina se desencadena por las propiedades de fosforilación de lamina A/C específica de sitio de pUL97 y proteínas cinasas celulares (etapa 3) (6, 10, 11, 16, 17). La peptidil proil cis/trans isomerasa (PPIasa) celular Pin1 es un efector posterior que se une específicamente y posiblemente isomeriza las laminas nucleares fosforiladas (etapa 4). Como consecuencia, es detectable una distorsión localmente restringida de la lámina nuclear en forma de LDA mediante técnicas de formación de imágenes (13). Estas LDA son finalmente utilizadas por las cápsides víricas para la salida nuclear (etapa 5). Por lo tanto, la salida nuclear eficiente depende de un NEC central funcional, del reclutamiento de actividades cinasa de fosforilación de laminas y de la formación de LDA.

FIG. 4: Alineación de la secuencia proteica de homólogos de pUL50 y pUL53 en el contexto de la invención. Usando el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) de AlignX (componente de Vector NTI Advance 9.1.0; Invitrogen), se realizaron alineaciones múltiples de las secuencias de aminoácidos completas de los homólogos pUL53 (FIG. 4 A) y pUL50 (FIG. 4 B) de herpesvirus humanos (virus del herpes simple de tipo 1 y 2, HSV-1/-2; virus de la varicela zóster, VZV; citomegalovirus humano, HCMV; variante A y B del herpesvirus humano 6, HHV-6A/B; herpesvirus humano 7, HHV-7; virus de Epstein-Barr, EBV; y herpesvirus humano 8, HHV-8) y herpesvirus animales (virus de la pseudorabia, PrV y citomegalovirus de ratón, MCMV). Las secuencias se seleccionaron de UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org/>). Esquema de colores de la alineación de la FIG. 4 - rojo sobre amarillo, restos idénticos en todas las secuencias analizadas; negro sobre verde, restos idénticos en todas las secuencias de los herpesvirus humanos; negro sobre cian, restos idénticos en todas las secuencias de los betaherpesvirus (HCMV, HHV-6A/B, HHV-7 y MCMV). Las secuencias de la estructura de gancho en homólogos de pUL53 y las regiones conservadas identificadas anteriormente dentro de homólogos de pUL53 (CR1 a CR4) y pUL50 (CR1 y CR2) (Lötzerich *et al.*, 2006; Milbradt *et al.*, 2012) se representan sobre la alineación de secuencias en forma de barras de color rojo y negro, respectivamente. Los restos de pUL50 y pUL53 que interactúan con la otra proteína están marcados con #; los restos de pUL53 que constituyen un dedo de cinc están marcados con \*. Se observa que casi todos los restos de la superficie de interacción se encuentran dentro de las regiones conservadas (pUL53, sólo CR1; pUL50, CR1 y CR2); los restos del dedo de cinc (Cys106, Cys122, Cys125, His211) están estrictamente conservados entre las secuencias de pUL53.

FIG. 4 A: homólogos de pUL53 - UL31 de la cepa 17 del HSV-1 (número de referencia P10215), UL31 de la cepa HG52 del HSV-2 (P89454), ORF27 de la cepa Dumas del VZV (P09283), pUL53 de la cepa AD169 del HCMV (P16794), U37 de la cepa Uganda del HHV-6A (P28865), U37 de la cepa HST del HHV-6B

(Q9WT27), U37 de la cepa JI del HHV-7 (P52361), BFLF2 de la cepa B95-8 del EBV (P0CK47), ORF67 de la cepa GK18 del HHV-8 (F5H982), UL34 de la cepa Kaplan del PrV (Q911V7) y pM53 del HCMV (H2A291).

5 FIG 4 B: homólogos de pUL50 - UL34 de la cepa 17 del HSV-1 (P10218), UL34 de la cepa HG52 del HSV-2 (P89457), ORF24 de la cepa Dumas del VZV (P09280), pUL50 de la cepa AD169 del HCMV (P16791), U34 de la cepa Uganda del HHV-6A (P52465), U34 de la cepa Z29 del HHV-6B (Q9QJ35), U34 de la cepa JI del HHV-7 (P52466), BFRF1 de la cepa B95-8 del EBV (P03185), ORF67 de la cepa GK18 del HHV-8 (Q76RF3), UL34 de la cepa Kaplan del PrV (Q9ICS7) y pM50 del HCMV (H2A365).

10 FIG. 5: Cromatografía analítica de exclusión por tamaño que ilustra la oligomerización de pUL50 (1-181) y pUL53 (50-292). Las construcciones se analizaron usando una columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare). pUL50 (1-181) producida de forma singular (véase el pico más alto en el centro de la FIG. 5) - se determinó que pUL50 era monomérica en solución, con un peso molecular (MW) de 20,3 kDa, de acuerdo con su MW calculado de 20,3 kDa. pUL53 (50-292) producida de forma singular (véase los dos picos más pequeños en la FIG. 5) - pUL53 mostró dos picos distintos en el cromatograma: un pico posterior a un MW de 55,6 kDa, coherente con el MW del homodímero de pUL53 (50-292) (MW calculado de 56,8 kDa) y un pico anterior que eluye en el volumen vacío de la columna que representa estados oligoméricos superiores. pUL50 (1-181) y pUL53 (50-292) coproducidas (véase la línea continua de color negro con un pico de altura intermedia en el centro de la FIG. 5) - cuando se coprodujeron y se copurificaron a partir de *E. coli*, ambas proteínas eluyeron en forma de un heterodímero con un MW de 48,1 kDa (MW calculado 48,7 kDa). pUL50 (1-181) y pUL53 (50-292) mezcladas (véase la línea discontinua de color negro con tres picos en la FIG. 5) - cuando se produjeron y purificaron por separado, después se mezclaron *in vitro*, el perfil de elución mostró tres picos distintos: el pico más temprano es coherente con el estado oligomérico superior de pUL53 (50-292) que eluye en el volumen vacío, el pico central es idéntico a pUL50-pUL53 heterodimérico cuando se coproduce y copurifica, el pico tardío es coherente con pUL50 monomérica (1-181). El comportamiento de pUL50 y pUL53 descrito en el presente documento refleja fielmente el comportamiento observado por Sam *et al.* (38).

30 FIG. 6: Ilustración esquemática del NEC multimérico del HCMV.

FIG. 7: Análisis de la expresión de las proteínas del NEC central del HCMV, el MCMV, el EBV y el VZV. Se cotransfectaron transitoriamente células 293T con construcciones que codificaban pUL50 marcada con HA, pM50, BFRF1, Orf24 o pUL53 marcada con Flag, pM53, BFLF2 y Orf27 con las concentraciones indicadas (1, 2 o 3 µg por construcción) en la combinación respectiva, o con pDsRed1-N1 (RFP) como control. Tres días después de la transfección, las células se recogieron y se lisaron. Las muestras se sometieron a análisis por transferencia Western convencional usando anticuerpos monoclonales específicos del marcador o de la proteína, según se indica.

40 FIG. 8: Análisis de la interacción de las proteínas del NEC central β-herpesvíricas. Se transfectaron transitoriamente células 293T con construcciones que codificaban pUL50 marcada con HA, pM50 o pUL27 (control negativo) en combinación con pUL53 o pM53. Tres días después de la transfección, las células se lisaron y las proteínas marcadas con HA se precipitaron usando pAb-HA o un fragmento Fc de anticuerpo de conejo como control de especificidad. Los controles de lisado tomados antes de las muestras de IP y CoIP se sometieron a análisis por transferencia Western convencional usando anticuerpos específicos de marcador, según se indica.

FIG. 9: Elementos estructurales de pUL53, estructura cristalina del NEC central del HCMV y composición esquemática de las construcciones de intercambio de dominios. (A) Ilustración de la pUL53 del HCMV con elementos estructurales, las regiones conservadas y dominios funcionales. Los aminoácidos 50-84 (recuadro discontinuo) de pUL53 son necesarios para la interacción con pUL50 y forman la estructura de gancho (Sam *et al.*, 2009). La porción principal del dominio globular (recuadro de color negro) se ubica en la parte central de pUL53 y contiene cuatro regiones conservadas (CR1-4) (modificado de Milbradt *et al.*, 2012). (B) Estructura cristalina del heterodímero pUL50-pUL53. pUL50 se muestra en rojo y pUL53 en azul. La extensión N-terminal de tipo gancho de pUL53 se representa adicionalmente en una vista girada 90° (modificado de Walzer *et al.*, 2015). (C) Representación esquemática de las construcciones de intercambio de dominios generadas entre pUL53 (azul) y BFLF2 (verde). Los números representan las posiciones de aminoácidos.

60 FIG. 10: Patrón de expresión de las construcciones de intercambio de dominios generadas. (A-C) Se transfectaron transitoriamente células 293T con construcciones de intercambio de dominios. Se cotransfectaron proteínas del NEC central (B) pUL50-HA o (C) BFRF1-HA. La especificidad de las transfecciones se aseguró mediante (A y B) pUL53-Flag o (C) BFLF2-Flag. Dos días después de la transfección, las células se recogieron y se lisaron. Las muestras se sometieron a análisis por transferencia Western convencional usando pAb-Flag.

- FIG. 11: Reclutamiento de pUL97 por las proteínas del NEC central herpesvíticas. Se transfectaron transitoriamente células 293T con pUL50 marcada con HA, pM50, BFRF1, Orf24; pUL53 marcada con Flag, pM53, BFLF2, Orf27; pUL97 o RFP (control negativo). Tres días después de la transfección, las células se lisaron y para el reensamblaje los lisados se mezclaron y se incubaron a 4° durante la noche (B). Las proteínas marcadas con HA o Flag se inmunoprecipitaron usando mAb-HA o mAb-Flag y se incubaron con el lisado pUL97 durante 3 h. Los controles de lisado tomados antes de las muestras de IP y ColP se sometieron a análisis por transferencia Western convencional usando anticuerpos específicos de marcador y de proteína, según se indica.
- FIG. 12: Comparación de la interfaz gancho en surco. Las dos estructuras de las proteínas del NEC del HCMV y el EBV se obtuvieron usando versiones de polipéptidos de fusión de proteínas del NEC del HCMV acortadas y de proteínas del NEC del EBV, respectivamente.
- Figura 13: Perfiles de energía calculados de la interacción de gancho en surco. El gráfico muestra la pérdida de energía de unión resultante de un reemplazo de restos de gancho individuales por alanina (los valores positivos grandes indican restos de gancho que son importantes para la interacción de surco). Se realizaron cálculos para tres alfa-herpesvirus (PRV, HSV-1 y VZV), el gamma-herpesvirus EBV y el beta-herpesvirus HCMV. La numeración de secuencia debajo de la alineación se refiere a pUL53 del HCMV.
- Figura 14: Comparación de secuencia del gancho compartido diseñado con los ganchos de tipo silvestre de la pUL53 del HCMV y la BFLF2 del EBV.
- Figura 15: Análisis por coimmunoprecipitación con el péptido de gancho pUL53 en tres tampones diferentes
- Figura 16: (A) Modelos estructurales del gancho compartido (naranja) en complejo con pUL50 del HCMV (izquierda) y BFRF1 del EBV (derecha). (B) Dos vistas diferentes del pUL50 del HCMV que indican el grado de conservación de la superficie entre los homólogos de pUL50 herpesvíticos. Las estructuras se muestran en una representación de relleno espacial con las regiones conservadas y no conservadas resaltadas en rojo y azul, respectivamente. Los restos más conservados implicados en la unión de pUL53 están marcados.
- Figura 17: Representación en cinta de pUL50 del HCMV (mismo código de colores que en la Figura 16). Los restos más conservados implicados en la unión de pUL53 se muestran como barras.
- Figura 18: A) Interacción de las proteínas del NEC del Herpesvirus solubles. Izquierda: Interacción pUL50-pUL53 del HCMV; Derecha: Interacción BFRF1-BFLF2 del EBV. B) Diseño de péptidos gancho de NEC del Herpesvirus basados en las estructuras cristalinas del complejo pUL50-pUL53 del HCMV (izquierda) y BFRF1 del EBV fusionado a la región gancho de BFLF2 (derecha). C) Inhibición de las interacciones pUL50-pUL53 del HCMV (izquierda) y BFRF1-BFLF2 del EBV (derecha) por péptidos y proteínas gancho tanto del HCMV como del EBV.

### Descripción detallada de la invención

Las cápsides de los herpesvirus se ensamblan generalmente en el núcleo de las células infectadas, mientras que la maduración final tiene lugar en el citosol circundante. Por ende, para acceder al compartimento de maduración final, es decir, el citoplasma, las cápsides intranucleares preformadas tienen que atravesar la envoltura nuclear como barrera. Esto se realiza por gemación en la membrana nuclear interna, formando de este modo una partícula envuelta primaria que reside en la hendidura perinuclear. Como se ha indicado anteriormente, un complejo heterodimérico de dos proteínas altamente conservadas entre los *Herpesviridae* impulsa la formación de envolturas primarias. Por ejemplo, en el caso del virus del herpes simple, estas proteínas que forman el NEC central se designan en la nomenclatura común como pUL34, una proteína transmembrana anclada a la cola ubicada en la envoltura nuclear, y pUL31.

El complejo de salida nuclear (NEC) recluta cinasas víricas y celulares para ablandar la lámina nuclear y para permitir el acceso de las cápsides empaquetadas con ADN a la membrana nuclear interna.

Aún no se conoce en detalle cómo se reclutan las cápsides en el sitio de gemación y en la partícula vírica primaria. La fusión de la envoltura primaria con la membrana nuclear externa entonces da como resultado la translocación de la cápside al citosol. Cabe señalar que dicha fusión es distinta de la fusión durante la entrada infecciosa de viriones libres en las células diana, concretamente en que dicha entrada infecciosa no requiere la maquinaria de fusión del herpesvirus central esencial altamente conservada. Por lo tanto, la salida nuclear puede reconocerse como un transporte de carga (cápsides) mediado por vesículas (envoltura primaria) a través de la envoltura nuclear.

Se determinaron las estructuras cristalinas detalladas de las proteínas heterodiméricas del EBV BFRF1 y BFLF2 (SEQ ID NO: 3 y 4), de las proteínas heterodiméricas del VZV ORF24 y ORF27 (SEQ ID NO: 5 y 6) y del heterodímero pUL50-pUL53 del HCMV (SEQ ID NO: 1 y 2), y formas truncadas de los mismos, respectivamente. Se observó que

las proteínas adoptan un pliegue globular con elementos de estructura secundaria  $\alpha$  y  $\beta$  mixtos (véanse las FIG. 1, 2 y, en particular, la FIG 12).

Anteriormente se describió que las características específicas de pUL53 de un sitio de unión a cinc y una extensión N-terminal de tipo gancho de 29 aa específicos (44) son un elemento estructural esencial de la interacción pUL50-pUL53 en el HCMV. La estructura de pUL50 se asemeja en general a la estructura de RMN recientemente publicada del homólogo pM50 del citomegalovirus murino, pero, de forma sorprendente e inesperada, los inventores descubrieron un reposicionamiento considerable de la hélice  $\alpha$  del extremo C-terminal de pUL50 al unirse a pUL53. Se descubrió que pUL53 mostraba un parecido estructural con el dominio GHKL de las cinasas de histidina sensoriales bacterianas (véase la FIG. 2 A).

Un examen más detallado de la estructura cristalina indicó el ensamblaje parcial de los heterodímeros pUL50-pUL53 en estructuras hexaméricas de tipo anillo (véase la FIG. 2 C), que se sugiere que proporcionan oportunidades de formación de armazón adicionales para construir complejos de salida nuclear.

Después de esto, los inventores combinaron la información estructural divulgada en el presente documento sobre las proteínas del NEC central pUL50-pUL53 y obtuvieron una comprensión más detallada del mecanismo del NEC en *Herpesviridae* en general, y en particular para las especies HHV-1 a HHV-8, MCMV y/o PrV, para betaherpesvirus tales como HCMV, HHV-6, HHV-7, o para el gammaherpesvirus EBV, o similares.

Se concluyó que el mecanismo de acción basado en la estructura de gancho en surco representa una diana única para el desarrollo de métodos de cribado novedosos, lo que podría dar como resultado tipos novedosos de fármacos antivíricos más eficientes.

En el presente documento se proporcionan nuevas proteínas de fusión, que proporcionan una resolución de la estructura cristalina aún mejor. Estas proteínas se muestran en las SEQ ID NO: 1 a 6. Siempre que se haga referencia a polipéptidos de acuerdo con la presente invención, se incluirán estas secuencias y homólogas de las mismas. Estas proteínas pueden usarse en ensayos o métodos de identificación y análisis de moléculas que interactúan con/inhiben/modulan las proteínas del NEC. Específicamente, durante su interacción/heterodimerización se descubrió una estructura de gancho en surco (véase la FIG. 12), que existe como mecanismo conservado entre los *Herpesviridae* (véase la FIG. 4) y probablemente desempeña una función en la salida nuclear de los virus. Esta característica conduce a opciones mejoradas de terapia antiherpesvítica de amplio espectro mediante la búsqueda de agentes antivíricos novedosos. Se descubrió una estructura similar para las proteínas del NEC del HCMV y el EBV como se muestra en la Figura 12.

Adicionalmente, se descubrió que cuatro fosfo-sitios específicos basados en aa de la proteína pUL50 están posicionados fuera de la región de interacción de pUL50 y pUL53 (véase la FIG. 4), y que son decisivos para desencadenar la fosforilación durante las heterodimerizaciones/multimerizaciones del NEC y, por lo tanto, están implicados en la maduración del virión a través de la salida nuclear.

De acuerdo con la presente invención, esto también puede conducir a opciones mejoradas de terapia antiherpesvítica de amplio espectro mediante el hallazgo de agentes antivíricos novedosos que se unan a/ interactúen con/antagonicen o bloqueen/enmascaren/protejan el fosfo-sitio o fosfo-sitios identificados, ya sean solos o en combinación, para afectar a/impedir/inhibir la fosforilación durante las heterodimerizaciones/multimerizaciones del NEC. Dicha terapia basada en fosfo-sitios específicos puede ser una estrategia antivírica de segunda línea a las estructuras de gancho en surco mencionadas anteriormente, o puede combinarse con ellas (véanse más detalles a continuación).

#### Métodos de cribado para agentes inhibidores del mecanismo de gancho en surco de pUL50-pUL53 y/o BFRF1-BFLF2 del EBV y/u ORF24-ORF27 del VZV

El método puede incluir las tres etapas siguientes:

- (i) opcionalmente marcar una proteína/péptido y/o su diana (por ejemplo, proteína, fragmento de proteína, ácido nucleico, péptido, fragmento de péptido y molécula de señalización, pero sin limitación) en uno o más sitios con, por ejemplo, un isótopo de flúor, pero sin limitación (es decir, intercambiando uno o más aminoácidos naturales por aminoácidos sustituidos con flúor);
- (ii) proporcionar un sistema de reacción que comprende

- (a) la proteína/péptido o fragmento de proteína/fragmento de péptido,
- (b) uno o más compuestos candidatos (es decir, moléculas pequeñas de unión/de interacción/antagonistas potenciales), y
- (c) la diana de unión de proteína/péptido (por ejemplo, proteína, fragmento de proteína, péptido, fragmento de péptido, ácido nucleico y/o molécula de señalización, pero sin limitación),

donde al menos la proteína/péptido, al menos la diana o ambas, la proteína/péptido y la diana, están opcionalmente marcadas con el isótopo de flúor; y

(iii) controlar la interacción de la proteína/péptido con su diana de unión usando los cambios en una señal (por ejemplo, perturbación del desplazamiento químico, forma de la línea y relajación de la señal),

y donde un nivel de unión reducido en presencia del compuesto candidato en relación con un nivel de unión de control es indicativo de la actividad moduladora/inhibidora del compuesto en la supresión de la formación/heterodimerización proteína-proteína.

En esta fase de los métodos de cribado divulgados, su diana (por ejemplo, el "gancho" o "gancho en surco" de pUL53) puede prepararse mediante una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Los ejemplos incluyen expresiones de proteínas en células *Escherichia coli* que contienen un plásmido codificado con dicha proteína.

Las dianas peptídicas de la invención no se limitan particularmente al propio péptido, sino que también puede comprender fragmentos del mismo siempre que interactúe/se una con, por ejemplo, la molécula pequeña que se ha de someter a ensayo en los métodos de cribado de la presente invención.

Como estrategia de segunda línea, que puede combinarse con los hallazgos de la estructura cristalina del NEC central de pUL50 y pUL53 y/o BFRF1-BFLF2 (u homólogos del NEC derivados de otros herpesvirus) como se divulga en el presente documento, otro hallazgo clave de la invención es la detección de fosfo-sitios específicos basados en aa de pUL50 que están posicionados fuera de la región de interacción de pUL50-pUL53 y/o BFRF1-BFLF2 del EBV, pero son decisivos para la fosforilación durante los mecanismos basados en NEC, es decir, la multimerización de NEC, y por lo tanto proporcionan otra diana novedosa de acuerdo con la presente invención.

A este respecto, los inventores prevén enmascarar, bloquear o proteger dichos fosfo-sitios específicos basados en aa mediante agentes/compuestos/moléculas pequeñas que se han de identificar mediante los métodos/ensayos de cribado respectivos divulgados en el presente documento para afectar a/modular/inhibir los fosfo-sitios ya sea solos o en combinación para influir en la estructura y/o función de la multimerización del NEC vírico dentro del grupo de los *Herpesviridae*, por ejemplo, en especies seleccionadas de un grupo HHV-1 a HHV-8, MCMV o PrV, para los betaherpesvirus, o para los gammaherpesvirus, tales como EBV o similares. Esto también puede aprovecharse en estrategias antivíricas novedosas.

En consecuencia, la invención se refiere además en general a métodos de cribado para identificar moléculas pequeñas que inhiben la formación del heterodímero de NEC pUL50-pUL53 y/o BFRF1-BFLF2 del EBV y/u ORF24 y ORF27 del VZV, ya sea basándose en

- i) la inhibición estérica de la interacción/heterodimerización pUL50-pUL53 y/o BFRF1-BFLF2 del EBV y/u ORF24 y ORF27 y/o
- ii) la inhibición de la proteína cinasa para abordar el aspecto de la fosforilación durante la multimerización del NEC y/o
- iii) enmascarar/protger/bloquear de los fosfo-sitios específicos de pUL50 y/o BFRF1 del EBV ORF24 y ORF27, ya sea solos o en combinaciones de los mismos (véase más adelante).

En realizaciones específicas de la invención, los inventores aplicaron dos métodos de cribado, que permiten medir la interacción pUL50-pUL53 y/o BFRF1-BFLF2 del EBV y/u ORF24 y ORF27 en células humanas cultivadas.

#### I) Método basado en microscopía confocal

En un primer aspecto de dichos métodos de cribado se aplica un método basado en microscopía confocal, que comprende las siguientes etapas:

a) se produce un heterodímero de BFRF1 y BFLF2 (SEQ ID NO: 3 o 4), y/u ORF24 y ORF27 (SEQ ID NO: 5 o 6), del EBV y VZV, respectivamente, y/o el heterodímero pUL50-pUL53 del HCMV (SEQ ID NO: 1 y 2), mediante la cotransfección de dos construcciones de expresión para estas dos proteínas, o bien

- a1) en ausencia de infección por EBV, VZV y/o HCMV, o
- a2) en células primarias humanas infectadas por EBV, VZV y/o HCMV, preferentemente fibroblastos humanos (HFF) u otras células permisivas al HCMV que se han de examinar,

b) le sigue una doble tinción de dichas proteínas mediante inmunofluorescencia indirecta o técnicas comparables, lo que permite determinar la formación de los heterodímeros BFRF1-BFLF2 del EBV y/u ORF24-ORF27 del VZV y/o pUL50-pUL53 del HCMV en el borde nuclear (es decir, colocalización anular de las dos proteínas).

#### II) Método basado en coimmunoprecipitación

En un segundo aspecto, puede usarse un método basado en coimmunoprecipitación para la detección de las interacciones BFRF1-BFLF2 y/u ORF24-ORF27 y/o pUL50-pUL53 (44). Este método se adapta para investigar el bloqueo de la interacción de las dos proteínas mediante la incubación de NEC con las moléculas pequeñas sometidas

a ensayo en solución. La prueba de la interacción BFRF1-BFLF2 y/u ORF24-ORF27 y/o pUL50-pUL53 y/o su inhibición tiene lugar preferentemente de forma no radiactiva. En una realización alternativa de la invención, la detección de la interacción BFRF1-BFLF2 y/u ORF24-ORF27 y/o pUL50-pUL53 se realiza de una manera más sensible por medio de proteínas marcadas radioactivamente en transferencias Western o autorradiogramas. Se puede realizar una cuantificación de las señales mediante densitometría.

#### Cribado de agentes

El cribado de agentes en el contexto de la invención identifica agentes que modulan/inhiben la función y/o la estructura de los polipéptidos/proteínas BFRF1 y/o BFLF2 del EBV y/o los polipéptidos/proteínas ORF24 y/u ORF27 del VZV y/o los polipéptidos/proteínas pUL50 y/o pUL53 del HCMV. De particular interés son los ensayos de cribado de agentes que tienen una baja toxicidad para las células humanas.

La presente invención proporciona nuevas proteínas de fusión que comprenden pUL50 y pUL53 (en las secuencias fusionadas de las SEQ ID NO. 1 y 2), BFRF1 y BFLF2 (en las secuencias fusionadas de las SEQ ID NO. 3 y 4) y/u ORF24-ORF27 (en las secuencias fusionadas de las SEQ ID NO. 5 y 6), u homólogos de las mismas. Los restos de aminoácidos que componen las respectivas subunidades del NEC se mencionan explícitamente en las siguientes realizaciones. Las dos subunidades de las proteínas de fusión pueden estar unidas por una secuencia enlazadora adecuada, por ejemplo, como se representa en el listado de secuencias. Los homólogos funcionales de las proteínas de fusión son aquellos susceptibles de heterodimerizarse con su proteína compañera del NEC afin, por ejemplo, los homólogos funcionales de pUL50 y/o pUL53 deben ser capaces de formar un dímero de estabilidad suficiente para usarlos en los métodos de cribado descritos en el presente documento, en donde una estabilidad suficiente significa que forman un heterodímero que es al menos un 50 % tan estable (no se disocia) como las nuevas proteínas de fusión descritas en el presente documento en condiciones de ensayo idénticas. Se conocen en la técnica ensayos para la determinación de la estabilidad/fuerza de las interacciones proteína-proteína. Como se usa en el presente documento, la expresión "homólogo de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento" significa que dicho polipéptido es un "homólogo funcional". El término "funcional" no significa necesariamente que las proteínas serían funcionales en condiciones *in vivo*, es decir, que actúan como proteínas del NEC que permiten la maduración de los viriones. Los homólogos funcionales son, sin embargo, al menos adecuados para determinar la estructura de las proteínas, por ejemplo, los respectivos polipéptidos del heterodímero, y para actuar como matrices o herramientas en la modelización e identificación de compuestos (en métodos por ordenador) que están interactuando con, modulando y/o inhibiendo las proteínas del NEC, en particular en más de un NEC derivado de herpesvirus. Los homólogos de acuerdo con la presente invención también designan polipéptidos derivados de otras cepas víricas de los herpesvirus mencionados anteriormente. Los polipéptidos del NEC de diferentes cepas también pueden diferir de las secuencias mencionadas explícitamente a continuación en el presente documento. Estas diferencias pueden ser el resultado de modificaciones de la secuencia de ácido nucleico que codifica estos polipéptidos, de manera que uno o más restos de aminoácidos pueden ser diferentes de las secuencias divulgadas en el presente documento. Estas modificaciones pueden ser supresiones, adiciones, sustituciones, inversiones, etcétera, siempre que deriven de polipéptidos de NEC de herpesvirus. Con respecto a las secuencias divulgadas en el presente documentos, en particular las secuencias de las SEQ ID NO: 1 a 6, las modificaciones pueden dar como resultado secuencias peptídicas que son ligeramente diferentes de las mencionadas anteriormente, es decir, pueden ser al menos un 20 % diferentes, o al menos un 15 % diferentes, o al menos un 10 % diferentes, o al menos un 9 % diferentes, o al menos un 8 % diferentes, o al menos un 7 % diferentes, o al menos un 6 % diferentes, o al menos un 5 % diferentes, o al menos un 4 % diferentes, o al menos un 3 % diferentes, o al menos un 2 % diferentes, o al menos un 1 % diferentes, a condición de que codifiquen polipéptidos (derivados) del NEC que sean susceptibles de heterodimerizarse. Por lo tanto, siempre que se haga referencia a homólogos de las secuencias de acuerdo con la presente invención, también se entienden las secuencias modificadas como se ha explicado anteriormente.

Los aminoácidos enlazadores pueden ser, por ejemplo, secuencias de aminoácidos ricas en glicina que comprendan de 3 a 12 aminoácidos.

Como bien sabe el experto en la materia, puede usarse una amplia diversidad de ensayos con este fin, como, por ejemplo, ensayos de unión de un agente/compuesto candidato a una proteína diana, fragmento de proteína diana, polipéptido diana, péptido diana, fragmento de péptido diana y determinar/detectar el efecto de dicho agente candidato/compuesto sometido a ensayo sobre la replicación de virus seleccionados de un grupo de los *Herpesviridae*, tal como entre las especies HHV-1 a HHV-8, MCMV y/o PrV, pero sin limitación, determinar/detectar el efecto sobre la especificidad tisular, o determinar/detectar cambios funcionales y/o estructurales de la diana o sus interacciones con otra proteína o proteínas, fragmento o fragmentos de proteína, polipéptido o polipéptidos, péptido o péptidos, fragmento o fragmentos peptídicos y similares.

Los agentes/compuestos candidatos pueden someterse a ensayo para determinar su eficacia inhibidora de la replicación vírica, para determinar la eficacia inhibidora de impedir la exportación de la cápside vírica empaquetada con ADN del núcleo al citoplasma (es decir, la salida nuclear) de un virus, inducir la templanza de la infección vírica, para prevenir la infección en general, y para prevenir la maduración del virión en general, por ejemplo, en betaherpevirus, pero sin limitación.

En el contexto de la invención, para el experto en la materia es fácilmente evidente que el cribado de agentes/compuestos se extiende particularmente al cribado de agentes/compuestos putativos que son útiles en agentes antivíricos de amplio espectro dentro del grupo de los *Herpesviridae* y, específicamente, entre las especies HHV-1 a HHV-8, MCMV y/o PrV, pero sin limitación, basándose en su alto grado de homología con respecto al motivo diana peptídico de las SEQ ID NO: 1 a 6 de la invención.

Para el experto en la materia, es evidente que la estructura de gancho N-terminal de la proteína pUL53 (SEQ ID NO: 7) que se divulga en el presente documento está muy conservada entre las especies HHV-1 a HHV-8, MCMV y/o PrV, pero sin limitación, a la vista de sus respectivos motivos peptídicos diana de cepas específicas de los mismos representados en la FIG. 4 y mostrados en las respectivas secuencias.

Por ende, es razonable para el experto, a la vista de toda la divulgación de la invención, cribar agentes/compuestos candidatos que afecten a/inhiban la interacción/heterodimerización del centro del NEC de las proteínas BFRF1 y BFLF2 y/o de las proteínas ORF24 y ORF27 y/o de las proteínas pUL50 y pUL53 representadas en el listado de secuencias u otros homólogos herpesvíricos, como se divulga en el presente documento.

En consecuencia, en el contexto de la invención, el cribado de agentes/compuestos que afectan a/inhiben cualquiera de los componentes de los heterodímeros que comprenden BFRF1 y BFLF2 y/u ORF24 y ORF27 y/o pUL50 o pUL53 solos o su respectiva interacción/heterodimerización pueden realizarse usando un modelo *in vitro* o un modelo *in vivo*, o una célula permisiva para o infectada con un virus seleccionado de un grupo de *Herpesviridae*, en particular entre las especies HHV-1 a HHV-8 de los betaherpesvirus o gammaherpesvirus (tales como el EBV), y el PrV, pero sin limitación, estando dicha célula opcionalmente mutada adicionalmente, o un panel de células permisivas para dicho virus o infectadas con dicho virus seleccionado de un grupo de *Herpesviridae*, en particular entre las especies HHV-1 a HHV-8 y/o PrV, en particular entre los betaherpesvirus, pero sin limitación, estando dicha célula opcionalmente mutada adicionalmente, o basándose en proteínas purificadas, fragmentos de proteína, péptidos, fragmentos de péptido correspondientes a las proteínas del NEC de herpesvirus mencionadas anteriormente, solos o en combinación, o correspondientes a homólogos de los mismos, o basándose en la región gancho N-terminal purificada que abarca los aa 59-87 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 o cualquier homólogo de la misma, de acuerdo con cualquier método adecuado evidente para el experto en la materia. En general, el experto en la materia sabe cómo identificar, por ejemplo, ligandos, agentes, moléculas pequeñas o sustratos que se unen a, modulan, inhiben o imitan la interacción de BFRF1 y/o BFLF2 y/u ORF24 y/u ORF27 y/o pUL50 y/o pUL53 u homólogos respectivos de las mismas.

Cuando el método/ensayo de cribado sea un ensayo de unión, una o más de las moléculas pueden estar unidas a un marcador, donde el marcador puede proporcionar directa o indirectamente una señal detectable. Diversos marcadores incluyen, pero sin limitación, radioisótopos, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, enzimas, péptidos, moléculas de unión específicas, partículas, por ejemplo, partículas magnéticas y similares.

Las moléculas de unión específicas incluyen, pero sin limitación, pares, tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. Para los miembros de unión específicos, el miembro complementario normalmente se marcaría con una molécula que permita la detección, de acuerdo con procedimientos conocidos.

El experto en la materia es consciente de que puede incluirse una diversidad de otros reactivos en los métodos/ensayos de cribado de la presente invención para someter a ensayo agentes/compuestos/moléculas pequeñas frente a los mecanismos divulgados en el presente documento y/o frente al bloqueo/enmascaramiento/protección de uno o más fosfo-sitios específicos como se divulgan en el presente documento, por ejemplo, en los betaherpesvirus, y/o en el gammaherpesvirus EBV.

Éstos incluyen, a modo de ejemplo, reactivos como sales, proteínas neutras, por ejemplo, albúmina, detergentes, etc. que se usan para facilitar la unión óptima proteína-proteína o proteína-péptido o péptido-anticuerpo y/o reducir las interacciones inespecíficas o de fondo. Pueden usarse reactivos que mejoren la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos, etc. La mezcla de componentes se añade en cualquier orden que proporcione la unión requerida. Se realizan incubaciones a cualquier temperatura adecuada, normalmente entre 4 y 40 °C, pero sin limitación. Los periodos de incubación se seleccionan para una actividad óptima, pero también pueden optimizarse para facilitar un cribado rápido de alto rendimiento. Normalmente, entre 0,01 y 24 horas será suficiente, pero sin limitación.

Los cribados preliminares pueden realizarse mediante el cribado de compuestos/agentes capaces de unirse a BFRF1 y/o BFLF2 y/u ORF24 y ORF27 y/o pUL50 y/o pUL53 ya sea solos o en combinación, o basándose en el bloqueo/enmascaramiento/protección de uno o más fosfo-sitios específicos como se divulgan en el presente documento. Los ensayos de unión por lo general implican el contacto con BFRF1 y/o BFLF2 y/u ORF24 y ORF27 y/o pUL50 y/o pUL53, solos o en combinación, como se divulga en el presente documento, con uno o más compuestos de ensayo y dejando tiempo suficiente para que la proteína/péptido o un fragmento del mismo y los compuestos de ensayo formen un complejo de unión. Los complejos de unión formados pueden detectarse mediante una serie de técnicas analíticas establecidas. Los ensayos de unión de proteínas/péptidos incluyen, pero sin limitación, métodos que miden la coprecipitación, la comigración en geles de SDS-poliacrilamida no desnaturalizantes y la comigración en transferencias Western (véase, por ejemplo, Bennet, J. P. y Yamamura, H. I. (1985) "*Neurotransmitter, Hormone or*

*Drug Receptor Binding Methods*, " en *Neurotransmitter Receptor Binding* (Yamamura, H. I., *et al.*, eds.), págs. 61-89).

#### Agentes que se han de someter a ensayo en el contexto de la invención

5 Los términos "agente", "moléculas pequeñas", "compuesto o compuestos que se han de someter a ensayo" o expresiones similares utilizadas en el presente documento describen cualquier molécula, por ejemplo, proteína, péptido o fármaco, con capacidad de alteración, inhibir o imitar la función fisiológica de un polipéptido/proteína BFRF1 y/o BFLF2 del EBV y/o un polipéptido/proteína ORF24 y ORF27 del VZV y/o un polipéptido/proteína pUL50 y/o pUL53 del HCMV. Generalmente, una pluralidad de mezclas de ensayo se ejecutan en paralelo con diferentes  
10 concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones para modular o inhibir la interacción polipéptido/proteína BFRF1 y/o BFLF2 del EBV y/o polipéptido/proteína ORF24 y ORF27 del VZV y/o pUL50-pUL53 ya sea *in vitro* o *in vivo*. Normalmente, una de estas concentraciones sirve como un control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

15 Los agentes candidatos en el contexto de la presente invención abarcan numerosas clases químicas, bioquímicas y biológicas, aunque preferentemente son moléculas orgánicas o moléculas inorgánicas, más preferentemente compuestos orgánicos pequeños o moléculas inorgánicas pequeñas que tienen un peso molecular de más de 10 y menos de aproximadamente 2.500 Dalton, preferentemente más de 50 y menos de 1.500 Dalton de peso molecular, más preferentemente más de 50 y menos de 1.000 Dalton de peso molecular, incluso más preferentemente más de  
20 50 y menos de 800 Dalton de peso molecular.

Los agentes candidatos en el contexto de la invención pueden comprender además grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, péptidos, es decir, particularmente enlaces de hidrógeno, y preferentemente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, más preferentemente al menos  
25 dos de los grupos químicos funcionales, pero sin limitación. Los agentes candidatos de la presente invención pueden comprender además estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos dentro del contexto de la invención también pueden encontrarse entre biomoléculas incluyendo biomoléculas diseñadas por ordenador, biomoléculas sintetizadas, proteínas, péptidos, polipéptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas,  
30 derivados de los mismos, y análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

En el contexto de la invención, los agentes candidatos han de obtenerse de una amplia diversidad de fuentes, incluyendo bibliotecas diseñadas por ordenador, bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, el experto en la materia es consciente de que existen numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una  
35 amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, hay disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos de bacterias, hongos, plantas y animales. Adicionalmente, las bibliotecas naturales o producidas sintéticamente y los compuestos se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc. para producir análogos estructurales.

Los agentes de ensayo, en el contexto de la invención, pueden obtenerse de bibliotecas, tales como bibliotecas de productos naturales o bibliotecas combinatorias, por ejemplo. Se han descrito diferentes tipos de bibliotecas  
45 combinatorias y métodos para preparar dichas bibliotecas, incluyendo, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 93/06121, WO 95/12608, WO 95/35503, WO 94/08051 y WO 95/30642.

En caso de que los agentes/compuestos/moléculas pequeñas sometidos a ensayo sean determinados péptidos o polipéptidos, así como ácidos nucleicos que, en virtud de la degeneración del código genético, no idénticos en secuencia, éstos también incluyen variantes de los mismos. Los polipéptidos variantes pueden incluir sustituciones, adiciones o supresiones de aa. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras de aminoácidos o sustituciones para eliminar aminoácidos no esenciales, tal como para alterar un sitio de glicosilación, un sitio de fosforilación o un sitio de acetilación, o para minimizar el plegamiento erróneo mediante la sustitución o supresión de uno o más restos cisteína que no son necesarios para la función. En el contexto de la invención, pueden  
50 diseñarse variantes que conserven o potencien la actividad biológica inhibidora de una región particular de la proteína pUL50 y/o pUL53 (por ejemplo, un dominio funcional y/o, donde el polipéptido es miembro de una familia de proteínas, una región asociada a una secuencia consenso). Las variantes en el contexto de la invención también incluyen fragmentos de los polipéptidos que se han de someter a ensayo, fragmentos particularmente biológicamente activos (es decir, aquellos que influyen, inhiben o modulan la actividad del NEC y, en consecuencia, la liberación del virus de la célula, la maduración del virus y/o cualquier otra etapa en la producción de virus infecciosos, en particular los *Herpesviridae* descritos en el presente documento) y/o fragmentos correspondientes a dominios funcionales. Los fragmentos de interés tendrán normalmente al menos de aproximadamente 5 aa, 10 aa a al menos de aproximadamente 15 aa de longitud, normalmente al menos de aproximadamente 50 aa de longitud, y pueden tener hasta 300 aa de longitud o más, pero normalmente no superarán aproximadamente 500 aa de longitud, donde el  
65 fragmento tendrá un tramo contiguo de aminoácidos que es idéntico a la secuencia polipeptídica proporcionada.

Agentes de ensayo/compuestos/moléculas pequeñas activas identificadas mediante los métodos/ensayos de cribado descritos en el presente documento que afectan a/modulan/inhiben la actividad de pUL50 y/o pUL53 o de homólogos de las mismas, preferentemente basándose en el mecanismo de tipo gancho divulgado en el presente documento, y/o el crecimiento del herpesvirus, preferentemente el crecimiento del HCMV, pueden servir como compuestos líderes para la síntesis de otros compuestos análogos. Normalmente, los compuestos análogos se sintetizan para que tengan una configuración electrónica y una conformación molecular similar a la del compuesto líder. La identificación de compuestos análogos puede realizarse mediante técnicas tales como el análisis de campo autoconsistente (SCF), el análisis de interacción de configuración (CI) y el análisis de dinámica de modo normal. Existen programas informáticos para aplicar estas técnicas. Véase, por ejemplo, Rein *et al.*, (1989) *Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions* (Alan Liss, Nueva York).

En una realización específica de la invención, los agentes/compuestos/moléculas pequeñas de ensayo son anticuerpos, armazones de IgG, armazones no IgG.

Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es una proteína que incluye uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de regiones constantes kappa, lambda, alfa (IgA), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta (IgD), épsilon (IgE) y mu (IgM), así como los múltiples genes de regiones variables de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina de longitud completa generalmente tienen aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos de longitud. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina de longitud completa generalmente tienen aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos de longitud. Las cadenas ligeras están codificadas por un gen de región variable en el extremo N (de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo C. Las cadenas pesadas están codificadas de forma similar por un gen de región variable (de aproximadamente 116 aminoácidos de longitud) y uno de los otros genes de región constante.

La unidad estructural básica de un anticuerpo generalmente es un tetrámero que consiste en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulinas, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de cadenas ligera y pesada se unen a un antígeno, y las regiones constantes median las funciones efectoras. Las inmunoglobulinas también existen en una diversidad de otras formas, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y (Fab')<sub>2</sub>, así como anticuerpos híbridos bifuncionales y cadenas simples (por ejemplo, Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17:105,1987; Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:5879-5883, 1988; Bird *et al.*, *Science* 242:423-426, 1988; Hood *et al.*, *Immunology*, Benjamin, N.Y., 2.<sup>a</sup> ed., 1984; Hunkapiller y Hood, *Nature* 323:15-16,1986). Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consiste en una región "marco conservada" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (véase, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, E. Kabat *et al.*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., 1983). Como se ha señalado anteriormente, las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Un inmunocomplejo es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano, o fragmento de anticuerpo funcional, específicamente unido al antígeno.

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, normalmente mediante ingeniería genética, a partir de genes de región variable y constante de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos, tales como kappa y gamma 1 o gamma 3. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico terapéutico es por lo tanto una proteína híbrida compuesta por el dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante o efector de un anticuerpo humano, aunque pueden usarse otras especies de mamíferos o la región variable puede producirse mediante técnicas moleculares. Se conocen bien en la técnica métodos para fabricar anticuerpos quiméricos, por ejemplo, véase la Patente de los EE.UU. N.º 5.807.715. Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye una región marco conservada humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (tal como de ratón, rata o de síntesis). El anticuerpo no humano que proporciona las CDR se denomina "donante", y el anticuerpo humano que proporciona el marco se denomina "aceptor". En una realización, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que estén presentes las regiones constantes, pero si las hubiese, pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente un 85-90 %, tal como aproximadamente un 95 % o más idénticas.

Por ende, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. El marco aceptor de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donante. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras adicionales de aminoácidos, que no tienen prácticamente ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de las inmunoglobulinas. Son sustituciones conservadoras de ejemplo aquellas tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg, Phe y Tyr. Las

inmunoglobulinas humanizadas pueden construirse por medio de ingeniería genética (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 5.585.089). Un anticuerpo humano es un anticuerpo en donde los genes de las cadenas ligera y pesada son de origen humano. Pueden generarse anticuerpos humanos usando métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanos pueden producirse inmortalizando una célula B humana que secreta el anticuerpo de interés.

5 La inmortalización puede lograrse, por ejemplo, por infección por EBV o por fusión de una célula B humana con una célula de mieloma o hibridoma para producir una célula de trioma. Los anticuerpos humanos también pueden producirse mediante métodos de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Dower *et al.*, Publicación PCT N.º WO91/17271; McCafferty *et al.*, Publicación PCT N.º WO92/001047; y Winter, Publicación PCT N.º WO92/20791), o pueden seleccionarse de una biblioteca combinatoria de anticuerpos monoclonales humanos (véase el sitio web de

10 Morphosys). Los anticuerpos humanos también pueden prepararse usando animales transgénicos portadores de un gen de inmunoglobulina humana (por ejemplo, documento WO93/12227; documento WO91/10741).

Por lo tanto, el anticuerpo puede tener los formatos conocidos en la técnica. Algunos ejemplos son anticuerpos humanos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con

15 CDR. En una realización preferida, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son anticuerpos producidos de forma recombinante como, por ejemplo, IgG, una inmunoglobulina típica de longitud completa, o fragmentos de anticuerpos que contengan al menos el dominio F-variable de la cadena pesada y/o ligera como, por ejemplo, anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno), incluyendo, pero sin limitación, fragmentos Fab, incluyendo minicuerpos Fab, anticuerpo Fab monocatenario, anticuerpo Fab monovalente con marcadores de

20 epítipo, por ejemplo, Fab-V5Sx2; Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo, formado mediante multimerización con la ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo, mediante la dimerización de los dominios dHLX, por ejemplo, Fab-dHLX-FSx2; fragmentos F(ab')2, fragmentos scFv, fragmentos scFv multivalentes y/o multispecíficos multimerizados, diábolos bivalentes y/o biespecíficos, BiTE® (acoplador de linfocitos T biespecífico), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo, de una clase

25 diferente de G; anticuerpos de un solo dominio, por ejemplo, nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélidos o peces y muchos otros. Además de los anticuerpos, se conocen bien en la técnica otros armazones de biopolímeros para complejar una molécula diana y se han utilizado para la generación de biopolímeros altamente específicos. Algunos ejemplos son los aptámeros, *spiegelmers*, anticalinas y conotoxinas. En una realización preferida, el formato del anticuerpo se selecciona del grupo que comprende fragmento Fv, fragmento scFv, fragmento Fab,

30 fragmento scFab, fragmento (Fab)2 y proteína de fusión scFv-Fc. En otra realización preferida, el formato de anticuerpo se selecciona del grupo que comprende fragmento scFab, fragmento Fab, fragmento scFv y conjugados de biodisponibilidad optimizada de los mismos, tales como fragmentos PEGilados. Uno de los formatos más preferidos es el formato scFab.

De acuerdo con la invención, el aglutinante a las proteínas del NEC u homólogos de las mismas se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, por ejemplo IgG, una inmunoglobulina típica de longitud completa, o fragmentos de anticuerpos que contengan al menos el dominio F-variable de la cadena pesada y/o ligera como, por ejemplo, anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno), incluyendo, pero sin limitación, fragmentos Fab, incluyendo minicuerpos Fab, anticuerpo Fab monocatenario, anticuerpo Fab monovalente con marcadores de

40 epítipo, por ejemplo, Fab-V5Sx2; Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo, formado mediante multimerización con la ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo, mediante la dimerización de los dominios dHLX, por ejemplo, Fab-dHLX-FSx2; fragmentos F(ab')2, fragmentos scFv, fragmentos scFv multivalentes y/o multispecíficos multimerizados, diábolos bivalentes y/o biespecíficos, BiTE® (acoplador de linfocitos T biespecífico), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo, de una clase

45 diferente de G; anticuerpos de un solo dominio, por ejemplo, nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélidos y peces.

Los armazones no IgG pueden ser armazones proteicos y pueden usarse como miméticos de anticuerpos, ya que son capaces de unirse a ligandos o antígenos. Los armazones no IgG pueden seleccionarse del grupo que comprende armazones no IgG basados en tetranectina (por ejemplo, descritos en el documento US 2010/0028995), armazones de fibronectina (por ejemplo, descritos en el documento EP 1266025); armazones basados en lipocalina (por ejemplo, descritos en el documento WO 2011/154420); armazones de ubiquitina (por ejemplo, descritos en el documento WO 2011/073214), armazones de transferencia (por ejemplo, descritos en el documento US 2004/0023334), armazones de proteína A (por ejemplo, descritos en el documento EP 2231860), armazones basados en repeticiones de anquirina

55 (por ejemplo, descritos en el documento WO 2010/060748), armazones de microproteínas, preferentemente microproteínas que forman un nudo de cistina, (por ejemplo, descritos en el documento EP 2314308), armazones basados en el dominio SH3 de Fyn (por ejemplo, descritos en el documento WO 2011/023685), armazones basados en el dominio EGFR-A (por ejemplo, descritos en el documento WO 2005/040229) y armazones basados en el dominio de unidades (por ejemplo, descritos en el documento EP 1941867). El documento WO 01/64942 describe armazones de proteínas útiles para la generación de productos con características de unión novedosas.

60

A lo largo de la memoria descriptiva los "anticuerpos" o "fragmentos de anticuerpos" o "armazones de IgG" o "armazones no de Ig" de acuerdo con la invención son capaces de unir proteínas del NEC, por ejemplo, los fosfo-sitios específicos basados en aa, solos o en combinación, de la presente invención.

Además de los anticuerpos descritos anteriormente, se conocen bien en la técnica otros armazones de biopolímeros

para complejar una molécula diana dentro del contexto de la invención, ya sea solos o en combinación con la invención instantánea, y se han utilizado para la generación de biopolímeros altamente específicos de la diana. Algunos ejemplos son los aptámeros, *spiegelmers*, anticalinas y conotoxinas.

En una realización preferida, el formato del anticuerpo se selecciona del grupo que comprende fragmento Fv, fragmento scFv, fragmento Fab, fragmento scFab, fragmento F(ab)<sub>2</sub> y proteína de fusión scFv-Fc. En otra realización preferida, el formato de anticuerpo se selecciona del grupo que comprende fragmento scFab, fragmento Fab, fragmento scFv y conjugados de biodisponibilidad optimizada de los mismos, tales como fragmentos PEGilados. Uno de los formatos más preferidos es el formato scFab.

#### Proporcionar un sistema de reacción

Los métodos/ensayos de cribado divulgados en el presente documento, el agente/compuesto/moléculas pequeñas de ensayo (marcados), su diana polipéptido/proteína BFRF1 y/o BFLF2 del EBV y/o polipéptido/proteína ORF24 y ORF27 del VZV y/o proteína pUL50 y/o pUL53 u homólogos de los mismos como se han definido anteriormente y se definen a continuación (por ejemplo, de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 6), o los fragmentos de los mismos, se combinan al menos en una solución y, opcionalmente, pueden combinarse además con uno o más agentes/compuestos/moléculas pequeñas candidatos, pero sin limitación. Los agentes/compuestos/moléculas pequeñas candidatos son moléculas que, por ejemplo, pueden inhibir el crecimiento/replicación vírica de virus seleccionados del grupo de los *Herpesviridae*, particularmente entre las especies HHV-1 a HHV-8, MCMV y PrV, pero sin limitación, y los síntomas resultantes de dichas infecciones víricas, más preferentemente inhibir el crecimiento del HCMV y los síntomas de dichas infecciones víricas.

Los agentes/compuestos/moléculas pequeñas candidatos pueden ser, sin que ello se interprete como una limitación de la invención, una proteína o un fragmento de la misma, un péptido o un fragmento del mismo, un péptido sintético diseñado por ordenador o un fragmento del mismo que no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un péptido que contiene restos de aminoácidos D o un péptido grapado), una molécula pequeña, o incluso una molécula de ácido nucleico o de ácido ribonucleico. El experto conoce diversas fuentes comerciales de bibliotecas de moléculas pequeñas que cumplen los criterios básicos de fármacos útiles en un esfuerzo por "forzar" la identificación de compuestos/agentes/moléculas pequeñas candidatos útiles en el contexto de la presente invención.

El cribado de dichas bibliotecas, incluyendo las bibliotecas generadas combinatoriamente (por ejemplo, bibliotecas de péptidos, bibliotecas de aptámeros, bibliotecas de moléculas pequeñas) o generadas a partir de bibliotecas de moléculas pequeñas diseñadas por ordenador, es una forma rápida y eficaz de analizar la actividad de un gran número de compuestos relacionados (y no relacionados) en el contexto de la presente invención.

Los enfoques combinatorios también se prestan a una rápida evolución de los fármacos potenciales mediante la creación de compuestos de segunda, tercera y cuarta generación modelados a partir de compuestos activos, pero por otro modo no deseables. Los compuestos candidatos pueden cribarse a partir de grandes bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Un ejemplo de biblioteca de compuestos candidatos es una biblioteca de compuestos aprobada por la FDA que puede ser utilizada por seres humanos. Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles en el mercado a través de varias empresas, incluyendo Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornualles, Reino Unido), Comgenex (Princeton, N. J.), Brandon Associates (Merrimack, N.H.), y Microsource (New Milford, Conn.) y Aldrich (Milwaukee, Wis.) dispone de una biblioteca de productos químicos raros. Las bibliotecas combinatorias están disponibles o pueden prepararse. Como alternativa, también hay disponibles bibliotecas de compuestos candidatos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales, por ejemplo, en Pan Laboratories (Bothell, Wash.) o MycoSearch (N.C.), o pueden prepararse fácilmente mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los compuestos candidatos aislados de fuentes naturales, tales como animales, bacterias, hongos, fuentes vegetales, incluyendo hojas y corteza, y muestras marinas pueden someterse a ensayo como candidatos para la presencia de agentes farmacéuticos potencialmente útiles. Se entenderá que los agentes farmacéuticos que se han de cribar también podrían derivar de o sintetizarse a partir de composiciones químicas, bioquímicas, biológicas o de compuestos artificiales.

En una realización de la invención, el sistema de reacción contiene al menos un compuesto/agente/molécula pequeña candidato. En otra realización, el sistema de reacción puede contener dos o más compuestos/agentes/moléculas pequeñas candidatos, preferentemente entre 2 y 200 compuestos/agentes/moléculas pequeñas por lote/cavidad, más preferentemente entre 2 y 100 compuestos/agentes/moléculas pequeñas por lote/cavidad, preferentemente entre 2 y 50 compuestos/agentes/moléculas pequeñas por lote/cavidad, ya que el ensayo no depende del marcaje de los compuestos candidatos y puede proporcionar un cribado de alta eficiencia sometiendo a ensayo múltiples compuestos candidatos en paralelo. El experto en la materia es consciente de que estas indicaciones no deben interpretarse como limitantes en vista de las amplias diversidades de diseño de sistemas de reacción adecuados para aprovechar plenamente los ensayos/métodos de cribado de la presente invención. Una vez identificado un lote/cavidad con un compuesto/agente/molécula pequeña que module y/o inhiba el heterodímero BFRF1-BFLF2 y/u ORF24-ORF27 y/o pUL50-pUL53 o ambas proteínas individuales u homólogos de las mismas, cada compuesto puede someterse a más ensayos para evaluar su actividad moduladora o inhibidora, por ejemplo, en ensayos antivíricos adecuados para virus seleccionados del grupo de los *Herpesviridae*, particularmente entre las especies HHV-1 a HHV-8, MCMV y/o PrV,

pero sin limitación, tales como, por ejemplo, cualquier ensayo anti-HCMV adecuado (véase la parte de Ejemplo) o cualquier ensayo anti-HSV adecuado, pero sin limitación.

En una realización preferida, el compuesto/agente/molécula pequeña candidato analizado es un péptido o un fragmento de péptido. Los péptidos se encuentran de forma natural en todo el organismo, en las vías de señalización y en los sistemas de control hormonal, pero también pueden diseñarse por ordenador en el contexto de la presente invención.

En una realización más preferida, el compuesto/agente/molécula pequeña candidato sometido a ensayo es un compuesto/agente/molécula pequeña diseñado por ordenador o una biblioteca del mismo. El experto en la materia conoce una gran diversidad de métodos, programas e instituciones que permiten diseños por ordenador de amplio espectro de compuestos/agentes/moléculas pequeñas o de bibliotecas de los mismos.

#### Tipos de fármacos dirigidos al NEC

Los inventores prevén, basándose en los métodos/ensayos de cribado divulgados, el hallazgo de fármacos novedosos que se dirijan específicamente con alta afinidad al NEC de *Herpesviridae* como agente antivírico de amplio espectro (por ejemplo, contra los herpesvirus humanos HHV-1 a HHV-8) o cepas específicas de las especies HHV-1 a HHV-8, MCMV y/o PrV, o similares (véanse las FIG. 1 y 2 para consultar una ilustración y detalles estéricos) o, en una realización alternativa, que también puede combinarse con otras realizaciones de la presente invención, basándose en el fosfo-sitio o fosfo-sitios específicos basados en aa de las respectivas proteínas de acuerdo con la presente invención como diana.

En el contexto de la invención, el nuevo tipo de fármacos puede caracterizarse por

- (i) el bloqueo estérico de la formación del complejo de salida nuclear de la interacción BFRF1-BFLF2 y/u ORF24-ORF27 y/o pUL50-pUL53 (véanse las FIG. 1 y 2) u homólogos de las mismas y/o
- (ii) la modulación/inhibición/interferencia específica con los requisitos de proteínas que conducen a la formación del NEC, tales como la fosforilación específica de sitio de BFRF1-BFLF2 y/u ORF24-ORF27 y/o pUL50-pUL53, es decir, la modulación/inhibición/interferencia de la fosforilación de BFRF1-BFLF2 y/u ORF24-ORF27 y/o pUL50-pUL53 en general y/o
- (iii) la inhibición mediada por fármacos de la fosforilación de proteínas en la formación del NEC, que se consigue mediante la inhibición de la proteína cinasa vírica (es decir, el ortólogo de CDK conocido pUL97 en el caso del HCMV, u homólogos de pUL97 de otros herpesvirus), y/o
- (iv) una o un grupo de proteína cinasas celulares (en particular CDK u otras cinasas que posiblemente estimulen la actividad CDK), y/o
- (v) mediante el uso de una posible nueva generación de fármacos denominados en el contexto de la invención bloqueadores de fosfo-sitios (PSB), al tiempo que se protegen/enmascaran/bloquean los fosfo-sitios específicamente identificados de las respectivas proteínas como se describe en el presente documento (véase a continuación).

En el contexto de la invención, los inventores prevén, basándose en la información que el NEC específico del EBV y/o del VZV y/o del HCMV es una estructura diana, que está muy conservada entre los herpesvirus, que las estrategias de selección de dianas divulgadas en el presente documento pueden proporcionar agentes/compuestos/moléculas pequeñas candidatos para un fármaco específico contra el EBV, VZV y/o citomegalovirus, preferentemente para el HCMV, y/o fármacos antiherpesvíricos de amplio espectro en general para diversas especies víricas del grupo de los *Herpesviridae*.

#### Modos de la actividad inhibidora de los bloqueadores de fosfo-sitios

Los inventores prevén que PSB cubra el respectivo fosfo-sitio basado en aa como se divulga en la presente invención, de manera que se impida la fosforilación y, por lo tanto, no se produzca la activación mediada por fosforilación de la interacción de heterodímeros de proteínas de herpesvirus u homólogas de las mismas divulgada en el presente documento.

El PSB permite la fosforilación pero después enmascara/protege/bloquea uno o más fosfo-sitios de la invención, lo que provoca que no se reconozca la señal de fosforilación requerida por parte de los interactuadores/ligandos/complejos del NEC. Esto evita la formación/multimerización del NEC y, finalmente, evita la maduración posterior de viriones.

La PSB también puede permitir la fosforilación que normalmente conduce a un cambio conformacional, pero el PSB estanca la proteína en un estado desafortunado y transitorio de conformación inactiva.

En el contexto de la invención, los candidatos para la inhibición de fosfo-sitios pueden ser las proteínas cinasas dependientes de ciclinas celulares, CDK, que pueden fosforilar directamente pUL50-pUL53 y/o BFRF1-BFLF2 del EBV u otras proteínas del NEC homólogas.

Las razones que subrayan este razonamiento son los hallazgos para pUL97, que se sabe que fosforila el NEC central de HCMV y representa un ortólogo vírico funcional/estructural de CDK. pUL97 y CDK pueden fosforilar dualmente proteínas sustrato idénticas tales como pUL69, laminas, Rb, RNAP II, EF-1d. pUL97 interactúa directamente con ciclinas celulares y la inhibición de CDK puede inhibir el reclutamiento del NEC central en el borde nuclear.

Anteriormente se identificaron cuatro fosfo-sitios específicos en la proteína respectiva en el HCMV-NEC y también pueden aprovecharse solos o en combinación en los métodos de cribado de la invención para modular/inhibir/afectar a la formación/multimerización del NEC de virus de los *Herpesviridae* en general, y específicamente para EBV, VZV y/o HCMV.

Los inventores descubrieron que los fosfo-sitios pueden inhibirse solos o en combinaciones de los mismos para estrategias antivíricas novedosas para virus seleccionados del grupo de los *Herpesviridae*, tales como la especie HCMV, MCMV, HSV, VZV, HHV-6, EBV, PrV o similares.

Estos fosfo-sitios están todos fuera de la región de la superficie de interacción de pUL50-pUL53.

Después de lo anterior, los inventores proporcionan otro mecanismo de interacción del heterodímero BFRF1-BFLF2 y/u ORF24-ORF27 y/o pUL50-pUL53 que se aprovechará para estrategias antivíricas novedosas para *Herpesviridae*, y específicamente para HHV-1 a HHV-8 y/o PrV, o similares, en particular en betaherpesvirus. Este nuevo mecanismo se basa en la fosforilación de la proteína del NEC pUL50, que se podría enmascarar/bloquear/proteger mediante moléculas pequeñas sin ser necesariamente una proteína cinasa celular.

La inhibición de las proteínas cinasas celulares (especialmente las que tienen una función celular esencial o al menos muy importante) con fines de estrategia antivírica suele ser objeto de polémicos debates, puesto que una inhibición de las cinasas celulares podría dar como resultado efectos secundarios citotóxicos, antiproliferativos, desreguladores del ciclo celular o efectos inhibidores celulares de otro modo.

En otra realización de la presente invención, este problema podría resolverse mediante un método de cribado de la invención para agentes/compuestos/moléculas pequeñas con posible actividad como el bloqueador de fosfo-sitios (PSB) mencionado anteriormente.

Con la publicación anterior de Rechter *et al.*, 2009, se describió un inhibidor de CDK R25 que inhibía el NEC central. Se observó que R25 bloqueaba el reclutamiento del NEC al borde nuclear. Esto se demostró tanto (i) con células transfectadas con plásmidos como (ii) con células infectadas con HCMV.

Estos datos de inhibición para el compuesto R25 (R25 sometido a ensayo en el ensayo de microscopía confocal y con la coinmunoprecipitación como se divulga en el presente documento), puede sugerir que los fosfo-sitios ahora identificados (véase anteriormente) pueden ser un desencadenante de un posible cambio conformacional de pUL50 por fosforilación, que es una condición previa para enganchar la estructura de gancho N-terminal de pUL53 en pUL50 para formar el NEC central como se divulga en detalle en el presente documento. Sin fosforilación en estos sitios evidentemente pUL50 no da como resultado una conformación activa y, por lo tanto, no es capaz de interactuar con pUL53, a pesar de la presencia de la estructura de gancho totalmente plegada de pUL53 (FIG. 1 y 2), como se divulga en el presente documento.

Por ende, la inhibición de fosfo-sitios de polipéptidos de NEC, tales como pUL50, como se ha descrito anteriormente, parece inhibir también el reclutamiento de pUL53 para promover la multimerización del complejo de salida nuclear en general. Esto da como resultado la ausencia de una colocalización "de tipo borde" anular del heterodímero pUL50-pUL53 en la envoltura nuclear/lámina nuclear de/el borde nuclear. Por lo tanto, la formación de todo el NEC multimérico a partir de muchas proteínas víricas y celulares que posteriormente se reclutan en el complejo NEC puede inhibirse por este medio (véanse, por ejemplo, las FIG. 3 y 6 para consultar ilustraciones del mismo).

Parece prometedor que las CDK sean las primeras candidatas a proteínas cinasas celulares que fosforilen el NEC central vírico y activen por lo tanto la maduración del virión dentro del HCMV. Por analogía y homología como se divulga en las SEQ ID NO de la FIG. 4, esta situación podría ser similar en otros virus del grupo de los *Herpesviridae*.

### Ventajas de la invención

En vista de la invención esbozada anteriormente, el núcleo de la invención y las ventajas pueden resumirse de la siguiente manera:

Los inventores divulgan la estructura cristalina del NEC BFRF1-BFLF2 y pUL50-pUL53 de forma muy detallada y con alta resolución.

A diferencia de la técnica anterior, los inventores expresaron un pUL50-pUL53 truncado que abarcaba los aa 1-171 fusionados a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador rico en glicina, tal como GGSGSGGS o similares, a

pUL53 de los aminoácidos 59-87 (véanse las SEQ ID NO: 1 y 2). Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, los aa 59-87 no se han analizado para determinar su estructura cristalina detallada, hasta ahora. La nueva estructura cristalina está disponible en 1,48 Å.

De manera similar, se construyó una proteína de fusión BFRF1-BFLF2 del EBV truncada, en donde BFRF1 1-192 del EBV se fusiona a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador rico en glicina, tal como GGSGS o similares a BFLF2 78-110 del EBV (véanse las SEQ ID NO: 3 y 4). Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, los aa 78-110 no se han analizado para determinar su estructura cristalina detallada, hasta ahora. La nueva estructura cristalina se proporcionó a 1,75 Å (véase la ilustración de la Figura 12).

Los inventores descubrieron una estructura similar en el HCMV y en el EBV usando las proteínas de fusión anteriores. Por lo tanto, ya que la estructura parece conservarse entre los diferentes tipos de virus de los *Herpesviridae*, es posible identificar compuestos que afectan al NEC, por ejemplo, inhibidores/moduladores de Pan Herpes o similares, a condición de que estos virus usen un NEC para la replicación vírica y la salida de viriones.

Los inventores coexpresaron las proteínas pUL50 y pUL53 del HCMV y BFRF1 y BFLF2 del EBV y las respectivas proteínas del VZV y posteriormente las cocrystalizaron y copurificaron.

Una ventaja clave adicional de la presente invención es que se identificaron cuatro fosfo-sitios específicos en pUL50 que pueden aprovecharse solos o en combinación en los métodos de cribado de la invención para modular/inhibir/afectar a la formación/multimerización del NEC de virus de los *Herpesviridae* en general, y específicamente HHV-1 a HHV-8, para los betaherpesvirus, tales como el HCMV y otros.

Los fosfo-sitios pueden ser dianas con capacidad farmacogénica, ya sea como estrategia de segunda línea o para combinarse con los hallazgos para el mecanismo de tipo gancho para pUL50 y pUL53, mientras que se inhiben solos o en combinaciones de los mismos. Como otra ventaja de la invención, esto también proporciona estrategias antivíricas novedosas para virus seleccionados del grupo de los *Herpesviridae*, tales como las especies HHV-1 a HHV-8, PrV, o similares, y sus respectivas cepas. Se observa que los fosfo-sitios están todos fuera de la región de la superficie de interacción de pUL50-pUL53 en el NEC del HCMV.

Ha de entenderse que la presente invención no se limita a las metodologías particulares, ensayos particulares, protocolos y reactivos particulares descritos ya que éstos pueden variar. También ha de entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene únicamente el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención.

Debe tenerse en cuenta que, como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un homólogo del mismo" incluye una pluralidad de dichos homólogos razonables conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

Cabe señalar que la expresión "que comprende" también abarca el significado de "que consiste en", por ejemplo, un grupo de miembros que comprende dichos miembros también abarca un grupo de miembros que consiste únicamente en estos miembros.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o ensayo de la invención pueden usarse cualesquier métodos, ensayos, dispositivos, programas y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, los métodos/ensayos, dispositivos, programas y materiales de cribado preferidos se describen en el presente documento.

## Definiciones

Las expresiones "capacidad farmacogénica" y "farmacogénico" o términos relacionados indican, en la materia objeto de la presente invención, una diana biológica (es decir, en el contexto de la invención, la proteína, fragmento de proteína, péptido o el péptido pUL50 y/o pUL53 de la SEQ ID NO: 1 y/o los fosfo-sitios identificados divulgados en el presente documento) descubierta por los inventores y que se prevé que se unirá con alta afinidad a un fármaco. Además, por definición, en el contexto de la invención, la unión de un fármaco que puede obtenerse mediante los métodos/ensayos de cribado de la presente invención alterará la función/estructura de la diana con un beneficio terapéutico para el paciente. El concepto de capacidad farmacogénica en el contexto de la invención se refiere preferentemente a moléculas pequeñas, pero también comprende productos médicos biológicos tales como anticuerpos monoclonales terapéuticos.

La expresión "molécula o moléculas pequeñas" y expresiones relacionadas en el contexto de la invención indican moléculas de bajo peso molecular que comprenden lípidos, monosacáridos, segundos mensajeros, otros productos naturales y metabolitos, así como fármacos y otros xenobióticos, pero sin limitación. Son distintas de macromoléculas tales como las proteínas. Estas expresiones u otras similares cubren los iones metálicos.

En biología molecular y farmacología, una molécula pequeña es un compuesto orgánico de bajo peso molecular (<900 Dalton) que puede ayudar a regular un proceso biológico, con un tamaño del orden de  $10^{-9}$  m. La mayoría de los fármacos son moléculas pequeñas.

El límite superior del peso molecular para una molécula pequeña es de aproximadamente 900 Dalton, lo que les permite difundir rápidamente a través de las membranas celulares para llegar a los lugares intracelulares de acción. Además, este límite de peso molecular es una condición necesaria pero insuficiente para la biodisponibilidad oral. Finalmente, se ha recomendado un límite inferior de peso molecular de 500 Dalton (como parte de la "regla de los cinco") para las moléculas pequeñas candidatas a fármacos en desarrollo, basándose en la observación de que las tasas de desgaste clínico se reducen significativamente si el peso molecular se mantiene por debajo de este límite de 500 Dalton.

La farmacología por lo general restringe la expresión a una molécula que se une a un biopolímero específico, tal como una proteína o un ácido nucleico, y actúa como efector, alterando la actividad o la función del biopolímero. Las moléculas pequeñas pueden tener una gran diversidad de funciones biológicas, sirviendo como moléculas de señalización celular, como fármacos en medicina, como plaguicidas en agricultura y en muchas otras funciones. Estos compuestos pueden ser naturales (tales como metabolitos secundarios) o artificiales (tales como fármacos antivíricos); pueden tener un efecto beneficioso contra una enfermedad (tales como fármacos) o pueden ser perjudiciales (tales como teratógenos y carcinógenos). Los biopolímeros, tales como los ácidos nucleicos y las proteínas, y los polisacáridos (tales como el almidón o la celulosa) no son moléculas pequeñas, aunque sus monómeros constituyentes ribo o desoxirribonucleótidos, aminoácidos y monosacáridos, respectivamente, son con frecuencia moléculas pequeñas. Los oligómeros muy pequeños por lo general también se consideran moléculas pequeñas, tal como los dinucleótidos, péptidos tales como el antioxidante glutatión, y disacáridos tales como la sacarosa.

Las moléculas pequeñas también pueden usarse como herramientas de investigación para sondear la función biológica y como cabezas de serie para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Algunos pueden inhibir una función específica de una proteína multifuncional o alterar las interacciones proteína-proteína.

El término "inhibir" o términos similares, en el contexto de la invención, indican restringir, impedir o detener una acción, una estructura, una función, un impulso, etc. y/o prohibir una acción, una estructura, una función, un impulso, etc. dentro del contexto de la invención. Dicho término o términos similares también indican disminuir la velocidad de acción o detener una reacción química, bioquímica, física o fisicoquímica.

El término "antagonizar" o términos similares, en el contexto de la invención, indican actuar en oposición a algo o contra algo dentro del contexto de la presente invención.

El término "homólogo" o términos similares indican análogos de ADN, ARN, aminoácido o aminoácidos, proteínas/péptidos o fragmentos que sean iguales o similares en estructura y función; véase, por ejemplo, la FIG. 4 para una ilustración del mismo.

El término "*Herpesviridae*" indica una familia de virus/vírica, que comprenden diferentes géneros tales como, por ejemplo, el género CMV y otros géneros, bien conocidos por el experto en la materia. Dentro de un género existen diferentes especies víricas/de virus, tal como dentro del género CMV, existe el patógeno humano HCMV y el patógeno murino MCMV. Dichas especies comprenden además diferentes cepas tales como, por ejemplo, la cepa AD 169 del HCMV. Adicionalmente, en el contexto de la invención, el experto en la materia sabe discriminar entre patógenos animales y patógenos humanos. Por ejemplo, el experto sabe que el HCMV es predominantemente un patógeno humano y el MCMV es predominantemente un patógeno murino. Adicionalmente, el experto en la materia sabe que, por ejemplo, HHV-6, HHV-7, HHV-8 representan una clase propia de virus.

El término "diana" o términos similares en el contexto de la invención indican una estructura de una proteína/polipéptido/péptido o un fragmento de la misma o un aminoácido o más aminoácidos que se ha de someter a ensayo para determinar la unión/interacción/antagonismo con los compuestos/agentes/moléculas pequeñas mediante los métodos/ensayos de cribado divulgados de la presente invención. Esta definición puede combinarse con la definición de "farmacogénico" anterior para definir una "diana farmacogénica" en el contexto de la presente invención.

La expresión "simulación de dinámica molecular de escala temporal larga" y variaciones de la misma son conocidas en la técnica (por ejemplo, en "*Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function*", Revisión bibliográfica en *Current Opinion in Structural Biology* 19(2): 120-7. Mayo de 2009).

## ABREVIATURAS

Las abreviaturas utilizadas en el contexto de la presente invención son:

aa - aminoácido o aminoácidos

CoIP - coinmunoprecipitación  
 CMV - citomegalovirus  
 CR - región conservada  
 HCMV - citomegalovirus humano  
 5 GHKL - ATPasa/superfamilia de cinasas  
 HSV-1 - virus del herpes simple de tipo 1  
 IMAC - cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados  
 MNI - membrana nuclear interna  
 MCMV - citomegalovirus murino  
 10 NEC - complejo nuclear de salida  
 MNE - membrana nuclear externa  
 ORF - marco de lectura abierto  
 PCR - reacción en cadena de la polimerasa  
 PKC - proteína cinasa C  
 15 VZV - virus varicela-zóster  
 HSV - virus del herpes simple  
 HHV - herpesvirus humano  
 EBV - virus de Epstein-Barr  
 20 PrV - virus de la pseudorrabia (miembro de los herpesvirus)

## Ejemplos

### 1. Producción y purificación de proteínas.

25 Las proteínas correspondientes a las SEQ ID NO: 1 a 6 se clonaron en el plásmido pET15b o pET28b. Al hacer esto, las secuencias de proteínas víricas se expanden N-terminalmente para incluir un marcador de His y una secuencia MGSSHHHHHSSGLVPRGSH (SEQ ID NO: 40) de sitio de escisión de Trombina en el extremo N para facilitar la producción y purificación de las proteínas de fusión. Los plásmidos se transformaron en *E. coli* BL21(DE3) y las células se incubaron en medio TB en presencia de ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 50 µg/ml a 20 °C. La producción de proteínas se indujo con IPTG de 0,25 a 1 mM. Después de la recogida de las células y la alteración celular mediante un aparato de ultrasonidos o un homogeneizador de alta presión, todas las proteínas se purificaron mediante una etapa de cromatografía de afinidad HisTrap. Posteriormente, las proteínas se escindieron usando trombina. Como resultado de esta etapa, las proteínas víricas de fusión purificadas comienzan con una secuencia GSH añadida a su extremo N. Después, las proteínas se purificaron adicionalmente mediante una etapa de cromatografía de filtración en gel y, dependiendo de la presencia de contaminantes adicionales, con una etapa adicional de cromatografía de intercambio iónico.

### 2. Cristalización de proteínas.

40 Las dos proteínas de fusión proteína de fusión truncada-HCMV-pUL50-pUL53 (SEQ ID NO: 2) y proteína de fusión truncada-EBV-BMRF1-BMLF2 (SEQ ID NO: 4) se cribaron para determinar las condiciones de cristalización mediante la técnica de la gota sedente y las proteínas con concentraciones entre 10 y 15 mg/ml se disolvieron en un tampón que consistía en tampón TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM y pH 7,4. Se obtuvieron cristales de calidad de difracción de la proteína de fusión truncada-HCMV-pUL50-pUL53 (SEQ ID NO: 2) a 4 °C con PEG 4000 al 20 %, propanol al 10 %, HEPES 100 mM, pH 7,5 como solución de reserva. Se obtuvieron cristales de calidad de difracción de la proteína de fusión BMRF1-BMLF2 truncada del EBV (SEQ ID NO: 4) a 4 °C con malonato de sodio 0,2 M pH 4,5, PEG 3350 al 20 % (Peg Rx E2) como solución de reserva.

### 3. Determinación de la estructura cristalina

50 Se recogieron conjuntos de datos de difracción de alta resolución de cristales de la proteína de fusión truncada-HCMV-pUL50-pUL53 (SEQ ID NO: 2) y de la proteína de fusión truncada-EBV-BMRF1-BMLF2 (SEQ ID NO: 4) en las líneas de luz MX del sincrotrón BESSY de Berlín. Los datos se procesaron con el programa XDS. Las fases iniciales se obtuvieron mediante la técnica de reemplazo molecular con el programa PHENIX\_MRAGE usando como modelo de búsqueda la estructura previamente determinada del complejo pUL50-pUL53 (código de entrada PDB 5D5N.pdb, <http://www.pdb.org>). Las estructuras se completaron y se corrigieron usando el programa AUTOBUILD de PHENIX o manualmente usando el programa COOT. Las estructuras se refinaron hasta la convergencia con el programa PHENIX.REFINE. La recogida de datos cristalográficos y las estadísticas de refinamiento se resumen a continuación para la proteína de fusión truncada-HCMV-pUL50-pUL53 (SEQ ID NO: 2) y la proteína de fusión truncada-EBV-BMRF1-BMLF2 (SEQ ID NO: 4), respectivamente.

Recogida de datos y estadísticas de refinamiento para la proteína de fusión truncada-HCMV-pUL50-pUL53 (SEQ ID NO: 2):

| Recogida de datos                                             | BESSY II 14.2                 |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Longitud de onda ( $\lambda$ )                                | 0,9182                        |
| Grupo espacial                                                | P 1 21 1 (4)                  |
| Célula abc ( $\text{\AA}$ ), $\alpha\beta\gamma$ ( $^\circ$ ) | 37,27 82,57 63,66, 90 95,1 90 |
| Resolución ( $\text{\AA}$ )                                   | 41,29-1,48 (1,57-1,48)        |
| Mosaicidad ( $^\circ$ )                                       | 0,068                         |
| Reflexiones exclusivas                                        | 120737                        |
| Multiplicidad                                                 | 2,1                           |
| $R_{\text{sim}}$ (%)                                          | 6,5 (59,4)                    |
| Media $I/\sigma$                                              | 6,47 (1,06)                   |
| CC 1/2                                                        | 99,1 (56,5)                   |
| Wilson B ( $\text{\AA}^2$ )                                   | 25,74                         |
| Compleitud                                                    | 95,6 (94,8)                   |
| <b>Refinamiento</b>                                           |                               |
| $R_{\text{trabajo}}/R_{\text{libre}}$ (%)                     | 18,8/22,5                     |
| Moléculas/ASU                                                 | 2                             |
| Valores atípicos/fav. de Rama. (%)                            | 0,0/98,95                     |
| Valores atípicos de rotámeros (%)                             | 1,98                          |
| Enlaces/ángulos de RMS                                        | 0,0096/1,05                   |
| Átomos de proteína/disolvente                                 | 3120/241                      |
| Grupos de TLS                                                 | 4                             |

Recogida de datos y estadísticas de refinamiento para la proteína de fusión truncada-EBV-BMRF1-BMLF2 (SEQ ID NO: 4):

| Recogida de datos                                             | BESSY II 14.2                                   |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Longitud de onda ( $\lambda$ )                                | 0,9182                                          |
| Grupo espacial                                                | P6122 (178)                                     |
| Célula abc ( $\text{\AA}$ ), $\alpha\beta\gamma$ ( $^\circ$ ) | 59,31 59,31 265,34, 90 90 120                   |
| Resolución ( $\text{\AA}$ )                                   | 47,90-1,75 (1,83-1,75)                          |
| Mosaicidad                                                    | 0,109                                           |
| Reflexiones exclusivas                                        | 22538                                           |
| Multiplicidad                                                 | 37,4                                            |
| $R_{\text{sim}}$ (%)                                          | 7,4 (187,5)                                     |
| Media $I/\sigma$                                              | 29,3 (2,66)                                     |
| CC 1/2                                                        | 100,0 (89,0)                                    |
| Compleitud                                                    | 77,3 (31,4) esférica<br>94,0 (100,0) elipsoidal |
| <b>Refinamiento</b>                                           |                                                 |
| $R_{\text{trabajo}}/R_{\text{libre}}$ (%)                     | 21,4/25,0                                       |
| Enlaces de RMS ( $\text{\AA}$ )                               | 0,007                                           |
| Ángulos de RMS ( $^\circ$ )                                   | 1,002                                           |
| Moléculas/ASU                                                 | 1                                               |
| Moléculas de agua                                             | 94                                              |
| Valores atípicos de Ramachandran (%)                          | 1,36                                            |
| Fav. de Ramachandran (%)                                      | 94,1                                            |
| Enlaces de RMS ( $\text{\AA}$ )                               | 0,007                                           |
| Ángulos de RMS ( $^\circ$ )                                   | 1,002                                           |

5

#### 4. Ensayo de replicación del HCMV

La idoneidad de los agentes/compuestos/moléculas pequeñas de la invención para el tratamiento de las infecciones por HCMV puede demostrarse a modo de ejemplo en el siguiente modelo animal: - Xenoinjerto de HCMV Gelfoam(R).

10 El experto en la materia es consciente de que pueden aplicarse ensayos adecuados similares para someter a ensayo los agentes/compuestos/moléculas pequeñas que se han de identificar mediante la invención para, por ejemplo, el tratamiento de infecciones por HHV-1 - HHV-8, o PrV, pero sin limitación, tales como, por ejemplo, ensayos adecuados anti-HSV, anti-HHV- o anti-VZV.

#### 15 5. Modelo animal - Xenoinjerto de HCMV Gelfoam(R)

Se adquirieron ratones inmunodeficientes hembra de 3-4 semanas de edad (16-18 g), Fox Chase SCID o Fox Chase SCID-NOD o SCID beige, de criadores comerciales (Taconic M+B, Jackson EE.UU.). Los animales se alojan en condiciones estériles (incluyendo la cama y el pienso) en aisladores.

20

#### 6. Crecimiento del virus

Se cultiva citomegalovirus humano (HCMV), cepa Davis o AD169, *in vitro* en fibroblastos de prepucio de embrión humano (células NHDF). Una vez infectadas las células NHDF con una multiplicidad de infección (M.O.I.) de 0,01-0,03, las células infectadas por el virus se recogen 5-10 días después y se almacenan en presencia de un medio esencial mínimo (MEM), suero fetal de ternera (FCS) al 10 % con DMSO al 10 % a 40 °C. Después de diluciones en serie de diez veces de las células infectadas por virus, el título se determina en placas de 24 pocillos de células NHDF confluentes después de la tinción vital con Rojo neutro.

#### 7. Preparación de las esponjas, Trasplante, Tratamiento y evaluación:

Se humedecen inicialmente esponjas de colágeno de 1 cm x 1cm x 1 cm de tamaño (Gelfoam(R); de Peasel & Lorey, N.º de pedido 407534; K. T. Chong *et al.*, *Abstracts of 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, pág. 439) con solución salina tamponada con fosfato (PBS), las burbujas de aire atrapadas se eliminan mediante desgasificación y, después, se almacenan en MEM+FCS al 10 %. Las células de NHDF infectadas con  $1 \times 10^6$  virus (infección con HCMV Davis o HCMV AD169 M.O.I. = 0,01) se desprenden 3 horas después de la infección y se añaden en una gota de 20 µl de MEM, 10 % de FCS, a una esponja húmeda. Aproximadamente 16 horas después, las esponjas infectadas se incuban con 25 µl de PBS/BSA al 0,1 %/DTT 1 mM con 5 ng/µl de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF). Para el trasplante, los ratones inmunodeficientes se anestesian con Avertin o una mezcla de ketamina/xilazina/azepromazina, el pelaje del lomo se elimina usando una afeitadora, la epidermis se abre 1-2 cm, sin tensión, y las esponjas húmedas se trasplantan bajo la piel dorsal. La herida quirúrgica se cierra con pegamento tisular. 6 horas después del trasplante, los ratones pueden ser tratados por primera vez (el día de la operación, hay un tratamiento).

En los días siguientes, durante un período de 8 días, los ratones se tratan con la sustancia por vía oral tres veces al día (7.00 h y 14.00 h y 19.00 h), dos veces al día (8.00 h y 18.00 h) o una vez al día (14.00 h). La dosis diaria es, por ejemplo, 3 o 10 o 30 o 60 o 100 mg/kg de peso corporal, pero sin limitación, el volumen administrado es de 10 ml/kg de peso corporal. Las sustancias se formulan en forma de suspensión de tilosa al 0,5 % de concentración con DMSO al 2 % o en forma de suspensión de tilosa al 0,5 % de concentración. 9 días después del trasplante y 16 horas después de la última administración de sustancia, los animales son sacrificados sin dolor y se les retira la esponja.

Las células infectadas por el virus se liberan de la esponja mediante digestión con collagenasa (330 U/1,5 ml) y se almacenan en presencia de MEM, suero fetal de ternera al 10 %, DMSO al 10 % a -140 °C.

La evaluación se realiza tras diluciones en serie de diez veces de las células infectadas por el virus, determinando el título en placas de 24 pocillos de células NHDF confluentes después de la tinción vital con Rojo neutro. Se determina el número de células infectadas o de partículas de virus infecciosas (ensayo del centro infeccioso) después del tratamiento con la sustancia en comparación con el control tratado con placebo.

#### 8. Ensayo de inhibición de CYP

Para investigar el mecanismo de inhibición (irreversible) del CYP3A4, se incuban diferentes concentraciones de la sustancia de ensayo con microsomas de hígado humano (2 mg/ml de proteína microsómica) en tampón de fosfato de potasio pH 7,4 con adición de un sistema generador de NADPH (NADP<sup>+</sup>, glucosa 6-fosfato, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) a 37 °C. En distintos momentos, se toman 2 alícuotas de la incubación.

La primera alícuota se incuba 1:50 en una nueva solución de incubación (tampón de fosfato, sistema generador de NADPH y 10 µM de Midazolam) a 37 °C durante otros 10 min. Después, la incubación se detiene usando acetónitrilo en hielo, la proteína se sedimenta en una centrífuga a 15.000 g y el sobrenadante se analiza para determinar la formación de 1'-hidroxiimidazolam usando métodos convencionales de HPLC/MS. La segunda alícuota se detiene usando acetónitrilo en hielo y se analiza la sustancia de ensayo restante usando HPLC/UV/MS.

Los dos conjuntos de datos analíticos se determinan para los parámetros típicos de inhibición irreversible (kinact, Ki y relación de partición r) y, usando estos datos, se evalúa la sustancia de ensayo (véase Á. Madan, *et al.*, en Á. D. Rodrigues (ed.) "*Drug-Drug Interaction*" en "*Drugs and the Pharmaceutical Science*", Vol. 116, ISBN 0-8247-0283,2, Marcel Dekker Inc., Nueva York, 2002). Un experto en la materia, como se ha indicado anteriormente, es consciente de que puede usarse cualquier ensayo anti-HCMV o ensayo sustitutivo adecuado, así como cualquier ensayo anti-HSV o ensayo sustitutivo adecuado o ensayos similares para las cepas víricas que se han de analizar, para investigar más a fondo las propiedades antivíricas de los agentes candidatos identificados mediante los métodos/ensayos de cribado divulgados en el presente documento.

#### Clonación de proteínas víricas del núcleo NEC

#### Materiales y métodos

#### Bacterias

*Escherichia coli* (*E. coli*) **DH10B**: F- *endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *supE44 thi-1 λ- recA1 gyrA96 relA1 deoRΔ Δ(lacZYA-argF)*-U169 80/*lacΔM15* (Grant *et al.*, 1990)

Cultivos de células eucariotas

- 5 **293T**: células epiteliales de riñón embrionario humano (HEK), transformadas por adenovirus de tipo 5 (Ad5), que expresaban adicionalmente el antígeno tumoral grande del virus de simio 40 (SV40) (Pear *et al.*, 1993)  
**HeLa**: estirpe celular de carcinoma de cuello de útero humano, positivo para el virus del papiloma humano de tipo 16 (VPH-16) (Nelson-Rees y Flandermeyer, 1976)

Ácidos nucleicos

Oligonucleótidos

- 15 Las secuencias respectivas (anotadas de 5' a 3') utilizadas para la clonación por PCR, la clonación Gateway y la secuenciación de nucleótidos se enumeran a continuación. Las secuencias correspondientes al gen de interés aparecen subrayadas, los sitios de escisión de las enzimas de restricción están resaltados en negrita, Los epítomos de Flag (péptido DYKDDDDK, SEQ ID NO: 41) y HA (hemaglutinina) se representan en cursiva y los codones de inicio y parada están sombreados en color gris.

Oligonucleótidos utilizados para la clonación por PCR

| Número de almacenamiento | Designación                                                   | Secuencia de nucleótidos                                                                                                                                 |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 52-60                    | 5-UL53 (aa50) <i>EcoRI</i>                                    | <b>TAGGAATT</b> <u>CATGCCGTCGCCGGCCGACGCGCGC</u><br><u>CCGCGCCTCACGCTGCACGACCTGCACGACATCT</u><br><u>TCCGCGAGCACCCCGAACTGGAGCTC</u> (SEQ ID NO. 42)       |
| 52-61                    | 3-UL53 (aa292)-Flag <i>XhoI</i>                               | <b>TAG CTCGAG TCA</b><br><i>CTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTC</i><br><u>GCCGCTGGACTGACACAGCTC</u> (SEQ ID NO. 43)                                                 |
| 52-62                    | 5-BFLF2 (aa73) <i>EcoRI</i>                                   | <b>TAG GAATTC ATG</b><br><u>ACCAGACATGGTGTAGACAGATCCCATTITTCAC</u><br><u>TACGGGACTTCTTCAGGGGAATCTCTGCCAAC</u><br><u>TTTGAGCTGGGCAAAG</u> (SEQ ID NO. 44) |
| 52-63                    | 3-BFLF2 (aa318)-Flag <i>XhoI</i>                              | <b>TAG CTCGAG TCA</b><br><i>CTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTC</i><br><u>CTGTTTATTTTCCAAAATGAGC</u> (SEQ ID NO. 45)<br><u>TTTGAGCTGGGCAAAGATTTTCTGCGTGAGATGA</u>   |
| 52-64                    | 5-UL53 globular(aa88) con Gancho de BFLF2(aa95)               | <u>ACACCCCATACAT GGCAAAGAGTCCATC</u> (SEQ ID NO. 46)                                                                                                     |
| 52-65                    | 5-Gancho de BFLF2(aa95) con Gancho de UL53(aa50) <i>EcoRI</i> | <b>TAG GAATTC ATG</b><br><u>CCGTCGCCGGCCGACGCGCGCCCGCGCCTCACGC</u><br><u>TGCACGACCTGCACGACATCTTCCGCGAGCAC</u><br><u>TTTGAGCTGGGCAAAG</u> (SEQ ID NO. 47) |
| 52-66                    | 5-Gancho de UL53(aa72) con Gancho de BFLF2(aa73) <i>EcoRI</i> | <b>TAG GAATTC ATG</b><br><u>ACCAGACATGGTGTAGACAGATCCCATTITTCAC</u><br><u>TACGGGACTTCTTCAGGGGAATCTCTGCCAAC</u><br><u>CCCGAACTGGAGCTC</u> (SEQ ID NO. 48)  |

(continuación)

| Número de almacenamiento | Designación                                            | Secuencia de nucleótidos                                                                                 |
|--------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 52-67                    | 5-BFLF2<br>globular(aa111) con<br>Gancho de UL53(aa72) | <u>CCCGAACTGGAGCTCAAGTACCTTAACATGATGA</u><br><u>AGATGGCCATCACGGTCTCAGAGGCCGTGTTTC</u><br>(SEQ ID NO. 49) |

Oligonucleótidos utilizados para la clonación Gateway

| Número de almacenamiento | Designación                        | Secuencia de nucleótidos                                                                                                           |
|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M52-80                   | 5-BFRF1 <i>EcoRI</i><br>attB1      | TAG GAATTC GGGG<br>ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ACC ATG<br><u>GCGAGCCCGGAAGAG (SEQ ID NO. 50)</u>                                     |
| M52-81                   | 3-BFRF1-Enlazador<br><i>Bam</i> HI | TAG GGATCC CCCGGTCCA CCTCAGAAACATC (SEQ ID NO: 51)                                                                                 |
| M52-82                   | 5-BFLF2-Enlazador<br><i>Bam</i> HI | TAG GGATCC GGGAGC<br><u>ATGGCCCCGGTCACCCCAGATG (SEQ ID NO. 52)</u>                                                                 |
| M52-83                   | 3-BFLF2 <i>Xba</i> I<br>attB2-Flag | TAG TCTAGA GGGG<br>ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCA<br><i>CTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTC</i><br><u>CTGTTTATTTCCAAAATGAG (SEQ ID NO. 53)</u> |
| M52-84                   | 5-BGLF4 attB1                      | GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ACC<br><u>ATG GATGTGAATATGGC (SEQ ID NO. 54)</u><br>GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCA              |
| M52-85                   | 3-BGLF4 attB2-Flag                 | <i>CTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTC</i><br><u>TCCACGTCGGCCATCTGG (SEQ ID NO. 55)</u>                                                       |

5

Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación

| Número de almacenamiento | Designación                   | Secuencia de nucleótidos              |
|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| 6-36                     | T7                            | TTAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO: 56) |
| 10-35                    | SP6                           | CATTTAGGTGACACTATAG (SEQ ID NO: 57)   |
| 52-92                    | 5-pInd20seq_pCMV              | CCATCCACGCTGTTTTGACC (SEQ ID NO: 58)  |
| M52-86                   | Sec. de 5-BFRF1-BFLF2         | ACTCGTGGTCGGAATCCG (SEQ ID NO: 59)    |
| M52-87                   | Secuenciación de 3-pInducer20 | TTACTAAGCGTAGTCTG (SEQ ID NO: 6)      |

Vectores y plásmidos de expresión

10

Vectores de clonación eucariotas

ADNcp3.1 (+): vector de expresión de mamíferos que contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) en orientación directa (+) para la inserción de un ORF de interés bajo el control del promotor temprano inmediato y el potenciador del HCMV; los casetes de resistencia a neomicina y a ampicilina permiten la selección de clones celulares transfectados (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

15

pDONR221: Vector donante para la reacción de recombinación de BP para la clonación Gateway (Invitrogen/ Life technologies, Karlsruhe, Alemania)

20

pInducer20 cms (pHM4527): pInducer20 CRS mutagenizado (pF1037) para la reacción de recombinación LR para

clonación Gateway (amablemente proporcionado por el laboratorio Stamminger, Virología, FAU Erlangen-Nürnberg).

Plásmidos de expresión listos para usar

| Número de clon interno | Designación                              | Descripción                                                                                                                                                                                         |
|------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pHM1720                | ADNcp-BGLF4-Flag                         | construcción de expresión eucariota que codifica la proteína cinasa del EBV BGLF4, Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag                                                                     |
| pHM2589                | ADNcp-UL50-HA                            | construcción de expresión eucariota que codifica pUL50, fusionado C-terminalmente al epítipo de HA                                                                                                  |
| pHM2590                | ADNcp-UL53-Flag                          | construcción de expresión eucariota que codifica pUL53, Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag                                                                                                |
| pHM3071                | ADNcp-UL27-HA                            | construcción de expresión eucariota que codifica pUL27, fusionado C-terminalmente al epítipo de HA                                                                                                  |
| pHM4717                | ADNcp-M50-HA                             | construcción de expresión eucariota que codifica pM50, fusionado C-terminalmente al epítipo de HA                                                                                                   |
| pHM4718                | ADNcp-M53-Flag                           | construcción de expresión eucariota que codifica pM53, Fusionado C-terminalmente al Flag                                                                                                            |
| pHM4695                | ADNcp-Orf24-HA                           | construcción de expresión eucariota que codifica Orf24, fusionado C-terminalmente al epítipo de HA                                                                                                  |
| pHM4696                | ADNcp-Orf27-Flag                         | construcción de expresión eucariota que codifica Orf27, Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag                                                                                                |
| pHM4697                | ADNcp-BFRF1-HA                           | construcción de expresión eucariota que codifica BFRF1, fusionado C-terminalmente al epítipo de HA                                                                                                  |
| pHM4698                | ADNcp-BFLF2-Flag                         | construcción de expresión eucariota que codifica BFLF2, Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag                                                                                                |
| pF626                  | pDsRed1-N1                               | vector de expresión de mamíferos que codifica DsRed1 (variante de la proteína fluorescente roja de <i>Discosoma</i> sp.) bajo el control del promotor/ potenciador IE del HCMV                      |
| pF720                  | ADNcp-UL97                               | construcción de expresión eucariota que codifica la proteína cinasa del HCMV pUL97                                                                                                                  |
| pF721                  | ADNcp-UL97-Flag                          | construcción de expresión eucariota que codifica la proteína cinasa del HCMV pUL97, Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag                                                                    |
| pF732                  | ADNcp-UL44-Flag                          | construcción de expresión eucariota que codifica pUL44, Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag                                                                                                |
| -                      | Plásmido de Cromocuerpo de lamina-TagGFP | construcción de expresión eucariota que codifica el marcador de la envoltura nuclear Lamina-V <sub>H</sub> H fusionado a proteína verde fluorescente TagGFP2 (Chromo Tek GmbH, Planegg-Martinsried) |

5

Plásmidos recién generados

Construcciones de intercambio de dominios

- 10 Los siguientes plásmidos de expresión codifican las construcciones de intercambio de dominios de pUL53 del HCMV y BFLF2 del EBV. Los intercambios de dominios se generaron mediante amplificación PCR/PCR de ADNcp-UL53-Flag y ADNcp-BFLF2-Flag usando los oligonucleótidos descritos anteriormente. Los fragmentos se insertaron en ADNcp3.1(+) mediante *EcoRI* y *XhoI*.

- 15 Construcciones de intercambio de dominios generadas

| Interna número de clon | Designación                                            | Descripción                                                                                                                                                                                      | PCR cebadores       | Molde   |
|------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------|
| pHM4762                | ADNcp-Gancho de UL53- dominio globular de UL53 - Flag  | construcción de expresión eucariota que codifica la estructura de gancho de pUL53 (aa 50-87) y el dominio globular principal de pUL53 (aa 88-292), Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag  | 52-60, 52-61        | pHM2590 |
| pHM4763                | ADNcp-Gancho de BFLF2 -dominio globular de UL53 - Flag | construcción de expresión eucariota que codifica la estructura de gancho de BFLF2 (aa 73-110) y el dominio globular principal de pUL53 (aa 88-292), Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag | 52-61, 52-62, 52-64 | pHM2590 |

(continuación)

| Interna<br>número<br>de clon | Designación                                                              | Descripción                                                                                                                                                                                                                                                          | PCR<br>cebadores    | Molde   |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------|
| pHM4764                      | ADNcp-Gancho de UL53 - Gancho de BFLF2 - dominio globular de UL53 - Flag | construcción de expresión eucariota que codifica la estructura de gancho N-terminal de pUL53 (aa 50-71), la estructura de gancho C-terminal de BFLF2 (aa 95-110) y el dominio globular principal de pUL53 (aa 88-292), Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag  | 52-61, 52-64, 52-65 | pHM2590 |
| pHM4765                      | ADNcp-Gancho de BFLF2 - Gancho de UL53 - dominio globular de UL53 - Flag | construcción de expresión eucariota que codifica la estructura de gancho N-terminal de BFLF2 (aa 73-94), la estructura de gancho C-terminal de pUL53 (aa 72-87) y el dominio globular principal de pUL53 (aa 88-292), Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag   | 52-61, 52-66        | pHM2590 |
| pHM4766                      | ADNcp-Gancho de BFLF2 - dominio globular de BFLF2 - Flag                 | construcción de expresión eucariota que codifica la estructura de gancho de BFLF2 (aa 73-110) y el dominio globular principal de BFLF2 (aa 111-318), Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag                                                                    | 52-62, 52-63        | pHM4698 |
| pHM4767                      | ADNcp-Gancho de UL53 - dominio globular de BFLF2 - Flag                  | construcción de expresión eucariota que codifica la estructura de gancho de pUL53 (aa 50-87) y el dominio globular principal de BFLF2 (aa 111-318), Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag                                                                     | 52-60, 52-63, 52-67 | pHM4698 |
| pHM4768                      | ADNcp-Gancho de BFLF2-Gancho de UL53-dominio globular de BFLF2 - Flag    | construcción de expresión eucariota que codifica la estructura de gancho N-terminal de BFLF2 (aa 73-94), la estructura de gancho C-terminal de pUL53 (aa 72-87) y el dominio globular principal de BFLF2 (aa 111-318), Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag  | 52-63, 52-66, 52-67 | pHM4698 |
| pHM4769                      | ADNcp-Gancho de UL53-Gancho de BFLF2-dominio globular de BFLF2 - Flag    | construcción de expresión eucariota que codifica la estructura de gancho N-terminal de pUL53 (aa 50-71), la estructura de gancho C-terminal de BFLF2 (aa 95-110) y el dominio globular principal de BFLF2 (aa 111-318), Fusionado C-terminalmente al epítipo de Flag | 52-63, 52-65        | pHM4698 |

Clonación Gateway

- 5 Los siguientes plásmidos codifican BFRF1-BFLF2 y BGLF4 construidos mediante la tecnología Gateway®. Las construcciones se generaron mediante amplificación por PCR de BFRF1, BFLF2 y BGLF4 usando los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 2.2. La construcción de fusión de BFRF1-BFLF2 se clonó inicialmente en ADNcp3.1(+) mediante *EcoRI*, *BamHI* y *XbaI*. Los fragmentos de BFRF1-BFLF2 (cortados del vector mediante *EcoRI* y *XbaI*) y BGLF4 (producto de PCR) se insertaron primero en pDONR221 y posteriormente en pInducer20 mediante recombinación homóloga.

Construcciones de clonación Gateway

| Número de clon interno | Designación               | Descripción                                                                                                                                                 | Cebadores de PCR                | Molde             |
|------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| pM4776sh               | ADNcp-BFRF1-BFLF2-Flag    | construcción de expresión eucariota que codifica una fusión de BFRF1 y BFLF2, fusionada C-terminalmente al epítipo de Flag y con el sitio de attB 1 y attB2 | M52-80, M52-81 y M52-82, M52-83 | pHM4697 y pHM4698 |
| pM4782sh               | pDONR221-BFRF1-BFLF2-Flag | clon de entrada que contiene BFRF1-BFLF2-Flag con sitio de attL1 y attL2                                                                                    |                                 | pM4776sh          |
| pM4783sh               | pDONR221-BGLF4-Flag       | clon de entrada que contiene BGLF4-Flag con sitio de attL1 y attL2                                                                                          | M52-84<br>M52-85                | pHM1720           |

(continuación)

| Número de clon interno | Designación               | Descripción                                                      | Cebadores de PCR | Molde    |
|------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|----------|
| pM4786sh               | pInducer-BFRF1-BFLF2-Flag | construcción de vector lentivírico que codifica BFRF1-BFLF2-Flag |                  | pM4782sh |
| pM4787sh               | pInducer-BGLF4-Flag       | construcción de vector lentivírico que codifica BGLF4-Flag       |                  | pM4783sh |

Tinción de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal de barrido láser

- 5 Para investigar el efecto de distintas proteínas herpesvíricas sobre la NE, se cultivaron células HeLa ( $3,5 \times 10^5$ ) sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos. Dos días después de la transfección las células se lavaron dos veces con PBSO y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4 % durante 10 min a TA y posteriormente se lavaron tres veces con PBSO. La permeabilización de la membrana plasmática se consiguió mediante incubación con Triton X-100 al 0,2 % en PBSO a 4 °C durante 15 min y posteriormente se lavó de nuevo con PBSO cinco veces. Para la tinción de
- 10 proteínas expresadas transitoriamente, las células se incubaron con los anticuerpos adecuados diluidos en 100 µl de PBSO/FCS al 1 % a 37 °C durante 60 min. Posteriormente, las células se lavaron tres veces y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios acoplados con fluorescencia diluidos en PBSO/FCS al 1 % durante 30 min a 37 °C. Finalmente, las células se montaron con medio de montaje Vectashield con/sin DAPI. Las células se analizaron usando un microscopio confocal de barrido láser TCS SP5 (Leica) y las imágenes se procesaron mediante el software
- 15 LAS AF (Leica Microsystems) y Photoshop CS5.

Coinmunoprecipitación

- 20 Se realizaron análisis por CoIP para investigar interacciones proteína-proteína específicas (Bannister y Kouzarides, 1996). Para este fin, se transfectaron células 293T ( $5 \times 10^6$ ) con los plásmidos que codifican las proteínas de interés. Un día antes de la CoIP, se incubaron sefarsa proteína A 50 mg/ml o 25 µl de proteína A en dynabeads con el anticuerpo adecuado en 500 µl de tampón de CoIP a 4 °C durante la noche. Las células se cosecharon dos o tres días después de la transfección. La lisis se realizó con 500 µl de tampón CoIP que contenía inhibidores de proteasa y
- 25 PMSF en hielo durante 20 min, se sometió a ultrasonidos (20 impulsos, 80 %) y se centrifugó (14000 rpm, 10 min, 4 °C). Para los controles de expresión se tomaron alícuotas de 50 µl de cada sobrenadante y se hirvieron en 50 µl de mezcla de ebullición 2x durante 10 min a 95 °C. Las dynabeads cargadas con anticuerpos o las perlas de sefarsa (lavadas tres veces con tampón de CoIP) se incubaron con los lisados durante 1,5 h a 4 °C. Después, las muestras se lavaron con tampón de CoIP cinco veces, se resuspendieron en 30 µl de mezcla de ebullición 2x y se hirvieron
- 30 10 min a 95 °C. La separación y el análisis de los complejos proteicos se realizaron mediante SDS-PAGE y transferencia Western.

Análisis por transferencia Western

- 35 Las muestras de proteínas obtenidas de CoIP o de lisados celulares se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia (200-300 mA durante 80 min). Las membranas se saturaron durante al menos 1 h con una solución de leche desnatada en polvo al 5 % para evitar la unión inespecífica de anticuerpos, seguido de la unión del anticuerpo primario diluido en solución de leche desnatada al 2,5 % a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con PBSO/Tween al 0,1 % durante 30 minutos y posteriormente se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario acoplado a HRP (en
- 40 solución de leche desnatada al 2,5 %) durante 1 h a TA. Finalmente, las membranas se lavaron de nuevo tres veces con PBSO durante 30 min, se incubaron brevemente en una solución de ECL recién preparada (10 ml de solución A de ECL, 100 µl de solución B de ECL y 3,1 µl de  $H_2O_2$ ) y las proteínas se detectaron mediante el uso del analizador de imágenes luminiscentes LAS-1000 de FUJIFILM (FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Alemania). Se usó un marcador de peso molecular teñido previamente para determinar el peso molecular y, por consiguiente, la
- 45 especificación de las bandas de proteínas. Para la tinción adicional de proteínas relevantes, las membranas se incubaron durante 20 min a 56 °C en tampón de separación Roti®-Free para eliminar los anticuerpos unidos. Después de la eliminación de los anticuerpos, las membranas se lavaron y se saturaron, seguido de una ronda adicional de unión de anticuerpos.

Generación de células inducibles, de expresión estable

- 50 Para generar una estirpe celular inducible de expresión estable, se realizó la tecnología Gateway® de Invitrogen/ Life technologies (Karlsruhe, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante para obtener un vector lentivírico con el gen de interés. Después del éxito de la clonación Gateway, puede procesarse la transducción lentivírica de las células
- 55 HFF.

Resultados combinados obtenidos a partir de análisis de coinmunoprecipitación (CoIP) usando proteínas procedentes de transfección transitoria

|                | $\alpha$ -herpesvirus | $\beta$ -herpesvirus |               | $\gamma$ -herpesvirus |
|----------------|-----------------------|----------------------|---------------|-----------------------|
|                | Orf27 del VZV         | pUL53 del HCMV       | pM53 del MCMV | BFLF2 del EBV         |
| Orf24 del VZV  | +                     | -                    | -             | nd                    |
| pUL50 del HCMV | -                     | +                    | +             | -                     |
| pM50 del MCMV  | nd                    | +                    | +             | -                     |
| BFRF1 del EBV  | nd                    | -                    | nd            | +                     |

+ = positivo para interacción por CoIP; - = negativo para interacción por CoIP; nd = no determinado

#### Análisis de la interacción de las proteínas del NEC central herpesvíticas

Se transfectaron transitoriamente células 293T con construcciones que codificaban pUL50 marcada con HA, pM50 o pUL27 (control negativo) en combinación con pUL53 o pM53. Tres días después de la transfección, las células se lisaron y las proteínas marcadas con HA se precipitaron usando pAb-HA o un fragmento Fc de anticuerpo de conejo como control de especificidad. Los controles de lisado tomados antes de las muestras de IP y CoIP se sometieron a análisis por transferencia Western convencional usando anticuerpos específicos de marcador, según se indica. De manera similar, se investigó la unión de pUL50 o pM50 a la proteína del núcleo específica del EBV BFLF2. Se transfectaron transitoriamente células 293T con construcciones que codificaban pUL50 marcada con HA, pM50, pUL44 y BFRF1 o para RFP. Se investigó la interacción de estas proteínas con BFLF2 transitoriamente coexpresada y marcada con Flag, pUL53 o pM53 mediante análisis por CoIP. Dos días después de la transfección, las células se lisaron y las proteínas marcadas con HA se inmunoprecipitaron usando mAb-HA, mAb-BFRF1 o un fragmento Fc de anticuerpo de ratón como control de especificidad. Los controles de lisado tomados antes de las muestras de IP y CoIP se sometieron a análisis por transferencia Western convencional y la expresión proteica se analizó usando anticuerpos específicos de marcador y de proteína. Finalmente, se realizó un análisis de la interacción entre Orf27 y pUL50. Se cotransfectaron transitoriamente construcciones que codificaban pUL50 marcada con HA, Orf24 (control positivo) o pUL44 y RFP (controles negativos) con Orf27 marcado con Flag en células 293T. Dos días después de la transfección, las células se lisaron y el Orf27 se inmunoprecipitó usando mAb-Orf27 o un fragmento Fc de anticuerpo de ratón como control de especificidad. Los controles de lisado tomados antes de las muestras de IP y CoIP se examinaron mediante análisis por transferencia Western convencional usando los anticuerpos específicos de marcador y específicos de proteína indicados.

#### Investigación de la formación del NEC central usando construcciones de intercambio de dominios

Se analizó además si los elementos estructurales, que median la interacción entre las dos proteínas del NEC central, del HCMV y el EBV, se conservan. Con el fin de investigar si BFLF2 forma una estructura de gancho, que media la interacción con BFRF1, se generaron varias construcciones de intercambio de dominios. Estas construcciones albergan intercambios de los elementos estructurales de gancho y la parte N-terminal de los dominios globulares de acuerdo con alineaciones de un estudio previo (Milbradt *et al.*, *J Biol Chem*, 2012). La generación de construcciones de intercambio de dominios se realizó usando las estructuras de gancho y la parte N-terminal de los dominios globulares de pUL53 y BFLF2. Para la detección de estas construcciones, se unió C-terminalmente un marcador Flag. De este modo, la estructura de gancho (aa 50-87) o la porción N-terminal adicional del dominio globular (aa 88-292) de pUL53 se intercambió con las respectivas secuencias previstas de BFLF2 (aa 73-110 o aa 111-318). Adicionalmente, la estructura de gancho se subdividió en una parte C-terminal (aa 50-71 de pUL53 o aa 73-94 de BFLF2) y N-terminal (aa 72-87 de pUL53 o aa 95-110 de BFLF2) y se intercambió adicionalmente en varias combinaciones. En las siguientes secciones, la parte N-terminal del gancho se abrevia HN y la parte C-terminal HC, mientras que el dominio globular se denomina GLOB. Las partes de pUL53 aparecen en mayúsculas y las de BFLF2 en minúsculas (véase la Fig. 8).

#### Conclusión extraída de los hallazgos de CoIP obtenidos con las construcciones de intercambio de dominios del NEC central de HCMV-EBV

Combinada, esta primera serie de construcciones de intercambio de dominios no consiguió la estabilidad deseada de las proteínas expresadas. Por este motivo, los datos de CoIP quedaron incompletos (por ejemplo, véase la falta de señal positiva en el carril 8 de control positivo en la Fig. 8 panel C) y, por lo tanto, la extracción de conclusiones directas fue limitada. Se obtuvo una reacción de tres de las construcciones de intercambio de dominios de gancho con pUL50-HA del HCMV (que contenía el surco del NEC del HCMV), es decir, la Fig. 8, panel B, carriles 2, 4 y 7, sin embargo, no se pudo llegar a una conclusión clara sobre la importancia de cada uno de los fragmentos de proteína intercambiados. No se obtuvo ninguna reacción o sólo una reacción de nivel bajo (especificidad de la reacción poco clara) de las construcciones de intercambio de dominios de gancho con BFRF1-HA del EBC (que contenía el surco del NEC del EBV), es decir, la Fig. 8, panel C.

Experimentos de CoIP adicionales con otra combinación de proteínas de HCMV, MCMV, EBV y VZV tampoco

permitieron hasta ahora llegar a una conclusión clara sobre la importancia de los dominios proteicos individuales en los dominios proteicos homólogos o heterólogos en esta fase del análisis.

En la actualidad, se ha clonado una segunda serie de construcciones de intercambio de dominios (que contenían extremos N completos y sin modificar de los fragmentos de proteína de gancho, con el fin de mejorar la estabilidad de la proteína) y ahora se ha empezado a analizar de forma similar en experimentos de CoIP.

Asimismo, el análisis del reclutamiento de la proteína cinasa pUL97 del HCMV expresada transitoriamente por las diversas proteínas del NEC central herpesvíricas no proporcionó un resultado totalmente concluyente (Fig. 9).

Cabe destacar que, este tipo de experimentación, basándose en los datos mostrados en las Figuras 7 a 11 y en la Tabla 1, condujo a la información preliminar de que se proporciona una similitud muy limitada de las proteínas del NEC central víricas en los niveles de bioquímica de proteínas e interacción por CoIP, en comparación entre HCMV, MCMV, EBV y VZV. Se podría especular que no se proporciona ninguna base para encontrar regiones idénticas de proteína de NEC como posible diana para el posicionamiento de posibles inhibidores del NEC pan-herpesvíricos. Sin embargo, este prejuicio se ha superado sorprendentemente, tras tener en cuenta los nuevos datos de estructura cristalina.

#### Cristalización de nuevas proteínas de fusión de NEC

El procedimiento recientemente identificado de clonación de dos fragmentos de NEC herpesvíricos en construcciones de fusión, es decir, fusionar una región de gancho (tal como BFLF2 del EBV o pUL53 del HCMV) directamente a una región de surco (tal como BFRF1 del EBV o pUL50 del HCMV), abrió posibilidades fuertemente mejoradas de cristalización de proteínas. Las dos estructuras cristalinas 3D novedosas de las construcciones de fusión

- \* BFRF1-BFLF2 del EBV y
- \* pUL50-pUL53 del HCMV

dieron como resultado una mejora sustancial de la información estructural de los complejos NEC centrales.

### **SECUENCIAS DE LOS POLIPÉPTIDOS UTILIZADOS EN EL PRESENTE DOCUMENTO**

#### **SEQ ID NO: 1**

*Proteína de fusión pUL50-pUL53 del HCMV para investigaciones estructurales y funcionales.*

En esta construcción, la proteína pUL50 que consiste en pUL50 (1-171) se fusiona mediante un enlazador GGSGSGGS (en negrita) a pUL53 (59-292).

MEMNKKVLHQDLVQATRRILKLGPSSELVTDAGLICKNPNSVCDAMLKTDVYCV EYLLSY  
WESRTDHPVPCFIFKNTGCAVSLCCFVRAPVKLVSPARHVGEFNVKVNESLIVTLKDIEEIKPS  
AYGVLTKCVVRKSNSASVFNIELIAFGPENEGEYENLLRELYAKKAGGSGSGGSLTLHDLHDI  
FREHPELELKYLNNMMKMAITGKESICLPNFHSHRQHTCLDISPYGNEQVSRIACTSCEDNRIL  
PTASDAMVAFINQTSNIMKNNRNFYYGFCKSSELLKLSTNQPPFQIYYLLHAANHDI VPFMHA  
EDGRLHMHVIFENPDVHIPDCITQMLTAAREDYSVTLNIVRDHVVISVLCHAVSASSVKIDV  
TILQRKIDEMDIPNDVSESFERYKELIQELCQSSG

#### **SEQ ID NO: 2**

*Proteína de fusión pUL50-pUL53 truncada del HCMV para investigaciones estructurales y funcionales.*

En esta construcción, la proteína pUL50 que consiste en pUL50 (1-171) se fusiona mediante un enlazador GGSGSGGS (en negrita) a pUL53 (59-87).

MEMNKKVLHQDLVQATRRILKLGPSSELVTDAGLICKNPNSVCDAMLKTDVYCV EYLLSY  
WESRTDHPVPCFIFKNTGCAVSLCCFVRAPVKLVSPARHVGEFNVKVNESLIVTLKDIEEIKPS  
AYGVLTKCVVRKSNSASVFNIELIAFGPENEGEYENLLRELYAKKAGGSGSGGSLTLHDLHDI  
FREHPELELKYLNNMMKMAIT

#### **SEQ ID NO: 3**

*Proteínas de fusión BMRFI-BMLF2 del EBV para investigaciones estructurales y funcionales.*

En esta construcción BFRF1 del EBV que consistía en BFRF1 del EBV (entrada Uniprot: V5KTU9, 1-MASPEERLLD.....SDMSQQLS-192) se fusiona mediante un enlazador GGSGS (negrita) a BFLF2 del EBV

(entrada Uniprot: K9UT32, 78-DRSHFSLRD..... INYTQLILENKQ-318).

MASPEERLLDELNNVIVSFLCDSGSLEVERCSGAHVFSRGSSQPLCTVKLRHGQIYHLEFVYK  
FLAFKLKNCNYPSSPVFVISNNGLATTLRCFLHEPSGLRSGQSGPCLGLSTDVDLPKNSIIMLG  
QDDFIKFKSPLVFPALDLLKSMVVCRAITEHRTTMQFLVFQAANAQKASRVMDMISDMSQ  
QLSGSGSGDRSHFSLRDFFRGISANFELGKDFLREMNTPIHVSEAVFLPLSLCTLSPGRCLRLSP

FGHSLTLGSHCEICINRSQVHVPQEFSSQLSFFNNVHKHPNKTFYVSLLSSSPSAVKAGLSQPS  
LLYAYLVTGHFCGTICPIFSTNGKGRLLIMHLLQGTSLHIPETCLKLLCENIGPTYELAVDLVG  
DAFCIKVSPRDTVYEKAVNVDEDAIYEAIKDLECGDELRLQIINYTQLILENKQ

#### 5 **SEQ ID NO: 4**

*Proteína de fusión BMRF1-BMLF2 truncada del EBV para investigaciones estructurales y funcionales.*

En esta construcción BFRF1 del EBV que consistía en BFRF1 del EBV (entrada Uniprot: V5KTU9, 1-  
10 MASPEERLLD..... SDMSQQLS-192) se fusiona mediante un enlazador GSGGS (negrita) a BFLF2 del EBV  
(entrada Uniprot: K9UT32, 78-DRSHFSLRD..... -110).

MASPEERLLDELNNVIVSFLCDSGSLEVERCSGAHVFSRGSSQPLCTVKLRHGQIYHLEFVYK  
FLAFKLKNCNYPSSPVFVISNNGLATTLRCFLHEPSGLRSGQSGPCLGLSTDVDLPKNSIIMLG  
QDDFIKFKSPLVFPALDLLKSMVVCRAITEHRTTMQFLVFQAANAQKASRVMDMISDMSQ  
QLSGSGSGDRSHFSLRDFFRGISANFELGKDFLREMNTPIH

#### 15 **SEQ ID NO: 5**

*Proteína de fusión ORF24-ORF27 del VZV para investigaciones estructurales y funcionales.*

En esta construcción orf24 del VZV que consistía en orf24 del VZV (entrada Uniprot: Q6QCN1, 16- GDNLLQRI  
..... TDAYM-189) se fusiona mediante un enlazador GSGSGGS (negrita) a orf27 del VZV (entrada Uniprot:  
20 Q6QCM8, 77-SKERSV..... FDDFVPPR-333).

GDNLLQRIQLVVPALQCCDGDLPIDPQRPPARCVFQFNGEDNVSEAFPVEYIMRLMANWA  
QVDCDPYIKIQNTGVSFLFQGGFFRPTNAPVAEVSIDSNNVILSSTLSTGINLSALESIKRGGGID  
RRPLQALMWVNCFVRMPYVQLSFRFMGPEDPSRTIKLMARATDAYMGSGSGSGSSKERSVY  
RHYFNYIARSPPEELATVRGLIVPIIKTTPVTLFENLGQTVADNCLSLSGMGYHLGLGGYCPTC  
TASGEPLRCRTDRAALILAYVQQLNNIYERYVFLASILASDRANMQAASAEPPLSSVLAQPE  
LFFMYHIMREGGMRDIRVLFYRDGDAGGEMMYVIFPGKSVHLHYRLIDHIQAACRGYKIVAH  
VWQTTFLLSVCRNPEQQTETVPSIGTSDVYCKMCDLNFDEGELLLEYKRLYALFDDFVPPR

#### 25 **SEQ ID NO: 6**

*Proteína de fusión ORF24-ORF27 truncada del VZV para investigaciones estructurales y funcionales.*

En esta construcción orf24 del VZV que consistía en orf24 del VZV (entrada Uniprot: Q6QCN1, 16- GDNLLQRI  
..... TDAYM-189) se fusiona mediante un enlazador GSGSGGS (negrita) a orf27 del VZV (entrada Uniprot:  
30 Q6QCM8, 77-SKERSV ..... RGLIVPII 109).

GDNLLQRIQLVVPALQCCDGDLPIDPQRPPARCVFQFNGEDNVSEAFPVEYIMRLMANWA  
QVDCDPYIKIQNTGVSFLFQGGFFRPTNAPVAEVSIDSNNVILSSTLSTGINLSALESIKRGGGID  
RRPLQALMWVNCFVRMPYVQLSFRFMGPEDPSRTIKLMARATDAYMGSGSGSGSSKERSVY  
RHYFNYIARSPPEELATVRGLIVPII

#### 35 **SEQ ID NO: 7**

LTLHDLHDIFREHPELELKYLNMMKMAIT

Secuencia de aminoácidos de la estructura de gancho N-terminal de pUL53 del HCMV (cepa AD169; número de  
35 referencia P16794). A partir de dicha estructura primaria o de homólogos de la misma, se derivan las estructuras  
secundaria, terciaria y cuaternaria de la estructura de gancho N-terminal divulgada (véanse las FIG. 1 y 2).

#### **SEQ ID NO: 8**

MSSVSGVTRTPRERRSALRSLLRKRRQRELASKVASTVNGATSANNHGEPPSPADARPRLTLH  
DLHDIFREHPELELKLYLNMMKMAITGKESICLPFNHSHRQHTCLDISPYGNEQVSRIACTS  
CEDNRILPTASDAMVAFINQTSNIMKNRNFYYGFCKSSELLKLSTNQPPIFQIYYLLHAANHDI  
VPFMHAEDGRLHMHVIFENPDVHPCDCITQMLTAAREDYSVTLNIVRDHVVISVLCHAVSAS  
SVKIDVTILQRKIDEMDIPNDVSESFERYKELIQELCQSSGNNLYEEATSSYAIRSPLTASPLHV  
VSTNGCGPSSSSQSTPPHLHPPSQTQPHHYSHHQSQSQQHHHRPQSPPPPLFLNSIRAP

- 5 Secuencia de aminoácidos de la proteína pUL53 del HCMV mostrada como estructura primaria (cepa AD169; número de referencia P16794). Dentro de la SEQ ID NO: 8, la estructura primaria de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**SEQ ID NO: 9**

MEMNKVLHQDLVQATRRILKLGPSELRVTDAGLICKNPYVCDAMLKTDTVYCVEYLLSY  
WESRTDHVPCFIFKNTGCAVSLCCFVRAPVKLVSPARHVGEFNVKVNESLIVTLKDIEEIKPS  
AYGVLTKCVVRKSNSASVFNIELIAFGPENEGEYENLLRELYAKKAASSTLAVRNHVTVSSH  
GSGPSLWRARMSAALTRTAGKRSSRTASPPPPRHPSCSPTMVAAGGAAAGPRPPPPMAAG  
SWRLCRCEACMGRCGCASEGDADEEEEELLALAGEGKAAAAAAGQDVGGSSARRPLEEHVS  
RRRGVSTHHRHPPSPPCAPSLERTGYRWAPSSWWRARSGPSRPQSGPWLPAFATLGPLVLA  
LLLVLALLWRGHGQSSSPTRSAHRD

- 10 Secuencia de aminoácidos de la proteína pUL50 del HCMV mostrada como estructura primaria (cepa AD169; número de referencia P16794).

**Homólogos de la proteína pUL53 del HCMV**

- 15 **SEQ ID NO: 10**

MYDTPHRRGSRPGPYHGKERRRSRSSAAGGTLGVVRRASRKSLPPHARKQELCLHERQRY  
**RGLFAALAQTPSEEIAIVRSLSVPLVKTTTPVSLPFCLDQTVADNCLTSLGMGYLLGIGGCCP**  
ACNAGDGRFAATSREALILAFVQQINTIFEHRAFLASLVVLADRHNAPLQDLLAGILGQPELFF  
VHTILRGGGACDPRLLFYDPPTYGGHMLYVIFPGTSAHLHYRLIDRMLTACPGYRFVAHVWQ  
STFVLVVRNAEKPTDAEIPTVSAADIYCKMRDISFDGGLMLEYQRLYATFDEFPPP

- 20 Secuencia de aminoácidos de UL31 de la cepa 17 del HSV-1 (P10215). Dentro de la SEQ ID NO: 10, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**SEQ ID NO: 11**

MYDIAPRRSGSRPGPRDKTRRRSRFSAAGNPGVERRASRKSLPSHARRLELCLHERRRYRG  
**FFAALAQTPSEEIAIVRSLSVPLVKTTTPVSLPFSLDQTVADNCLTSLGMGYLLGIGGCCPACS**  
AGDGRLATVSREALILAFVQQINTIFEHRTFLASLVVLADRHSTPLQDLLADTLGQPELFFVHT  
ILRGGGACDPRLFLYDPPTYGGHMLYVIFPGTSAHLHYRLIDRMLTACPGYRFAAHVWQSTF  
VLVVRNAEKPADAEIPTVSAADIYCKMRDISFDGGLMLEYQRLYATFDEFPPP

- 25 Secuencia de aminoácidos de UL31 de la cepa HG52 del HSV-2 (P89454). Dentro de la SEQ ID NO: 11, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

- 30 **SEQ ID NO: 12**

MHLKPTRFFHANQPPMPHSYEMEDLCFDDMQYRWSPSNTPYRSMRKYKSVSRSGPSMRVR  
 SRTPCRRQTIRGKLMSKERSVYRHYFNIAIRSPPEELATVRGLIVPIIKTTPVTLPFNLGQTV  
 ADNCLSLSGMGYHLGLGGYCPTCTASGEPRLCRTDRAALILAYVQQLNNIYEYRVFLASILAL  
 SDRANMQAASAEPLLSSVLAQPELFFMYHIMREGGMRDIRVLFYRDGDAGGFMMYVIFPGK  
 SVHLHYRLIDHIQAACRGYKIVAHVWQTTFLSVCRNPEQQTETVVPSIGTSDVYCKMCDLN  
 FDGELLLEYKRLYALFDDFVPPR

Secuencia de aminoácidos del ORF27 de la cepa Dumas del VZV (P09283). Dentro de la SEQ ID NO: 12, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**SEQ ID NO: 13**

MTVHKSRIRRSRSLSVTHRIQKRPDREKTKLYLQKLHDLHTVFNLFPPEYEQKFLAIHKLP  
 TGKEPIDVPFSLSNHHQHTCLEFSPYANEQISKSACLHCEVSVPTSSDAMVAHLNQVNNVM  
 QNRLYFYGFRKDMELIRMSAKQPTIFQIFYIVHNTINNIFPIMFERKQKLGMHIVFQSRTLHIPC  
 ECIKQIVAVSSGYNVYLDILQESVILTVLCETLDTNTNIHIDIGMLQKKLEEMDIPNEISDRLEK  
 YKGHLIGFH

Secuencia de aminoácidos de U37 de la cepa Uganda-1102 del HHV-6A (P28865). Dentro de la SEQ ID NO: 13, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**SEQ ID NO: 14**

MTVHKNRFRRSRSLSVTHRIQKRPDREKTKLYLQKLHDLHAVFNLFPPEYEQKFLAIHKLP  
 ITGKEPIDVPFSLSNHHQHTCLEFSPYANEQISKSACLHCEVSVPTSSDAMVAHLNQVTNVM  
 QNRFYFYGFRKDMELIRMSAKQPTIFQIFYIVHNTINNIFPIMFEKKQKLGMHIVFQSRTLHIPC  
 ECIKQIIAVSSGYNVYLDILQDSVILTVLCETLDTNTNIHIDIGMLQKKLEEMDIPNEISDRLEKY  
 KGHHLIGFH

Secuencia de aminoácidos de UL37 de la cepa HST del HHV-6B (Q9WT27). Dentro de la SEQ ID NO: 14, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**SEQ ID NO: 15**

MAIQSTRRLRRASSLLKSKPYNKEKTNLSLSLSLKEHLSVFKLFPEYELKFLNMMKLPITG  
 KEPIKIPFDLSLHHQHTCLDLSPYANEQVSKSACVNCGTNIPASDAMVAYMNQISNVMQN  
 RLYYYGFQKKVELIRMSAKQPTLFFQIFYILSSIASNFLPIMFENNEKLNMYVVFQTRTLHIPCEC  
 INQIMTVSSGYTVLLDILHDSIVLHVLCETIETSNIQIDINVLQRKIEEMDVPDEIGDKFEKLKHI  
 LPFI

Secuencia de aminoácidos de UL37 de la cepa JI del HHV-7 (P52361). Dentro de la SEQ ID NO: 15, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**SEQ ID NO: 16**

MAPVTPDAVNARQQRPADPALRRLMHPHHRNYTASKASAHSVKSVSRGKSRSELGRMER  
 VGSVARSICSRIITRHGVDRSHIFSLRDFFRGISANFELGKDFLREMNTPIHVSEAVFLPLSLCT  
 LSPGRCLRLSPFGHSLTLGSHCEICINRSQVHVPOEFSSTQLSFFNNVHKIIPNKTFYVSLSSSP  
 SAVKAGLSQPSLLYAYLVTGHFCGTICPIFSTNGKGRIMHLLLQGTSLHIPETCLKLLCENIGP  
 TYELAVDLVGDAFCIKVSPRDTVYEKAVNVDEDAIYEAIKDLECGDELRLQIINYTQLILENK  
 Q

Secuencia de aminoácidos del BFLF2 de la cepa P95-8 del EBV (P0CK47). Dentro de la SEQ ID NO: 16, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**SEQ ID NO: 17**

MPKSVSSHISLATSTGRSGPRDIRRCLSSRLRSVPPGARASVSSKHRNGLRKFISDKVFFSILS  
**HRHELGVDFLREMETPICTSKTVMLPLDLSTVAPGRCVSLSPFGHSSNMGFQCALCPSTENP**  
 TVAQGSRPQTMVGDALKKNNELCSVALAFYHHADKVIQHKTFYLSLLSHSMDVVVRQSFLQP  
 GLLYANLVLKTFGHDPLPIFTTNGMLTMCILFKTRALHLGETALRLMDNLPNYKISADCCR  
 QSYVVKFVPTHPTASIAVQVHTICEAVAALDCTDEMRDDIQGTALVNAL

Secuencia de aminoácidos de ORF67 de la cepa GK18 del HHV-8 (F5H982). Dentro de la SEQ ID NO: 17, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**SEQ ID NO: 18**

MFERRRLLRRKSSAARRKTLTRAARDRYAPYFAYAAAQPSDEVTTVRGLSNPLIKTAPVTL  
 PFDLGQAVADNCLSLSGMGYYLGLGGCCPTCAAAEPRLGRSDRAALVLAYVQQLNSIYEYR  
 VFLASVAARDPSERALEEVLAHPELFFAYYVLRDGGRLDVRVLFFEDPDAQGALMMYVVF  
 EKSVMVHHRVLDRLGACAGHRIVAHVWQTMFVLVVRKKGDGRPADDPVAVSASDIYCKM  
 RDISFDGELLLEYKRLYAAFEDFRPPRP

Secuencia de aminoácidos del UL34 de la cepa Kaplan del PrV (Q911V7). Dentro de la SEQ ID NO: 18, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**SEQ ID NO: 19**

MFRSPEGEERDAADREEEEGGEARRRSRMMMSPRRVKRARHRPAGSGLRTPLRSPSACRCSS  
 PSPERQWQQRRAEKRSTTPTDPPPPPKRSAASAAAGAAPESEYLVNKLSELHDVFQRHPD  
**LEQKYLKIMKLPITGKESIRLPDFKSHRQHTCLDLSPYGNDQVSRSACTTCKETTRLPTASD**  
 SMVAFINQTSNVMKHRKFYFGFRKNMELLKMAANQPQLFQIYYIVQSCVQEIVPLIYYDREM  
 AHMQLIFEKETVHIPSQCIEQILTVAKDAYGVSLDIAHQRITLTARCLRLESSSLRIDVLMQLRK  
 VDELEIPNETNEKFESYSL

Secuencia de aminoácidos de pM53 del MCMV (H2A291). Dentro de la SEQ ID NO: 19, la estructura primaria homóloga de la estructura de gancho N-terminal, divulgada por la invención (véanse las FIG. 1 y 2), está resaltada en negrita.

**HOMÓLOGOS DE LA PROTEÍNA PUL50 DEL HCMV**

**SEQ ID NO: 20**

MAGLGKPYTGHPGDAFEGLVQRIRLIVPSTLRGGDGEAGPYSPSSLPSRCAFQFHGHDGSDS  
 FPIEYVLRLMNDWAEVPCNPYLRIQNTGVSVLFQGGFFHRPHNAPGGAITPERTNVILGSTETT  
 LSLGDLDTIKGRLGLDARPMMAWMWISCFVRMPRVQLAFRFMGPEAGRTRRILCRAAEQAI  
 TRRRRTRRSREAYGAEAGLVAGTGFRARGDGFGLPLLTQGPSRPWHQALRGLKHLRIGPP  
 ALVLAAGLVLGAAIWWVVGAGARL

Secuencia de aminoácidos de UL34 de la cepa 17 del HSV-1 (p10218).

**SEQ ID NO: 21**

MAGMGKPYGGRPGDAFEGLVQRIRLIVPATLRGGGGESGPYSPSNPPSRCAFQFHGQDGSDE  
AFPIEYVLRLMNDWADVPCNPYL RVQNTGVS VLFQGGFFNRPHGAPGGAITAEQTNVILHSTE  
TTGLSLGDLDDVKGRLGLDARPMASMWISCFVRMPRVQLAFRFMGPEDAVRTRRILCRAA  
EQALARRRRSRRSQDDYGAVVVAAAHHSSGAPGPGVAASGPPAPPGRGPARPWHQAVQLFR  
APRPGPPALLLLAAGLFLGAAIWWAVGARL

Secuencia de aminoácidos de UL34 de la cepa HG52 del HSV-2 (P89457).

**SEQ ID NO: 22**

5

MSRRTYVRSERRRGCGDNLLQRIRLVVPSALQCCDGDLPIDPQRPPARCVFQFNGEDNVSEA  
FPVEYIMRLMANWAQVDCDPYIKIQNTGVS VLFQGGFFRPTNAPVAEVSIDSNNVILSSTLSTG  
INLSALESIKRGGGIDRRPLQALMWVNCFVRMPYVQLSFRFMGPEDPSRTIKLMARATDAYM  
YKETGNNLDEYIRWRPSFRSPENGSPNTSVQM QSDIKPALPDTQTTRVWKLALPVANVTYA  
LFIVIVLVVVLGAVLFWK

Secuencia de aminoácidos del ORF24 de la cepa Dumas del VZV (P09280).

**SEQ ID NO: 23**

10

MANVLKEKMYDELLSATCRILKLGSHDYRITERNLLSKNPKFPLCDIILKLDYAYNLEYLLSL  
WEHVTKEQEPFRVFKNTGGAVSMSCYLHAPVKVEGHHAVRECNI LRVNECLTVRMSDIVAM  
KPSTFAVFTKCIIRNRDDTYVVEFVAFGPENESEYISLLKAIFLKKCSMGKQHLESNRFCQGL  
RRRSSHVLEKGRFESSGKVVNKASAVVTSQESIKQFYEKEKSLLSGVKFWRLSERHCRFALV  
GICFLLALYFCYVLLKKTPTPASGSVV

Secuencia de aminoácidos de U34 de la cepa Uganda-1102 del HHV-6A (P52465).

**SEQ ID NO: 24**

15

MANVLKEKMYDELLSATCRILKLGSHDYRMTERNLLSKNPKFPLCDIILKLDYAYNLEYLLSL  
WEHVTKEQEPFRVFKNTGGAVSMSCYLHAPVKAEGHHAVRECNI LRVNECLTVRMSDIVAM  
KPSTFAVFTKCIIRNRDETYVVEFVAFGPENESEYISLLKAIFLKKCSMGKQHLESNRFCQGL  
RRRSSHVLEKGLGSSGEIANKASAVVTSQESINQFYEKEKSFLSGVKFSRLSERHCRVAIVSI  
CFLLALYFCYVLLKKTPTPASGPVV

Secuencia de aminoácidos de U34 de la cepa Z29 del HHV-6B (Q9QJ35).

**SEQ ID NO: 25**

20

MLKEKMYDELILSTCRVLKLGPA DFRVTDKNLFSKNPKFPLCDILLKLDFAYSLEYLLSLWED  
LTKQEARFIFKNTGGAVSMSCYLHAPIKQESQNIVKECNILNVNECLSVCLNDIEAIKPSSSGV  
LTKCIIRNRDAAFIVEFVAFGPESSEYIALLKAILKKKFLERQDLEKHRAARHIKKPLRLQL  
KSVGEMTSFRSINYMGNTKDAAVFPVTVPIFARRNNILCGFLVAALLIVCYVIFKEFALSADFS  
AV

25

Secuencia de aminoácidos de U34 de la cepa JI del HHV-7 (P52466).

**SEQ ID NO: 26**

MASPEERLLDELNNVIVSFLCDSGSLEVERCSGAHVFSRGSSQPLCTVKLRHGQIYHLEFVYK  
FLAFKLKNCNYPSSPVFVISNNGLATTLRCFLHEPSGLRSGQSGPCLGLSTDVDLPKNSIIMLG  
QDDFIKFKSPLVFPALDLLKSMVVCRAYTEHRTTMQFLVFQAANAQKASRVMDMISDMSQ  
QLSRSGQVEDTGARVTGGGGPRPGVTHSGCLGDSHVRGRGGWDLDNFSEAETEDASYAPW  
RDKDSWSESEAAPWKELVRHPIRRHRTRRETRMRGSHSRVEHVPPETRETVVGGAWRYSW  
RATPYLARVLAVTAVALLMFLRWT

Secuencia de aminoácidos del BFRF1 de la cepa B95-8 del EBV (P03185).

**SEQ ID NO: 27**

5

MSVVGKRVVDELRCRVVSSYLQSGQSLDLERCIDGAPVYAKGGATAICTVRMQHGCVYHLE  
FVYKFWAHLLEEMHYFSPCFVISNNGLSTTLKCFLCRPSDAVSQFGHVLPESDVYLAKNTS  
VVLGQDDFTKFKASLVFSKNLGVYNMVICRTYFTDYRQVLQFLVVTPKSHKRLKSLETVY  
CLAAPVADSAAQGGAGFPTNGRDARACTSDVTAVYWAGQGGRTVRILGAFQWSLGRAVAL  
VRRSWPWISAGIAFLCLGLVWMRPS

Secuencia de aminoácidos de ORF67 de la cepa GK18 del HHV-8 (Q76RF3).

**SEQ ID NO: 28**

10

MSGTLVQRLKLILSGGNLRCSDGETACDPERPPTRCVFQVHGQDGSNDTFPLEYVLRLMRSW  
AHVPCDPYVRVQNTGVSVLFQGGFFRPADAPLAITAETHNNVILASTHSTGMSLSALDDIKRA  
GGVDTRPLRAMMSVSCFVRMPRVQLSFRFMGPDDASQTQRLLDRAEMRQRSVSRPGGGAG  
GGDDGEGPSPRAPIRPTVISPVPGHAAAAFVGQAAYPPPARFPASLLHTLLGLRRLAGYAVAC  
VTGALAIVILNMR

Secuencia de aminoácidos del UL34 de la cepa Kaplan del PrV (Q9ICS7).

**SEQ ID NO: 29**

15

MEIDKNVGADLISNTRRILRLDENELRITDTALICKNPNYSLCDAMLTDDIVYPVEYLLSYWEC  
RSGRTACFVFKNTGCRVSLSCYIGFPERLKDLKRVCDNFSLSVNEALVVTADIERIKPCDKG  
VLTNCVVRKSNSGMSYNIEVVAFGPDNEAEYQALLRDIYARRMTSVPTDCGSLICRRARCLA  
AAPRRPPPPPPGQRWGSRLKHGPNLTRYAGGGGAANKQPAASPTSTSTSSPAAPSRDQD  
QTQRPPAGDTNVTAAETTYSSERTISFLTRHANAIHCALILAAIALVLLWLLYWHAARSAGH  
P

20 Secuencia de aminoácidos de pM50 del MCMV (H2A365).

**Secuencias de homólogos de pUL53 del HCMV para la estructura de gancho N-terminal del péptido diana de la invención**

25

**SEQ ID NO: 30**

RYRGLFAALAQTPEEIAIVRSLSVPLV

Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal de UL31 del HSV-1 basada en la homología con la secuencia de pUL53 del HCMV SEQ ID NO: 7.

30

**SEQ ID NO: 31**

RYRGFFAALAQTPEEIAIVRSLSVPLV

Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal de UL31 del HSV-2 basada en la homología con la secuencia de pUL53 del HCMV SEQ ID NO: 7.

35

**SEQ ID NO: 32**

VYRHYFNFIARSPPEELATVRGLIVPII

Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal del VZV ORF27 basada en la homología

con la secuencia de pUL53 del HCMV SEQ ID NO: 7.

**SEQ ID NO: 33**

KLHDLHTVFNLFPEYEQKFLAIKLPIT

5 Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal de U37 del HHV-6A basada en la homología con la secuencia de pUL53 del HCMV SEQ ID NO: 7.

**SEQ ID NO: 34**

KLHDLHAVFNLFPEYEQKFLAIKLPIT

10 Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal de U37 del HHV-6B basada en la homología con la secuencia de pUL53 del HCMV SEQ ID NO: 7.

**SEQ ID NO: 35**

SLKELHSVFKLFPEYELKFLNMMKLPIT

15 Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal de U37 del HHV-7 basada en la homología con la secuencia de pUL53 del HCMV SEQ ID NO: 7.

**SEQ ID NO: 36**

SLRDFFRGISANFELGKDFLREMNTPIH

20 Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal de BFLF2 del EBV basada en la homología con la secuencia de pUL53 del HCMV SEQ ID NO: 7.

**SEQ ID NO: 37**

SDKVFFSILSHRHELGVDFLREMETPIC

25 Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal de ORF67 del HHV-8 basada en la homología con la secuencia de pUL53 del HCMV SEQ ID NO: 7.

**SEQ ID NO: 38**

RYAPYFAYAAAQPSDEVTTVRGLSNPLI

30 Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal de UL34 del PrV basada en la homología con la secuencia SEQ ID NO: 7 de pUL53 del HCMV.

**SEQ ID NO: 39**

KLSELHDVFQRHPDLEQKYLKIMKLPIT

35 Secuencia de aminoácidos prevista de la estructura de gancho N-terminal de pM53 del MCMV basada en la homología con la secuencia SEQ ID NO: 7 de pUL53 del HCMV.

Análisis bioinformáticos para la solicitud de patente

40 Las estructuras cristalinas de los complejos pUL50-pUL53 del HCMV, BFRF1-BFLF2 del EBV y orf24-orf27 del VZV, que forman parte de esta solicitud de patente, revelaron una gran similitud estructural de la interacción de gancho en surco a pesar de un nivel bajo de similitud de secuencia. Esto plantea la cuestión de si los restos presentes en posiciones de secuencia equivalentes en las diferentes proteínas de gancho herpesvíricas desempeñan funciones similares en las respectivas interacciones de surco de los NEC centrales de los tres herpesvirus. Para ese fin, se usó la bioinformática para calcular las contribuciones energéticas (valores  $\Delta G$  en la Fig. 13) de las cadenas laterales de aminoácidos individuales en las respectivas proteínas de gancho herpesvíricas para la interacción. Los análisis energéticos se realizaron usando el programa Fold-X (46). La Fig. 13 muestra que el perfil energético está muy conservado entre las proteínas de gancho de diferentes herpesvirus, lo que indica la presencia de puntos calientes comunes de la interacción que pueden aprovecharse para el diseño de ligandos.

50 La similitud en los perfiles energéticos de las proteínas de gancho (Fig. 13) sugiere que debería ser factible el diseño de una secuencia de gancho común ("gancho compartido") que encaje en los surcos de diferentes proteínas herpesvíricas. Por lo tanto, se estableció un flujo de trabajo computacional que permite el diseño de dichos ganchos compartidos. Para el desarrollo de los métodos, como sistemas modelo se usaron los complejos pUL50-pUL53 del HCMV, BFRF1-BFLF2 del EBV, que forman parte de esta solicitud de patente. La idea básica del enfoque consiste en reemplazar cada resto de cada gancho por uno de los 20 tipos de aminoácidos existentes y medir la energía de interacción con las correspondientes proteínas de surco autólogas o no autólogas. Para la secuencia del gancho compartido se sugieren aquellos tipos de aminoácidos que encajan tanto en los surcos de pUL50 del HCMV como de BFRF1 del EBV.

60 Los resultados de este enfoque se explican con más detalle usando como ejemplo la posición 59 de la secuencia de pUL53 del HCMV (Fig. 14). El resto respectivo en pUL53 del HCMV es una leucina y el resto estructuralmente equivalente en BFLF2 del EBV es una fenilalanina. El análisis computacional (Tabla 1) muestra que tanto pUL53 del HCMV como BFLF2 del EBV toleran una fenilalanina (cambio de  $-0,65$  kcal/mol y  $0,00$  kcal en la energía de unión, respectivamente, en comparación con las secuencias de gancho de tipo silvestre). Para la posición de secuencia adyacente C-terminal (treonina en HCMV y serina en EBV; Fig. 14), una tirosina representa un buen aminoácido de

compromiso para un gancho compartido. No afecta a la interacción en EBV (0,00 kcal/mol) y sólo conduce a una afinidad moderadamente reducida (0,88 kcal/mol) para el HCMV. La aplicación de este enfoque a todas las posiciones de secuencia del gancho da como resultado la secuencia de gancho compartido que se muestra en la Fig. 14. Sin embargo, existen múltiples secuencias de ganchos compartidos, que muestran energías similares que requieren más investigación. Por lo tanto, en la última etapa del flujo de trabajo, se usa modelado molecular para generar predicciones estructurales del gancho compartido en complejo con diferentes proteínas de surco (Fig. 15) y para investigar las propiedades de unión mediante simulaciones de dinámica molecular. Este tipo de análisis permite evaluar la estabilidad conformacional del complejo y un cálculo más preciso de las energías de interacción.

Tabla 1: Barridos computacionales de aminoácidos para el diseño de un gancho compartido que encaja en los surcos de pUL50 del HCMV y BFRF1 del EBV. La primera columna muestra la posición del gancho (numeración del HCMV). La segunda columna proporciona el tipo de aminoácido preferente que encaja tanto en los surcos del HCMV como en los del EBV. En las columnas 3 y 4 se indican los cambios en la energía de interacción (kcal/mol) en comparación con el resto de tipo silvestre respectivo. Los valores negativos indican un aumento de la afinidad tras la mutación.

| Posición | AA  | HCMV  | EBV   |
|----------|-----|-------|-------|
| 59       | PHE | -0,65 | 0,00  |
| 60       | TYR | 0,88  | 0,00  |
| 61       | LEU | 0,00  | 0,00  |
| 62       | TRP | -1,32 | -0,30 |
| 63       | SER | 0,07  | -0,02 |
| 64       | MET | 0,05  | 0,04  |
| 65       | PHE | 0,43  | 0,00  |
| 66       | ILE | 0,92  | -0,25 |
| 67       | ALA | 2,15  | 2,09  |
| 68       | ILE | 0,34  | 4,30  |
| 69       | MET | -0,02 | -0,37 |
| 70       | ARG | -0,11 | -0,21 |
| 71       | TYR | -2,20 | -0,22 |
| 72       | PHE | 0,28  | 0,05  |
| 73       | GLU | 0,00  | 0,00  |
| 74       | LEU | -0,02 | 0,00  |
| 75       | GLY | 1,86  | 0,00  |
| 76       | MET | -0,01 | -0,03 |
| 77       | LYS | 0,00  | -0,99 |
| 78       | TYR | 0,00  | -1,00 |
| 79       | LEU | 0,08  | 0,00  |
| 80       | ASN | 0,00  | -0,16 |
| 81       | MET | 0,00  | -1,93 |
| 82       | MET | 0,00  | 0,00  |
| 83       | MET | -0,05 | -0,66 |
| 84       | LYS | -0,69 | -0,96 |
| 85       | PRO | -1,23 | 0,00  |
| 86       | MET | -0,33 | 0,26  |
| 87       | ILE | 0,33  | -0,01 |
| 88       | GLY | 0,00  | 0,00  |

Los análisis computacionales anteriores se centraron en las propiedades de los ganchos y las aprovecharon para el diseño de un gancho compartido como prototipo de un péptido inhibidor.

En realizaciones alternativas de la presente invención, los surcos de diferentes proteínas del NEC herpesvíricas podrían ser la diana de pequeños compuestos orgánicos. Con el fin de permitir la unión a múltiples proteínas de surcos diferentes, dichos compuestos orgánicos deben dirigirse a sitios conservados del surco. Estos sitios conservados se identificaron a partir de un análisis de la conservación evolutiva de la región de superficie entre diferentes proteínas

de surco herpesvÍricas. Los resultados de este análisis se muestran en la Fig. 16. La siguiente etapa del método de predicción computacional de acuerdo con las realizaciones de la presente invención comprende la identificación de aquellos restos conservados que están ubicados lo suficientemente cerca en el espacio para ser la diana del mismo compuesto orgánico pequeño. En algunas realizaciones de la presente invención relativas a métodos de análisis computacional de la presente invención, basándose en el grado de conservación y la presencia de grupos funcionales de cadena lateral, E56/Y57 se someten a estos métodos, porque representan un sitio de acoplamiento prometedor para que pequeños ligandos orgánicos interfieran con la interacción de pUL53 (Fig. 17). Además, o como alternativa, un ligando más grande que pueda entrar en contacto con los restos hidrófobos altamente conservados L162/L163 puede aumentar la afinidad de unión, de manera que estos restos también puedan ser objeto de los métodos de análisis computacional de la presente invención.

#### Análisis por coimmunoprecipitación con el péptido de gancho pUL53 en tres tampones diferentes

Se cultivaron 5 millones de células 293T en una placa de 10 cm y se recogieron 3 días después de la transfección con 5 µg/construcción. Las células se sometieron a una lisis en el tampón respectivo (1x placa de 10 cm en 500 µl). En reacciones paralelas, se incubaron perlas (DynaBeads Proteína A (ThermoFisher)) con pAb-HA y se rotaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con un tampón de lavado de coimmunoprecipitación convencional. Para experimentos de inmunoprecipitación, se añadieron UL50-HA (150 µl o 50 µl) o RFP a las perlas y después se llenaron hasta 500 µl con tampón y se rotaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes de realizar una nueva etapa de lavado de las perlas. Para la incubación de péptidos se añadieron péptidos (5 o 25 µM) en 350 o 450 µl de tampón y se rotaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la coimmunoprecipitación, se añadieron UL53-Flag (150 o 50 µl) o ADNcp3.1 a la mezcla de perlas y péptidos y se rotaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las perlas se lavaron cinco veces y después se mezclaron con 30 µl de 2x Boiling-Mix durante 10 min 95 °C.

#### Determinación de la estructura de la proteína de fusión ORF24-ORF27 del VZV

La proteína de fusión ORF24-ORF27 del VZV para investigaciones estructurales y funcionales comprende orf24 del VZV que consiste en orf24 del VZV (entrada Uniprot: Q6QCN1, 16- GDNLLQRI ..... TDAYM-189) fusionada mediante un enlazador GGSGSGGS a orf27 del VZV (entrada Uniprot: Q6QCM8, 77-SKERSV.... FDDFVPPR-333) y se representa en la SEQ ID NO: 5.

#### Cristalización de proteína de la proteína de fusión ORF24-ORF27 del VZV

La proteína de fusión que consistía en ORF24-ORF27 del VZV (SEQ ID NO: 5) se cribó para determinar las condiciones de cristalización mediante la técnica de la gota sedente y las proteínas con concentraciones entre 10 y 15 mg/ml se disolvieron en un tampón que consistía en tampón de TrisHCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 y DTT 5 mM). Se obtuvieron cristales de calidad de difracción de la proteína de fusión ORF24-ORF27 del VZV (SEQ ID NO: 5) a 20 °C con Bis-Tris 0,09 M pH 5,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,91 M, PEG 3350 al 2,72 %, formamida al 3,64 % como solución de reserva. Las gotitas de cristalización se prepararon mezclando 2 µl de proteína y 1 µl de solución de reserva. Los cristales crecieron en un plazo de cinco a diez días hasta alcanzar tamaños de 300 x 20 x 10 µm<sup>3</sup>. Los cristales se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido tras la adición de etilenglicol al 20 % a una gotita de proteína.

#### Determinación de la estructura cristalina

En la línea de luz P13 del sincrotrón DESY de Hamburgo se recogió un conjunto de datos de difracción de resolución 2,4 a partir de cristales de ORF24-ORF27 del VZV (SEQ ID NO: 5). Los datos se procesaron con el programa XDS. Las fases iniciales se obtuvieron con la técnica de reemplazo molecular con el programa PHENIX\_PHASER usando la estructura del complejo de salida nuclear del HSV-1 como modelo de búsqueda (código de entrada PDB 4ZXS.pdb). La estructura se completó y corrigió usando el programa AUTOBUILD de PHENIX o manualmente usando el programa COOT. En la Tabla 2 se resumen la recogida de datos cristalográficos y las estadísticas de refinamiento.

Tabla 2: Recogida de datos y estadísticas de refinamiento de la proteína de fusión ORF24-ORF27 del VZV.

Recogida de datos

Intervalo de resolución (Å)

Grupo espacial

Dimensiones de la celda unitaria

Multiplicidad

Reflexiones exclusivas

Compleitud (%)

Factor B de Wilson

Rmeas (%)

Media I/σI

Reflexiones utilizadas en

DESY 2.12.2018, Línea de luz P13 (LL\_cgt3)

19,68 - 2,4 (2,46 - 2,4)

P21

76,1 35,2 157,8 90 93,91 90

15,8

33224

98,8 (95,9)

61,3

16,7 (163,4)

9,97 (0,72)

33100

### Interacción y reactividad cruzada de las proteínas del NEC de del HCMV y el EBV y péptidos derivados

Se analizaron las interacciones gancho - surco de las proteínas de los NEC del HCMV y el EBV a nivel de proteínas recombinantes solubles, usando un ensayo de unión directa de tipo ELISA, en el que la proteína de gancho se aplicó como recubrimiento en placas de microtitulación y se añadieron las proteínas de surco marcadas con His a diferentes concentraciones. Para los complejos de proteína del NEC, se pudo demostrar la unión dosis-dependiente de las respectivas proteínas, sin embargo, la interacción pUL50-pUL53 del HCMV es aproximadamente 20 veces más fuerte (CE50 = 6,2 nM) (Fig. 18A, izquierda) que la interacción BFRF1-BFLF2 del EBV (CE50 = 122 nM) (Fig. 18A, derecha)

A continuación, estas interacciones proteínicas sirvieron de base para los ensayos competitivos, en los que las proteínas de gancho del HCMV y el EBV (pUL53 y BFLF2), así como péptidos que presentan las regiones de gancho helicoidales de estas proteínas (Fig. 18B, Tabla 3), se sometieron a ensayo para comprobar su capacidad de inhibir las interacciones pUL50-pUL53 y BFRF1-BFLF2, respectivamente. Estos experimentos se diseñaron para abordar las interacciones péptido-proteína de cada virus, así como la capacidad de los péptidos y proteínas de gancho para interactuar de forma cruzada con las proteínas de surco del otro virus respectivo.

Curiosamente, tanto los péptidos como las proteínas de gancho fueron capaces de interferir en la interacción pUL50-pUL53 (NEC del HCMV), aunque en grado variable (Fig. 18C). Aunque la proteína de gancho del HCMV (pUL53) fue el inhibidor más potente de esa interacción (CI50 = 18 nM), la proteína de gancho de BFLF2 del EBV tuvo una actividad aproximadamente 11 veces menor (CI50 = 198 nM). Este resultado concuerda con las actividades inhibitoras de los péptidos que presentan las regiones de gancho de ambas proteínas de gancho, que es aproximadamente 22 veces menor para el péptido de gancho del EBV (CI50 = 2,6 µM) que para el péptido de gancho del HCMV (CI50 = 114 nM).

Además de indicar una reactividad cruzada moderada de las proteínas del NEC del HCMV y el EBV, estos datos también demuestran la utilidad de los péptidos de gancho pUL53 del HCMV y BFLF2 del EBV para servir como puntos de partida en la búsqueda de inhibidores del NEC de Herpesvirus como estrategia antivírica novedosa.

### Métodos de bioquímica peptídica

#### Síntesis de péptidos

Los péptidos (véanse las secuencias en la Tabla 3) se sintetizaron como amidas C-terminales mediante síntesis en fase sólida basada en Fmoc/t-Bu, como se ha descrito anteriormente (Groß *et al.*, DOI: 10.1002/cbic.201402545). La biotina se introdujo por acoplamiento de Fmoc-Lys(biotina). Los péptidos en bruto se purificaron mediante HPLC preparativa y los péptidos purificados se caracterizaron mediante HPLC analítica con detección por espectrometría de masas IEN en línea (CL-EM). Se prepararon soluciones madre de péptidos purificados a 5 mM en acetonitrilo al 50 %/agua.

Tabla 3. Secuencias de péptidos de gancho del HCMV y el EBV

| Péptido                    | Secuencia                                                                                                                      |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Péptido de gancho del HCMV | Ac <sup>a</sup> -59LTLHDLHDIFREHPELELKYLNNMMKMAIT87-Aoa <sup>b</sup> - <sup>25</sup><br>Lys(Bio <sup>c</sup> )-NH <sub>2</sub> |
| Péptido de gancho del EBV  | Ac-80SHFSLRDFFRGISANFELGKDFLREMNTPT108-Aoa-<br>Lys(Bio)-NH <sub>2</sub>                                                        |

<sup>a</sup>Ac, acetilo; <sup>b</sup>Aoa, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico; <sup>c</sup>Bio, biotina.

#### Ensayo de unión directa

Se recubrieron placas de microtitulación Immulon de alta unión durante la noche a 4 °C con las proteínas de gancho del HCMV (pUL53) y el EBV (BFLF2), respectivamente, (2 µg/ml en tampón de carbonato de sodio 0,1 M pH 9,5, 100 µl/pocillo). La unión inespecífica se bloqueó con BSA al 1 % en tampón de fosfato 0,1 M pH 7,2 (200 µl/pocillo, una hora). Después, las placas se incubaron con 100 µl/pocillo de solución de proteína de surco marcada con His (pUL50 y BFRF1, respectivamente) en diluciones en serie, a partir de 2,5 µg/ml y 15 µg/ml, respectivamente, durante una hora. La proteína unida se detectó usando 100 µl/pocillo de conjugado anti-His-HRP de Sigma a una dilución de 1:10.000. Todas las proteínas y anticuerpos estaban en tampón de fosfato 0,1 M pH 7,2, con BSA al 0,1 % y Tween20 al 0,01 %. Las placas se lavaron cuatro veces con Tween 20 al 0,01 % en tampón de fosfato 0,1 M pH 7,2 (300 µl/pocillo) después de cada etapa de incubación. Las placas se revelaron con 100 µl/pocillo de OPD (1 mg/ml) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03 % durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Después, la reacción se detuvo con 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M, la absorbancia se leyó a 492 nm. Todos los puntos de datos presentan medias de duplicados.

#### Ensayo de unión competitiva

Se recubrieron placas de microtitulación Immulon de alta unión con pUL53 y BFLF2, respectivamente, como se ha descrito anteriormente para el ensayo de unión directa. Después de bloquearlas con BSA, las placas se incubaron con 50 µl/pocillo de soluciones inhibitoras a diferentes intervalos de concentración, y 50 µl/pocillo de pUL50 marcada con His (0,16 µg/ml) y BFRF1 (5 µg/ml), respectivamente. Se detectaron pUL50 y BFRF1 marcadas con His y las placas se revelaron como se ha descrito anteriormente. Los valores de CI50 se determinaron usando el asistente de regresión de GraphPad Prism. Todos los puntos de datos presentan medias de duplicados. La inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - (\text{Apéptido} - \text{Ablanco1}) / (\text{A } 100 \% - \text{Ablanco2})] \times 100,$$

en la que "100 %" es una muestra sin inhibidor, "blanco1" es una muestra sin proteína de gancho recubierta y "blanco2" es una muestra sin proteína de gancho recubierta y sin inhibidor.

## REFERENCIAS CITADAS EN EL PRESENTE DOCUMENTO

En toda la parte descriptiva, los números entre paréntesis que hacen referencia a la bibliografía citada, indican las siguientes referencias:

1. Griffiths, P., *et al.*; *J. Pathol.* 235, 288-297
2. Mocarski, E. S., Jr., Shenk, T., Griffiths, P.D. y Pass, R. F. (2013) *Cytomegaloviruses. Fields Virology*, 6.<sup>a</sup> Ed. (eds. Knipe, D.M. y Howley, P.M.), Lippincott Williams & Wilkins, 1960-2014
3. Hamilton, S. T., (2014) *et al.*; *Rev. Med- Virol.* 24, 420-433
4. Marschall, M. y Stamminger, T. (2009); *Future Microbiol.* 4, 731-742
5. Lee, C. P. y Chen, M. R. (2010); *Rev. Med. Virol.* 20, 214-230
6. Marschall, M., Feichtinger, S. y Milbradt, J. (2011); *Adv. Virus Res.* 80, 69-101
7. Tandon, R. y Mocarski, E. S. (2012); *Trends Microbiol.* 20, 392-401
8. Mettenleiter, T. C., Müller, F., Granzow, H. y Klupp, B. G. (2013); *Cell. Microbiol.* 15, 170-178
9. Leigh, K. E., *et al.*; (2015); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 9010-9015
10. Muranyi, W., *et al.*; (2002), *Science* 297, 854-857
11. Hamirally, S., *et al.*; *PLoS Pathog.* 5, e1000275 (2009)
12. Milbradt, J., Auerochs, S., Sticht, H. y Marschall, M. (2009); *J. Gen. Virol.* 90, 579-590
13. Milbradt, J., *et al.*; (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 13979-13989
14. Milbradt, J., *et al.*; *J. Biol. Chem.* 287, 24004-24016
15. Milbradt, J., *et al.*; (2014), *Mol. Cell. Proteomics* 13, 2132-2146
16. Marschall, M., *et al.*; (2005), *J. Biol. Chem.* 280, 33357-33367
17. Kuny, C. V., *et al.*; (2010); *PLoS Pathog.* 6, e1001092
18. Lemnitzer, F., *et al.*; (2013); *Cell. Microbiol.* 15, 335-351
19. Schmeiser, C., (2013), *J. Gen. Virol.* 94, 2056-2069
20. Studier, F. W., *et al.*; (1990), *Methods Enzymol.* 185, 60-89
21. Laskowski, R. A., *et al.*; (1993), *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291
22. Kabsch, W. (2010) *Xds. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 125-132
23. Pape, T. y Schneider, T. R. (2004), *J. Appl. Cryst.* 37, 843-844
24. Sheldrick, G. M. (2010), *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 479-485
25. Schneider, T. R. y Sheldrick, G. M. (2002), *D. Biol. Crystallogr.* 58, 1772-1779
26. Adams, P. D., *et al.*; *et al.*; (2010); *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 213-221
27. Emsley, P., *et al.*, (2010); *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 486-501
28. Winn, M. D., *et al.*, (2011); *D. Biol. Crystallogr.* 67, 235-242
29. Schrödinger, L. L. C. (2010) *et al.*; *J. Gen. Virol.* 88, 2642-2650.
31. Funk, C., *et al.*; *PLoS Pathog.* 11, e1004957 (2015)
32. Harding, M. M. (2004) *et al.*; *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 849-859
33. Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994); *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680
34. Lötzerich, M., *et al.*; *Nucleic Acids Res.* 43, D345-356
36. Krissinel, E. y Henrick, K. (2004); *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 2256-2268
37. Dutta, R. e Inouye, M. (2000); *Trends Biochem. Sci.* 25, 24-28
38. Sam, M. D., *et al.*; *J. Virol.* 83, 2996-3006
39. Gres, A. T., *et al.*; *Science* 349, 99-103 (2015)
40. Ruiz, F.M., *et al.*; *PLoS One* 10, e0129691 (2015)
41. Bigalke, J. M., *et al.*; *Nat. Commun.* 5: 4131, 1-12
42. Sharma, M. y Coen, D. M. (2014); *J. Virol.* 88, 10982-10985
43. Sharma, M., *et al.*; *J. Virol.* 89, 523-34
44. Milbradt, J., *et al.*; *Mol. Cell. Proteomics* 13, 2132-2146
45. Walzer, Sascha, A., *et al.*; *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 290, N.º 46, 27452-27458 (2015)
46. Schymkowitz *et al.*, 2005, *Nucleic Acids Res.* 33: W382-8
47. Bigalke *et al.*, *J. Virol.* 89, 9150-9153

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende al menos dos dominios fusionados, en donde

- 5 a) un primer dominio comprende un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 1 a 171 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, o un homólogo funcional del mismo, y en donde un segundo dominio comprende un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 180 a 413 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o los restos de aminoácidos 180 a 208 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, o un homólogo funcional del mismo o
- 10 b) un primer dominio comprende un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 1 a 192 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 4, o un homólogo funcional del mismo, y en donde un segundo dominio comprende un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 198 a 438 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o los restos de aminoácidos 198 a 230 de acuerdo con la SEQ ID NO: 4, o un homólogo funcional del mismo o
- 15 c) un primer dominio comprende un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 1 a 174 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, o un homólogo funcional del mismo, y en donde un segundo dominio comprende un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 183 a 439 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 o los restos de aminoácidos 183 a 215 de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, o un homólogo funcional del mismo

20 y en donde dichos homólogos funcionales de dichos polipéptidos de a, b y c son al menos un 20 % diferentes, preferentemente un 15 % diferentes, más preferentemente un 10 % diferentes, más preferentemente un 9 % diferentes, más preferentemente un 8 % diferentes, más preferentemente un 7 % diferentes, más preferentemente un 6 % diferentes, más preferentemente un 5 % diferentes, más preferentemente un 4 % diferentes, más preferentemente un 3 % diferentes, más preferentemente un 2 % diferentes o mucho más preferentemente un 1 % diferentes de sus secuencias mencionadas anteriormente y codifican polipéptidos (derivados) del NEC que son susceptibles de heterodimerización.

2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos homólogos funcionales codifican polipéptidos (derivados) del NEC que son susceptibles de heterodimerización para formar un heterodímero que es al menos un 50 % tan estable como dichos polipéptidos de a, b y c en condiciones de ensayo idénticas.

3. El polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde al menos una secuencia de aminoácidos adicional se inserta entre el primer y el segundo dominio.

35 4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el primer dominio que comprende los restos de aminoácidos 1 a 171 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, o un homólogo funcional del mismo corresponde a, o es parte de, la proteína pUL50 del citomegalovirus humano o un homólogo funcional de la misma, y en donde el segundo dominio que comprende los restos de aminoácidos 180 a 413 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o los restos de aminoácidos 180 a 208 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 o un homólogo funcional del mismo corresponde a, o es parte de, la proteína pUL53 del citomegalovirus humano o un homólogo funcional de la misma.

45 5. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el primer dominio que comprende los restos de aminoácidos 1 a 192 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 o un homólogo funcional del mismo corresponde a, o es parte de, la proteína BFRF1 del virus de Epstein-Barr o un homólogo funcional de la misma, y en donde el segundo dominio que comprende los restos de aminoácidos 198 a 438 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o los restos de aminoácidos 198 a 230 de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 o un homólogo funcional del mismo corresponde a, o es parte de, la proteína BFLF2 del virus de Epstein-Barr o un homólogo funcional de la misma.

50 6. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el primer dominio que comprende los restos de aminoácidos 1 a 174 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 o un homólogo funcional del mismo corresponde a, o es parte de, la proteína ORF24 del VZV del virus Varicela Zóster o un homólogo funcional de la misma, y en donde el segundo dominio que comprende los restos de aminoácidos 183 a 439 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 o los restos de aminoácidos 183 a 215 de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 o un homólogo funcional del mismo corresponde a, o es parte de, la proteína ORF27 del VZV del virus Varicela Zóster o un homólogo funcional de la misma.

60 7. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 o 2 o un homólogo funcional de la misma.

8. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5 que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 3 o 4 o un homólogo funcional de la misma.

65 9. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 que comprende la secuencia de

aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 5 o 6 o un homólogo funcional de la misma.

10. Uso de un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como herramienta de cribado.

5 11. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo o armazón IgG o armazón no IgG que une específicamente el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. Un método para cribar agentes que se unen específicamente a y/o interactúan con y/o antagonizan los polipéptidos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende las etapas de:

10 a) proporcionar un sistema de reacción *in vitro*,  
b) proporcionar al menos un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como diana polipeptídica,  
c) mezclar al menos un agente candidato,

15 en donde dicho agente candidato se selecciona preferentemente del grupo que comprende polipéptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, armazones de IgG, armazones no IgG, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos ribonucleicos, ARNi, moléculas pequeñas y moléculas pequeñas diseñadas por ordenador, y en donde dicha diana polipeptídica o dicho agente candidato o ambos, dicha diana polipeptídica y dicho agente candidato, están opcionalmente marcados con un marcador detectable seleccionado de un grupo que comprende un radioisótopo, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador bioluminiscente, un péptido o una enzima, y

20 d) detectar la unión y/o la interacción y/o el antagonismo entre dicha diana polipeptídica y dicho agente candidato mediante el control de cambios funcionales y estructurales en al menos un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 6 o un homólogo funcional del mismo y/o en la unión del agente candidato a y/o la interacción con y/o el antagonismo de dicha diana polipeptídica,

25 en donde cambios funcionales y/o estructurales en la al menos una diana polipeptídica y/o el aumento de la unión y/o la interacción y/o el antagonismo entre dicha al menos una diana polipeptídica y dicho agente candidato con respecto al control sin dicho agente candidato son indicativos de actividad del agente candidato para afectar a y/o influir conformacionalmente en dicha al menos una diana polipeptídica, en donde dicho método se selecciona preferentemente del grupo que comprende un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo basado en microscopía, un ensayo de unión de péptidos, un ensayo basado en RMN, un ensayo de rayos X, un ensayo por ordenador, un ensayo de inhibición, un inmunoensayo y/o un ensayo celular.

30 13. Un método por ordenador de cribado estructural de agentes que se unen específicamente a y/o interactúan con y/o antagonizan los polipéptidos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende las etapas de:

40 a) proporcionar datos de estructura cristalina de al menos un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como diana polipeptídica,  
b) calcular si al menos un agente candidato de estructura conocida se une específicamente a y/o interactúa con y/o antagoniza la diana polipeptídica, en donde dicho agente candidato se selecciona preferentemente del grupo que comprende polipéptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, armazones de IgG, armazones no IgG, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos ribonucleicos, ARNi, moléculas pequeñas y moléculas pequeñas diseñadas por ordenador.

45 14. Un método de identificación asistida por ordenador de un compuesto que modula una actividad de una proteína diana, comprendiendo el método:

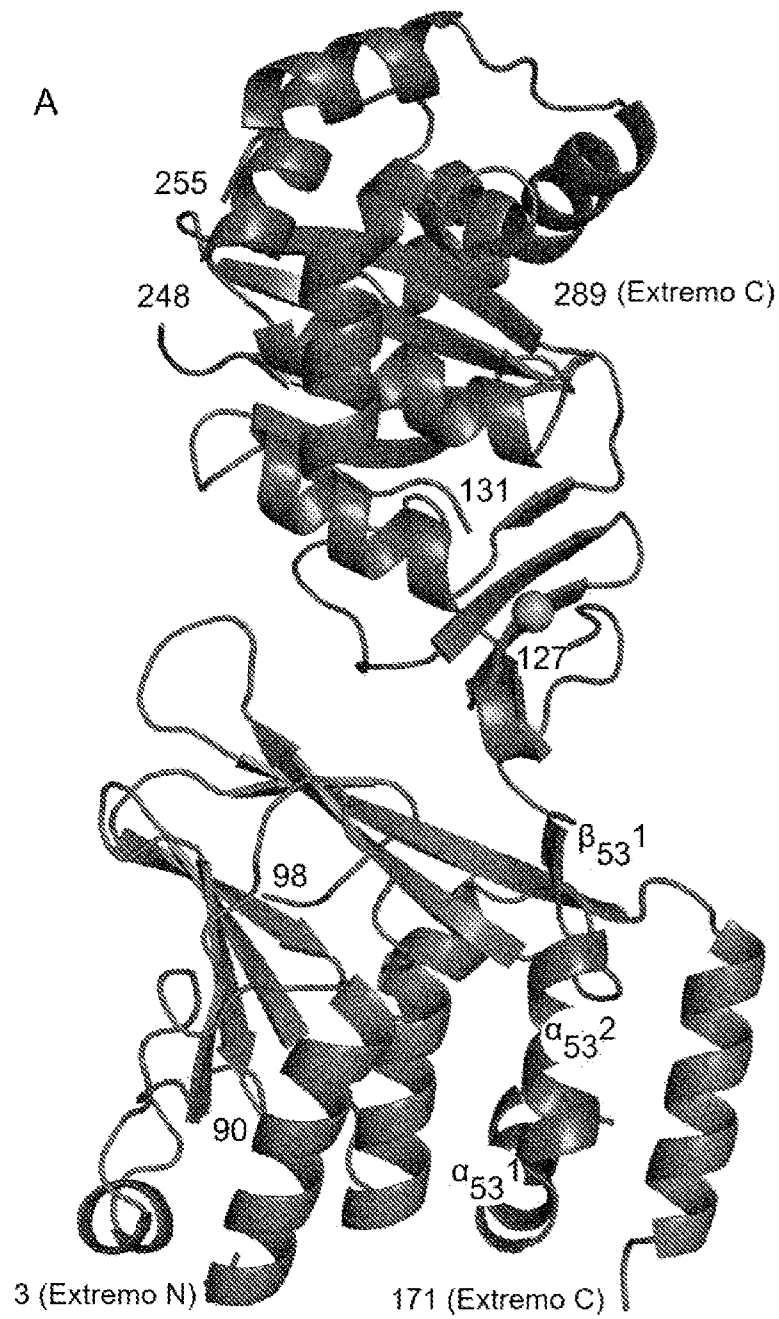
50 a) proporcionar una estructura cristalina de al menos un polipéptido diana como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en complejo con una biomolécula,  
b) realizar una simulación de dinámica molecular de escala temporal larga de la estructura,  
55 c) identificar una o más características topológicas tridimensionales evolucionadas en el polipéptido diana de la estructura de la etapa (a), y  
d) identificar un compuesto que se une a al menos a una de las una o más características topológicas tridimensionales evolucionadas identificadas en la etapa (c), en donde la unión del compuesto a la una o más características topológicas tridimensionales evolucionadas modula una actividad de la proteína diana.

60 15. Un método de identificación asistida por ordenador de un compuesto que modula una interacción entre un polipéptido diana y una biomolécula, en donde la biomolécula es un compañero de unión del polipéptido diana, comprendiendo el método:

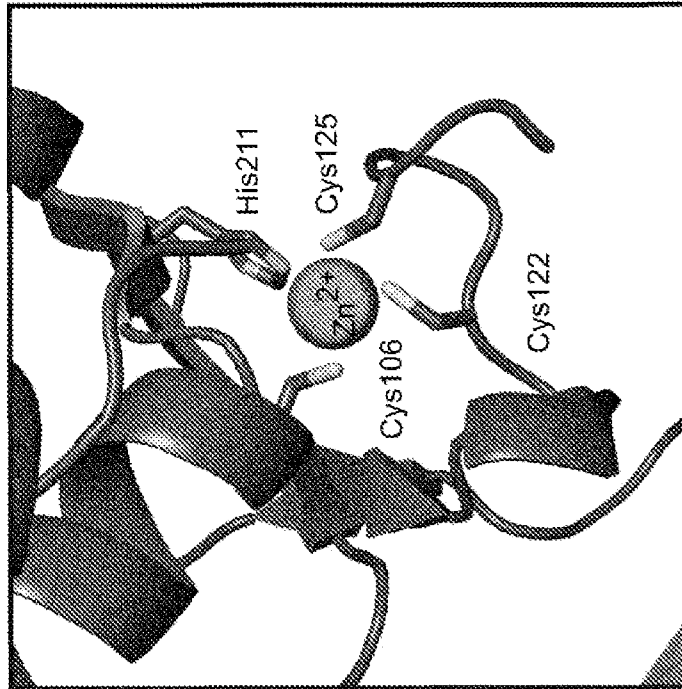
65 a) proporcionar una estructura cristalina de al menos un polipéptido diana como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en complejo con una biomolécula,

- b) realizar una simulación de dinámica molecular de escala temporal larga de la estructura,  
 c) identificar una o más características topológicas tridimensionales evolucionadas en el polipéptido diana de la estructura de la etapa (a), y  
 d) identificar un compuesto que se une a al menos a una de las una o más características topológicas tridimensionales evolucionadas identificadas en la etapa (c) en donde la unión del compuesto a la una o más las características topológicas tridimensionales evolucionadas modula una interacción entre el polipéptido diana y la biomolécula o fragmento de la misma.
- 5
16. Un método *in vitro* de identificación de agentes biológicamente activos que reducen la replicación del virus en las células, en donde dicho virus es un herpesvirus seleccionado del grupo de los *Herpesviridae*, preferentemente, en donde dicho herpesvirus es el virus de Epstein-Barr o el virus Varicela Zóster o el citomegalovirus humano, comprendiendo dicho método:
- 10
- a) combinar un agente candidato biológicamente activo seleccionado del grupo que comprende polipéptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, armazones de IgG, armazones no IgG, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos ribonucleicos, ARNi, moléculas pequeñas, moléculas pequeñas diseñadas por ordenador, además **caracterizado por que** dicho agente candidato biológicamente activo se une a y/o interactúa con y/o antagoniza un polipéptido diana como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 con al menos una célula que está infectada con dicho virus, y
- 15
- b) determinar el efecto de dicho agente candidato biológicamente activo sobre la replicación del virus.
- 20

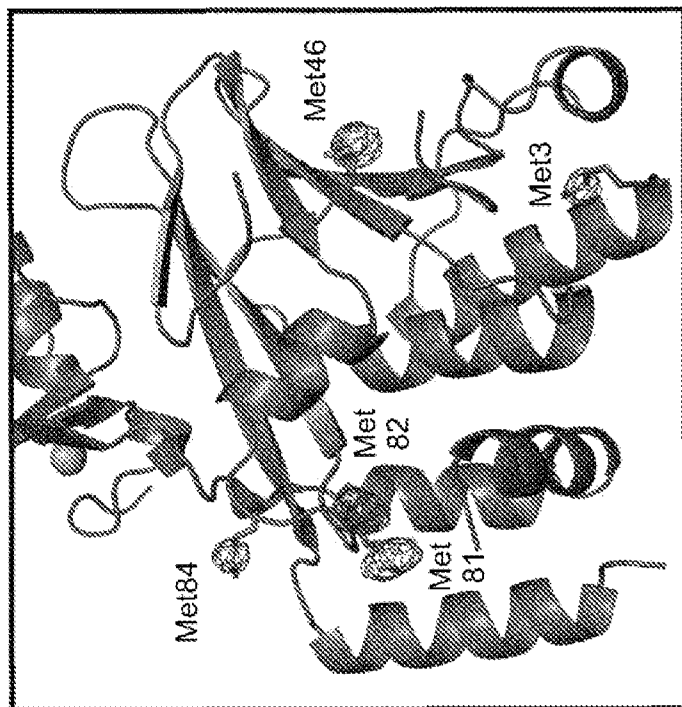
**FIG. 1**



**FIG. 1 (continuación)**

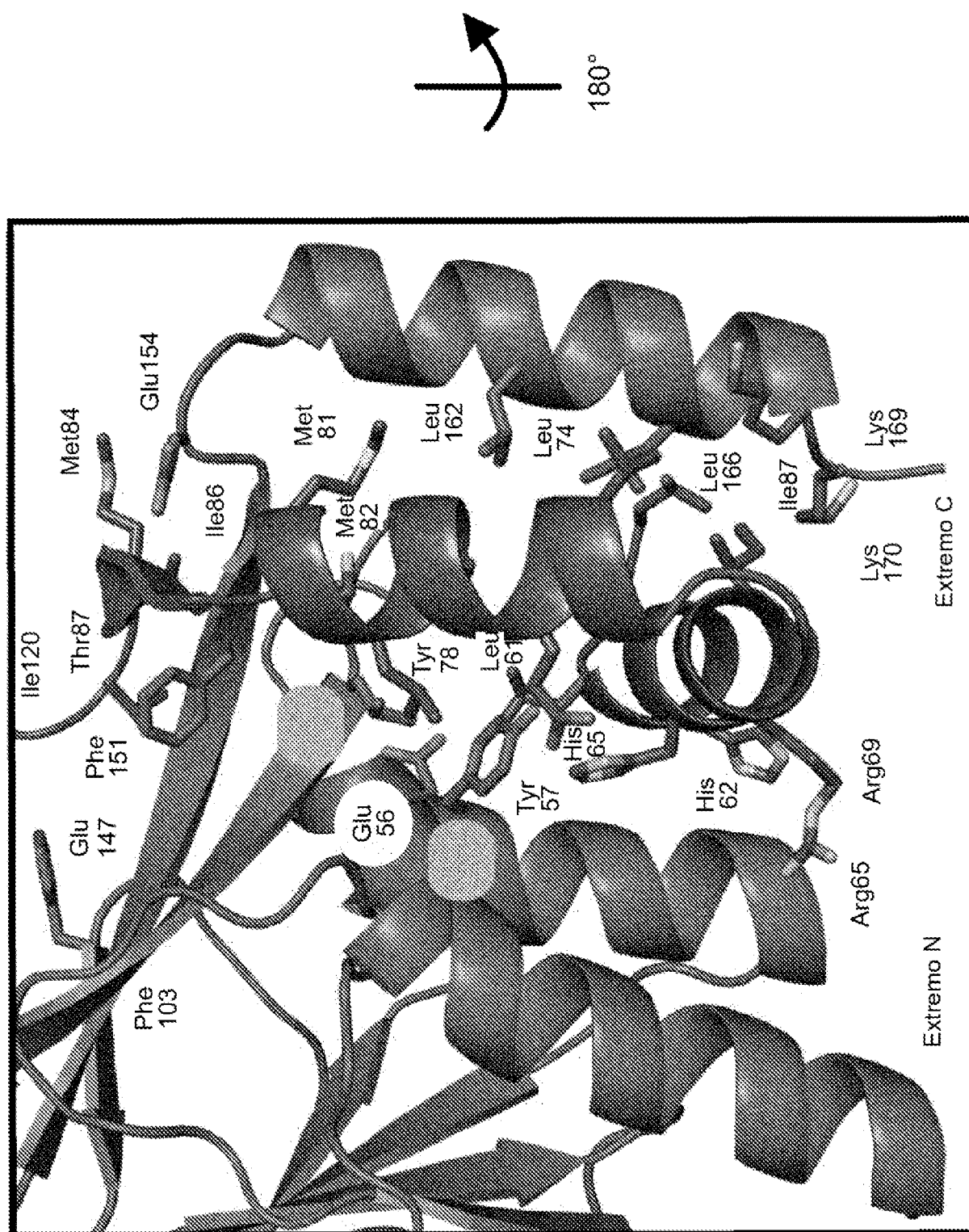


C



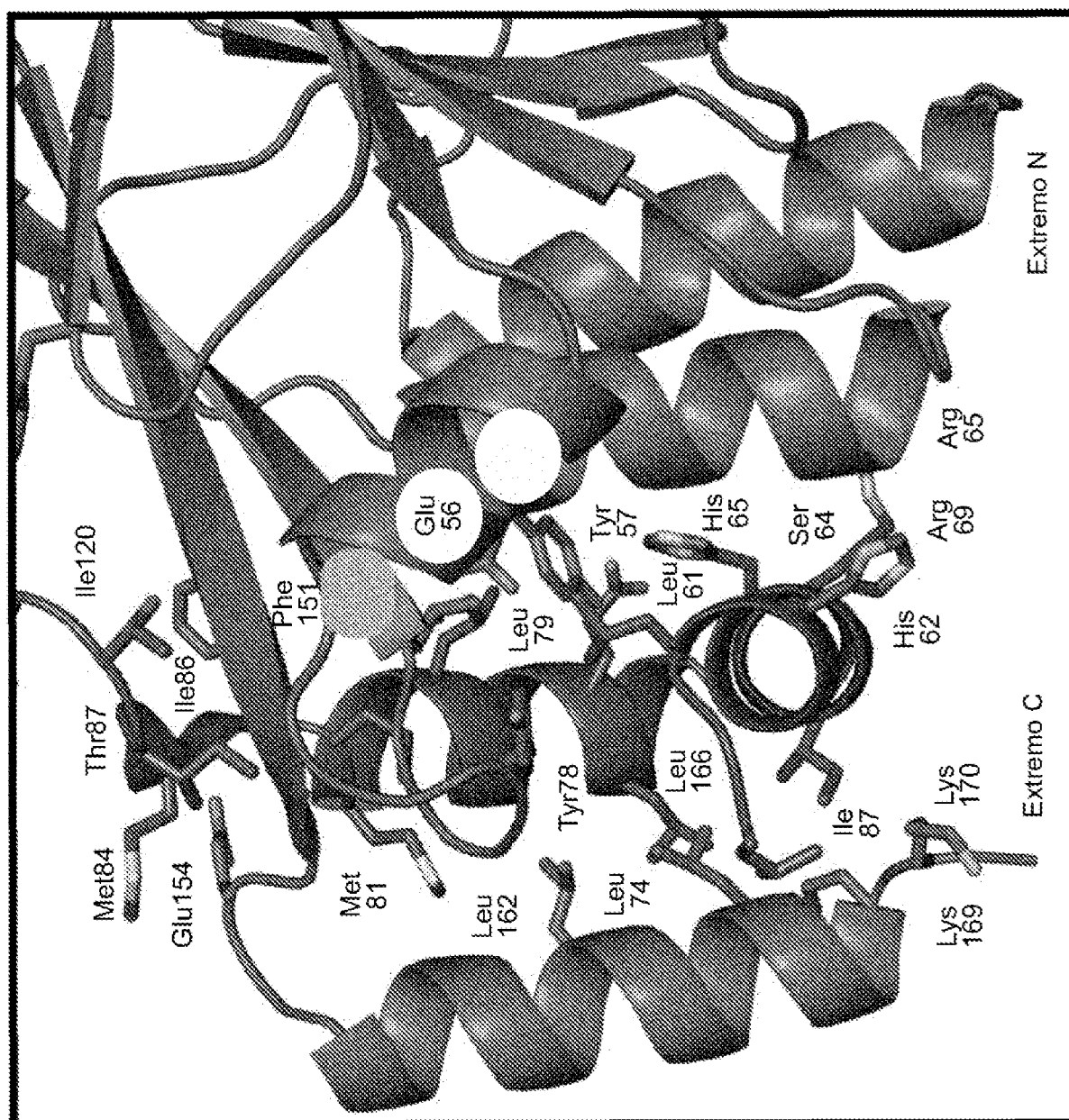
B

FIG. 1 (continuación)



D

FIG. 1 (continuación)



D (continuación)

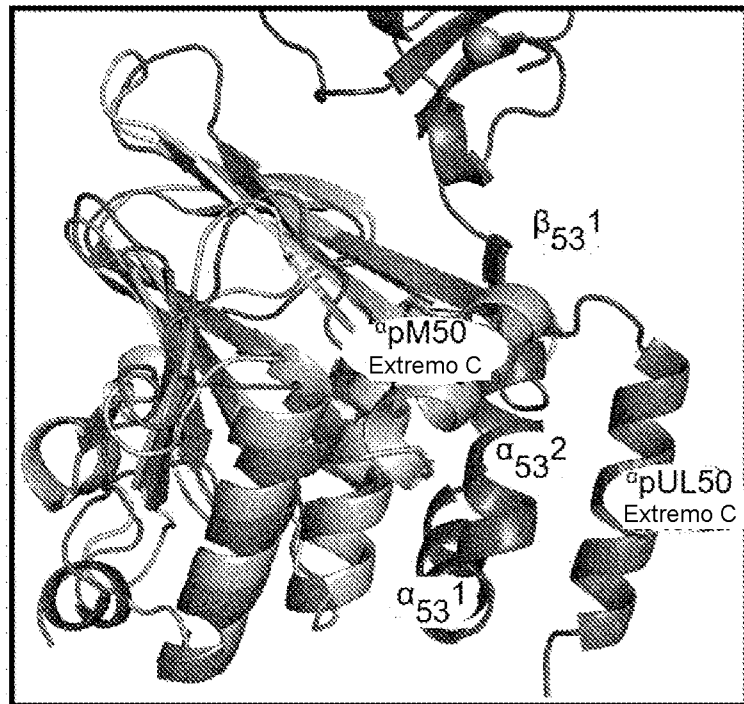


**FIG. 2**

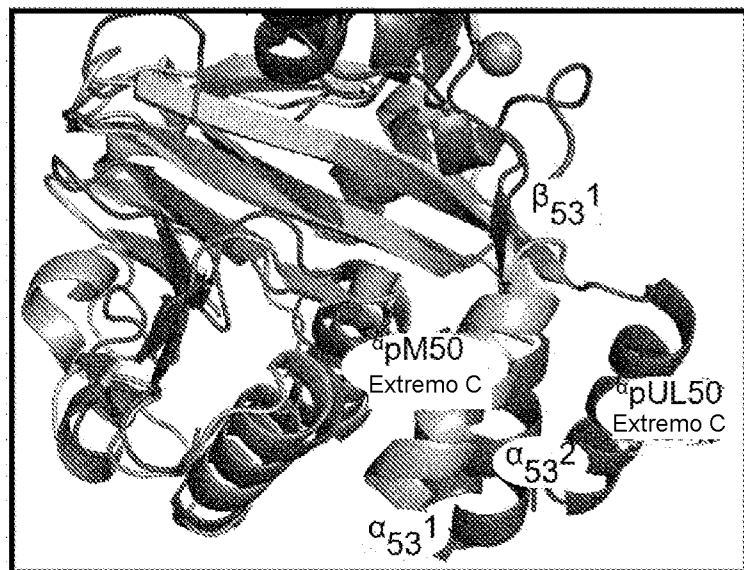


**FIG. 2 (continuación)**

**B**

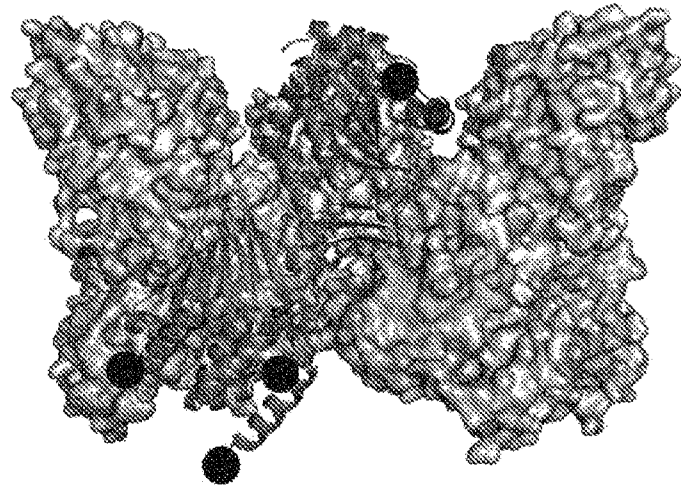


— ↻ — 45°



**FIG. 2 (continuación)**

C



→ 90°

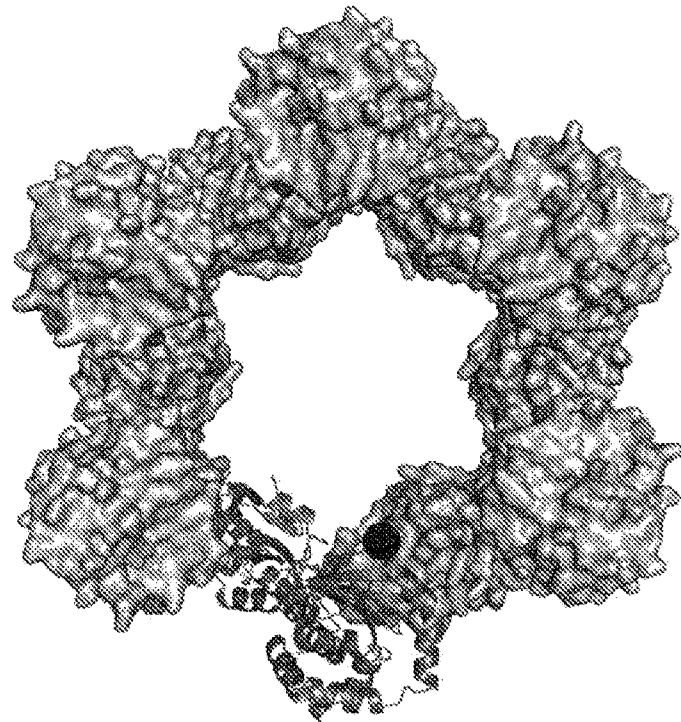
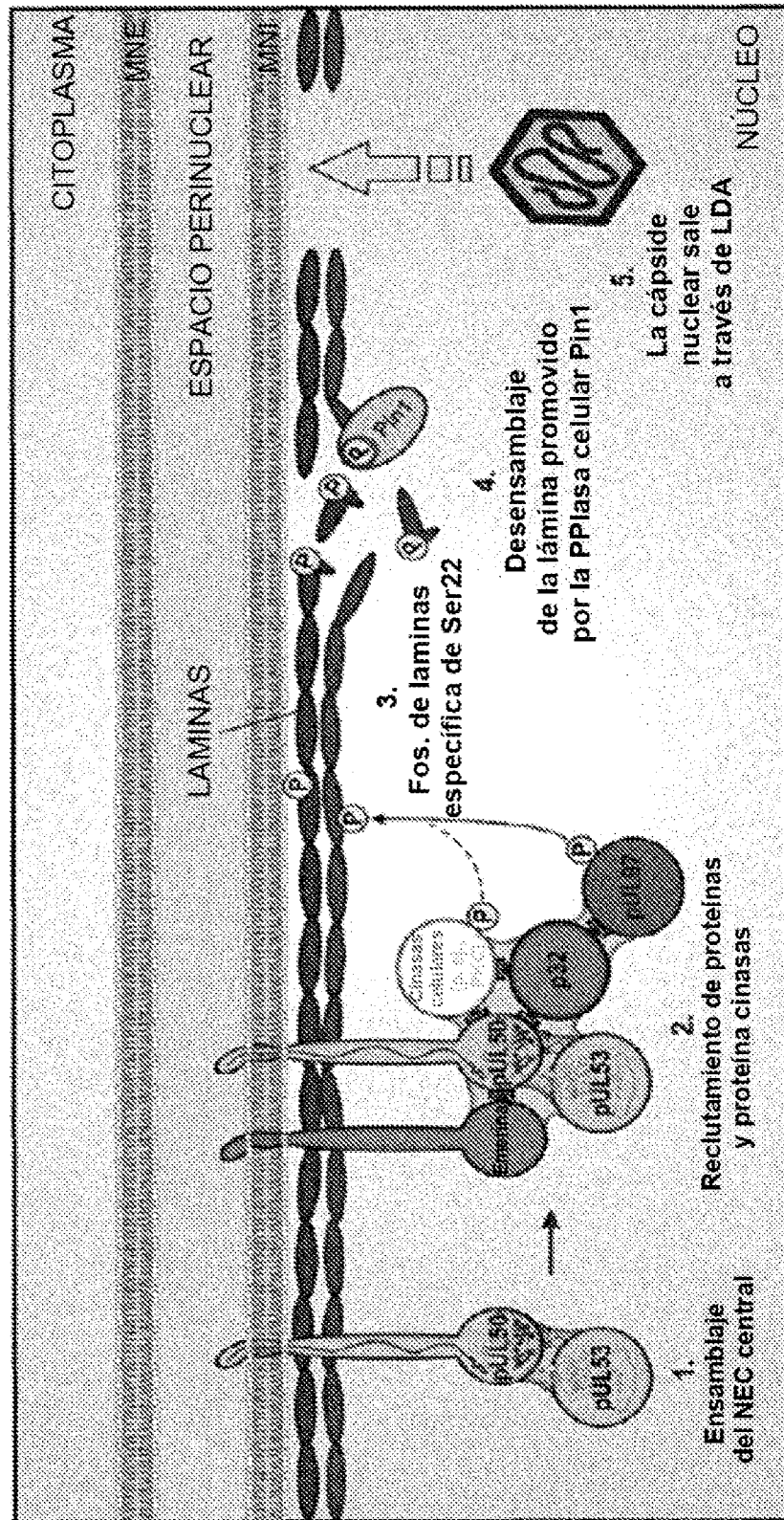


FIG. 3



## FIG. 4 – FIG. 4A / FIG. 4B

## FIG. 4A

Homólogos de pUL53 del HCMV

|                                                                                      |       |                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------|
| pUL53 del HCMV                                                                       | (1)   | -----MSSVSGVRTPRERRSALRSLLRKRQRELASKVASTVNG                  |
| UL31 del HSV-1                                                                       | (1)   | -----MYDTDPHRRGSRPGPYHGKERRRSRSSAAGGTLGVBRA                  |
| UL31 del HSV-2                                                                       | (1)   | -----MYDIAPRRSGSRPGPGGRDKIRRRSRFSAAGNP--GVEBRA               |
| orf27 del VZV                                                                        | (1)   | MHLKPTRFFHANQPPMPHSYEMEDLCFDDMQYRWSPSNTPYRSMSRRYKVSRSRG-PSMR |
| U37 del HHV-6A                                                                       | (1)   | -----MTVHKSRIIRRSRSLSVTHRIQ-----                             |
| U37 del HHV-6B                                                                       | (1)   | -----MTVHKNRFRRSRSLSVTHRIQ-----                              |
| U37 del HHV-7                                                                        | (1)   | -----MAIQSTRRIIRASSLLKK-----                                 |
| BFLF2 del EBV                                                                        | (1)   | -----MAPVTPDAVNARQORPADPALRRLMHPHERNYTASKASAHSVK             |
| ORF63 del HHV-8                                                                      | (1)   | -----MPKSVSSHISLATSTGRSGPRDIPRCLSSRLRSVPPG                   |
| UL31 del PrV                                                                         | (1)   | -----MFERPRILLRK-----                                        |
| pM53 del MCMV                                                                        | (1)   | -----MFRSPEGEERDAADREEEEGGEARRSRMMSPRRVKRARHRFPAGSGLRTPILRS  |
|   |       |                                                              |
| pUL53 del HCMV                                                                       | (40)  | A-----TSANNHGEPPSPADARPRLTLD                                 |
| UL31 del HSV-1                                                                       | (40)  | S-----RKSLPPhARKQELCLHERQRYRG                                |
| UL31 del HSV-2                                                                       | (39)  | S-----RKSLPShARLELCLHERRRYRG                                 |
| orf27 del VZV                                                                        | (60)  | VR-----GRTPCPRQTIRGKLMSKERSVYRH                              |
| U37 del HHV-6A                                                                       | (22)  | -----KRPDHREKTKLYLQLKHD                                      |
| U37 del HHV-6B                                                                       | (22)  | -----KRPDHREKTKLYLQLKHD                                      |
| U37 del HHV-7                                                                        | (19)  | -----SKFYNKEKTNLSLSLSEKE                                     |
| BFLF2 del EBV                                                                        | (44)  | SVSRGCKS----RSE-----LGRMERVGSVARSICSRTRHGVDRSHPESRD          |
| ORF63 del HHV-8                                                                      | (38)  | -----ARSASVSSKHRNGLRKFISDKV                                  |
| UL31 del PrV                                                                         | (12)  | -----SSAARRKTLTRAADRYAP                                      |
| pM53 del MCMV                                                                        | (55)  | PSACRCSSPSPERQWQORRAEKRSTTPTDPPPPPKRSAASAAAGAAPESEYLVNKESE   |
|  |       |                                                              |
| pUL53 del HCMV                                                                       | (64)  | LHDIFREHFELELKYLNMMMAITGKESICLPEFNHSHRQHTCLDISRYGNEQVSRIACT  |
| UL31 del HSV-1                                                                       | (64)  | FFAALAQTSSEIAIVRSLSVPIVKTTFVSLPECLDQTVADNCTLSGMYLLGIGGCCP    |
| UL31 del HSV-2                                                                       | (63)  | FFAALAQTSSEIAIVRSLSVPIVKTTFVSLPECLDQTVADNCTLSGMYLLGIGGCCP    |
| orf27 del VZV                                                                        | (86)  | YFNYIARSPPELATVRGLIVPIKTTPTVILPENLGQTVADNCTLSGMYHLGLGGYCP    |
| U37 del HHV-6A                                                                       | (41)  | LHVTENLFEEYQKFLAIKLPITGKEPDVPSLSNNHHTCLEFSEYANEGVKSACL       |
| U37 del HHV-6B                                                                       | (41)  | LHAVENLFEEYQKFLAIKLPITGKEPDVPSLSNNHHTCLEFSEYANEGVKSACL       |
| U37 del HHV-7                                                                        | (38)  | LHNVKLFEEYSLKFLNMMILPITGKEPKIIFDLSTHHTCLEFSEYANEGVKSACV      |
| BFLF2 del EBV                                                                        | (87)  | FFRGISANFELCKDFEREMNIPHVSEAVFLELSLCTLSPGRCRLSEFGHSLTLGSHCE   |
| ORF63 del HHV-8                                                                      | (60)  | FFSILSHRHGLGVDFEREMETPCTSKIVMLPLDLSTVAPGRGVSLSEFGHSSNMGFQCA  |
| UL31 del PrV                                                                         | (31)  | YFAYAAQSDSEVTTVRGLSNFLIKTAPVILPEDLGQAVADNCTLSGMYLLGIGGCCP    |
| pM53 del MCMV                                                                        | (115) | LHDVEQRHDLSCYKIMLPIIGKESIRLPEDFKSRQHTCLDISRYGNDQVRSACT       |
|  |       |                                                              |
| pUL53 del HCMV                                                                       | (124) | SCEDNRI-LPTASDAM-----VAFINQTSNIMKNENFYFGFC----               |
| UL31 del HSV-1                                                                       | (124) | ACNAGDG-RFAATSREA-----LILAFVQINTIFEHRAFLASLVVLAD             |
| UL31 del HSV-2                                                                       | (123) | ACSAGDG-RLATVSREA-----LILAFVQINTIFEHRTFLASLVVLAD             |
| orf27 del VZV                                                                        | (146) | TCTASGEPRLCRTIDRAA-----LILAYVQNLNHYEYVFLASILALSD             |
| U37 del HHV-6A                                                                       | (101) | HCESVS--VPTSSDAM-----VAHLNOVNVNQNLYFYGER----                 |
| U37 del HHV-6B                                                                       | (101) | HCESVS--VPTSSDAM-----VAHLNOVTVNQNLYFYGER----                 |
| U37 del HHV-7                                                                        | (98)  | NCGTTN--LPTASDAM-----VAYMNGISVNQNLYYYEQ----                  |
| BFLF2 del EBV                                                                        | (147) | ICINRSQ-VHVPCEFS-----STQLSFFNVVKIIPNKTFYVSILS----            |
| ORF63 del HHV-8                                                                      | (120) | LCPSTEN-PTVAQGSRPQTMVGDAKKNNELCSVALFYHHADKVIQHKTFYLSILS----  |
| UL31 del PrV                                                                         | (91)  | TCAAAEP-RLGRSDRAA-----LVLSYVQNLNSIYEYVFLASVAAR----           |
| pM53 del MCMV                                                                        | (175) | TKKETTR-LPTASDSM-----VAFINQTSNIMKNENFYFYGER----              |

FIG. 4A (continuación)

```

pUL53 del HCMV (160) -----KSSSELKLSTNQPPIFQIYYLLHAANHDI VEFMHAE-----DGRLHMHVIFENF
UL31 del HSV-1 (167) RH---NAPLQDEL LAGILGPELFFVHTILRGGGACDPRLLFYPD-PTYGGHMLYVIEPGT
UL31 del HSV-2 (166) RH---STPLQDEL LADTLGPELFFVHTILRGGGACDPRLLFYPD-PTYGGHMLYVIEPGT
orf27 del VZV (190) RANMQAASAEPILSSVLAQPELFFMYHIMREGGMRDIRVLFYRDG-DAGGFMFYVIEPGK
U37 del HHV-6A (136) -----KDMELIRMSAKPTIFQIFIVHNTINNIFIMFER-----KQKLGKHIVFQSR
U37 del HHV-6B (136) -----KDMELIRMSAKPTIFQIFIVHNTINNIFIMFEK-----KQKLGKHIVFQSR
U37 del HHV-7 (133) -----KKVLEIRMSAKPTIFQIFVILSSIASNFIMFEN-----NEKLNHYVVFQTR
BFLF2 del EBV (187) -----SSPSAVKAGLSQPSLIYAYLVGTGHFCGTICIFSTNG-----KGRLIMHLLQGT
ORF69 del HHV-8 (176) -----HSMDEVVRQSFLPGILYANLVLTGHDPLIFITIN-----NGMLINCILKTR
UL31 del PrV (132) -----DPSERALEEVLAHFELFFAYVVLRDGGLRDVRLFFEDFDAQGALMNYVVFPEK
pM53 del MCMV (211) -----KMMELKMAANQQLQETIYIVQSCVQEI VELYID-----REMAHQQLIEKE

*
pUL53 del HCMV (209) DVHIECDCITOMLTAAREDYSTINIVRDHVVISVLCHAVSA---SSVKIDVTILQKID
UL31 del HSV-1 (223) SAHLHYRLIDRMLTAC-PGKRFVAHVWQSTFVLVVRNAEKPTDAEIP TVSAADIYCKMR
UL31 del HSV-2 (222) SAHLHYRLIDRMLTAC-PGKRFVAHVWQSTFVLVVRNAEKPADAEIP TVSAADIYCKMR
orf27 del VZV (249) SVHLHYRLIDHIQAAC-RGKIVAHVWQTIFLLSVCNRNEQQTEIVVPSIGTSDVYCKMC
U37 del HHV-6A (185) TLHIPCCEIKQIIAVS-SGNNFYEDILQESVILT VLTCELTDTN---TNIHIDIGMLCKKLE
U37 del HHV-6B (185) TLHIPCCEIKQIIAVS-SGNNFYEDILQDSVILT VLTCELTDTN---TNIHIDIGMLCKKLE
U37 del HHV-7 (192) TLHIPCCEINQIMIVS-SGNTLIDILHDSIVLHVLEKTIET---SNIQIINVLQKIE
BFLF2 del EBV (237) SLRIPETELKLLCENIGPTVELAVDLVGDAFCIKVSPRDTVYE---KAVNVQEDAIYEAIK
ORF69 del HHV-8 (225) ALHLGETALRLMDNL-PNKKISADCCRQSYVVKFVPTHPDT-----ASIAVQVHTICEAVA
UL31 del PrV (186) SVRVVHHRVLDRLLGAC-AGHRIVAHVWQTMFVLVVRKKGDGRPADDPVAVSASDIYCKMR
pM53 del MCMV (260) TVHIESQIEQILTVAKDAGWSDTAHQRIITLTARQLIES---SSLRIQVIMQRIVD

pUL53 del HCMV (266) EMDIENDVSESFERYKELIQELCQSSGNNLYEEATSSYAIRSPLTASPLHVSTNGCGPS
UL31 del HSV-1 (282) DISFDGGLMLEYQRLYATFDEFPPP-----
UL31 del HSV-2 (281) DISFDGGLMLEYQRLYATFDEFPPP-----
orf27 del VZV (308) DLNFDGELLLEYKRLYALFDDFVPPR-----
U37 del HHV-6A (242) EMDIENEISDRLEKYKGHLIGFH-----
U37 del HHV-6B (242) EMDIENEISDRLEKYKGHLIGFH-----
U37 del HHV-7 (238) EMDVDEIGDKFEKLKHILPFI-----
BFLF2 del EBV (295) DLECCDELRLQIINYTQLILENKQ-----
ORF69 del HHV-8 (281) ALDCTDEMRRDIQKGTALVNAL-----
UL31 del PrV (245) DISFDGELLLEYKRLYAAFEDFRPPRP-----
pM53 del MCMV (317) ELETNETNEKEFSYSL-----

pUL53 del HCMV (326) SSSQSTPPHLHPPSQATOPHHYSHHQSSQSQHHHRPQSPPPPPLFINSIRAP
UL31 del HSV-1 (307) -----
UL31 del HSV-2 (306) -----
orf27 del VZV (334) -----
U37 del HHV-6A (265) -----
U37 del HHV-6B (265) -----
U37 del HHV-7 (260) -----
BFLF2 del EBV (319) -----
ORF69 del HHV-8 (303) -----
UL31 del PrV (272) -----
pM53 del MCMV (334) -----

```

FIG. 4 B

Homólogos de pUL50 del HCMV

|                 |       | #                                                                | #   |
|-----------------|-------|------------------------------------------------------------------|-----|
| pUL50 del HCMV  | (1)   | -----MEMNKVLHQDLVQATRLIKLG-----PSELVTD-AG-LICKNPNYSVCBAML        |     |
| UL34 del HSV-1  | (1)   | MAGLGKPYTGHPGDAFEGLVQIRILVLPST-----LGGDGEAGPYSPSSLPSCAFQF        |     |
| UL34 del HSV-2  | (1)   | MAGMGKPYGGRPGDAFEGLVQIRILVLPAT-----LGGGGESGPYSPSNPPSRCAFQF       |     |
| orf24 del VZV   | (1)   | MSRRTYVRSERRRGCGDNILQIRILVVP SA-----LQCCDGDLPIDPQRPAPRCVFQF      |     |
| U34 del HHV-6A  | (1)   | -----MANVLKEKMYDELLSACRIKLG-----SHDYRITE-RN-ILSKNPKFPLCHII       |     |
| U34 del HHV-6B  | (1)   | -----MANVLKEKMYDELLSACRIKLG-----SHDYRMTTE-RN-ILSKNPKFPLCHII      |     |
| U34 del HHV-7   | (1)   | -----MLKEKMYDELLSACRIKLG-----PADEFVTD-KN-ILSKNPKFPLCHII          |     |
| BFLF1 del EBV   | (1)   | -----MASPEERLLDEINNVIVGFI CD SG--SLEVERCSG-AH-VFSRGSSQPLCTVKE    |     |
| ORF67 del HHV-8 | (1)   | -----MSVVGKRVVDLCRVSSYEGQSGQSLDLERCIDGAP-VYAGGATAICTVRM          |     |
| UL34 del PrV    | (1)   | -----MSGTIVQRLKLIISGG-----NLKCSGGET-ACDPERPPTGCVFQV              |     |
| pM50 del MCMV   | (1)   | -----MEIDKNVGADLIGNERIRRED-----ENELNITD-TA-LICKNPNYSLCBAML       |     |
|                 |       |                                                                  |     |
|                 |       | #                                                                | ##  |
| pUL50 del HCMV  | (48)  | K----TDTVYCVVEYLLSYWESRTD-----HVPCEIFKNTGCAVSLCCFVRAPVKLVSPAR    |     |
| UL34 del HSV-1  | (55)  | HGHGSSSESFPFIEYVERLMNDWAEVP-----CNPYLRIQNTIGVSILFCGFFHRRPNAPG-GA |     |
| UL34 del HSV-2  | (55)  | HGQDGSDEAFPIEYVERLMNDWADVP-----CNPYLRVQNTIGVSILFCGFFNRPHGAPG-GA  |     |
| orf24 del VZV   | (55)  | NGEDNVSEAFPEYIMRLMANWAQVD-----CDPYIKIONIGVSILFCGFFFRFTNAPV-AE    |     |
| U34 del HHV-6A  | (50)  | K-----LDYAYNLEYLLSLWEHVIK-----QEPREVENITGGAVMSCYLHAPVKVEG-HH     |     |
| U34 del HHV-6B  | (50)  | K-----LDYAYNLEYLLSLWEHVIK-----QEPREVENITGGAVMSCYLHAPVKAEG-HH     |     |
| U34 del HHV-7   | (47)  | K-----LDFAYSLEYLLSLWEDLTK-----QEAREIFKNTGGAVMSCYLHAPIKQES-QN     |     |
| BFLF1 del EBV   | (51)  | R-----HGQIYHLEFVYKFLAFKLNKNYPSSPVEVISNNGLATTLAFLHEPSSGLRSGQS     |     |
| ORF67 del HHV-8 | (53)  | Q-----HGCYVHLEFVYKFAHLLLEEMHYPPSPCEVISNNGLSTTLKFLCRSDAVSQFG      |     |
| UL34 del PrV    | (41)  | HGQDGSMDTFPLEYVERLMRSWAHVP-----CDPYVRVQNTIGVSILFCGFFFRPADAPL-AA  |     |
| pM50 del MCMV   | (48)  | T-----TIVVPVEYLLSYWECRS-----RTACEVENITGCRVLSYIGFFPERLKD-LK       |     |
|                 |       |                                                                  |     |
|                 |       | #                                                                | ### |
| pUL50 del HCMV  | (99)  | HVGE-FNV-LKVNESIIVTLKDIEIK-----ESAYGVLETKVVRKSNASVFNIEL          |     |
| UL34 del HSV-1  | (111) | ITPERTNVILGSTETTGSLGLDLDITKGRGLGDAREMMASMWISFVMPRVQLAFRFMG       |     |
| UL34 del HSV-2  | (111) | ITAEQTNVILHSTETTGSLGLDLDVKGRLGLDAREMMASMWISFVMPRVQLAFRFMG        |     |
| orf24 del VZV   | (111) | VSIDGNVILSSITLSTGINLSALESIKRGGIDRRLOALMWVNGVMPRVQLSFRFMG         |     |
| U34 del HHV-6A  | (100) | AVRE-CN-ILRVNCHITVMSIVAMK-----ESTFAVFKEIIR-IRDETYYVVEF           |     |
| U34 del HHV-6B  | (100) | AVRE-CN-ILRVNCHITVMSIVAMK-----ESTFAVFKEIIR-IRDETYYVVEF           |     |
| U34 del HHV-7   | (97)  | IVKE-CN-ILRVNCHITVMSIVAMK-----SSSGVLETKIIR-IRDAAFIVVEF           |     |
| BFLF1 del EBV   | (107) | GPCLGLSTDVDLPKNSIIMLGQDDFIKFKSFLVFPALDLLKSMVVCRAIYTEHRTTMOF      |     |
| ORF67 del HHV-8 | (109) | -HVLPVESDVYLAKNTSIVLGQDDFTKFKASLVFSKNLGVYNSMVICRTYFTDYRQVLQF     |     |
| UL34 del PrV    | (97)  | ITAEHNNVILASTHSTGMSLSALDDIKRAGGVDTROLRAMMSVSEFVMPRVQLSFRFMG      |     |
| pM50 del MCMV   | (98)  | RVCD-FNF-LSYNEAIVVTLADIERIK-----CDKGVLINCVVRKSNHSGMSYNIIEV       |     |
|                 |       |                                                                  |     |
|                 |       | #####                                                            | ##  |
| pUL50 del HCMV  | (149) | IATGPENEGEYENILRELYAKKAASTSLAVRNHVTVSSHSGSGPSLWRARMSAALTRTAG     |     |
| UL34 del HSV-1  | (171) | PEDAGRTRRILCRAAEQAITRRR-----R-TRRSR                              |     |
| UL34 del HSV-2  | (171) | PEDAVRTRRILCRAAEQALARRRR-----SRRSQ                               |     |
| orf24 del VZV   | (171) | PEDPSRTIKLMARATDAYMYKET-----GNNL                                 |     |
| U34 del HHV-6A  | (149) | VATGPENESEYISLEKAIIFLKCKSMGKQHL-----SNRFCQGLR                    |     |
| U34 del HHV-6B  | (149) | VATGPENESEYISLEKAIIFLKCKSMGKQHL-----SNRFCQGLR                    |     |
| U34 del HHV-7   | (146) | VATGPESESEYIALKAIILKKFLER-----QDLE                               |     |
| BFLF1 del EBV   | (167) | LVECAANAQKASRVNDMISDMSQQLSR-----SGQVE                            |     |
| ORF67 del HHV-8 | (168) | LVTGKSHKRLKSEKETVYCLAAPVAD-----PGG--                             |     |
| UL34 del PrV    | (157) | PEDASQTORLLDRAENRORSVSR-----PGG--                                |     |
| pM50 del MCMV   | (148) | VATGPDNEAAYQALIRDIYARRMTS-----VPTDCGSLI                          |     |

**FIG. 4 B (continuación)**

**pUL50 del HCMV (209) KRSSRTASPPPPRHPSCSPTMVAAGGAAAGFRPPPPFMAAGSWRLCRCEACMGRCCAS**  
 UL34 del HSV-1 (200) EAYGAEAGLGVAGTG-----  
 UL34 del HSV-2 (200) DDYGAVVVAAAHHS-----  
 orf24 del VZV (198) DEYIRWRPSPFRSPP-----  
 U34 del HHV-6A (189) KRSSHVLEKGRFES-----  
 U34 del HHV-6B (189) KRSSHVLEKGRQLGS-----  
 U34 del HHV-7 (177) KHRRAARHIKKPLRL-----  
 BFLF1 del EBV (199) DTGARVTGGGGFRP-----GVTHSGCLGDSHVR-----G  
 ORF67 del HHV-8 (195) --SAAQGGAGFTN-----  
 UL34 del PrV (183) GAGGGDDGEGSPSR-----  
 pM50 del MCMV (182) CRRARCLAAAPERR-----PPPPPPPGQRWGSRLKHGPVLTTRYAG

**pUL50 del HCMV (269) EGDADDEEEELALAGEGKAAAAAGQDVGGSARRPLEEHVSRRRGVSTHRRHPPSPPCA**  
 UL34 del HSV-1 (215) -----FRARGDGFGLPLLTQGPSR-----  
 UL34 del HSV-2 (214) -----SGAPGPGVAASGPPAPPGRG-----  
 orf24 del VZV (212) -----ENGSPNTSVQMOSDIKPA-----  
 U34 del HHV-6A (203) -----SGK-----VVNKASAVVTSQESIKQFYEK-----EK-----  
 U34 del HHV-6B (203) -----SGE-----IANKASAVVTSQESINQFYEK-----EK-----  
 U34 del HHV-7 (191) -----QLKSVGEMTSFRSINYMENT-----MD-----  
 BFLF1 del EBV (228) RGG----WDLDNFSEAETEDASYAPWRDKDSWSESE-----AAPWK  
 ORF67 del HHV-8 (207) -----GRDARACTEDVTAVYWAGQG-----  
 UL34 del PrV (197) -----APIRPTVISPVFGHAAAAFVGQAAYP-----  
 pM50 del MCMV (223) GGGAANKQFAAASFTSISTESSPAAPSRDQDQTRPP-----PAGDTN

**pUL50 del HCMV (329) PSLERTGYRWAPSSWWRRARSQSPQSGPWLPARFATLGPLVLALLLVALLLWRGHGQSS**  
 UL34 del HSV-1 (235) -----PWHQALRGLKHLRIG-----PPALVLAAGLVLCAAIWWVVGAGARL-  
 UL34 del HSV-2 (234) ----PARPWHQAVQLFRAPRPG-----PPALLLLAAGLFLCAAIWWAVGARL-----  
 orf24 del VZV (230) -----LPDTQTTRVWKLALPVAN-----VTYALFIVIVLVVVLGAVLFWK-----  
 U34 del HHV-6A (229) -----SLLSGVKFWRLSER-----HCRFALVGICFLLALYFCYVLLKKTTPA  
 U34 del HHV-6B (229) -----SFLSGVKFSRLSER-----HCRVAIVSICFLLALYFCYVLLKKTTPA  
 U34 del HHV-7 (213) -----AAVFPVTVPPIFARRNN-----ILCGFLVAALLIVCYVIFKEFALSA  
 BFLF1 del EBV (266) KELVRHFIRRHRTRETRMRGSHSRVEHVPPETRETIVVGAWRYSWRAIPYLARVLAVTA  
 ORF67 del HHV-8 (227) -----GRIVRIILG-----AFQWSELGRAVALVRRSWPWISAGIAFLC  
 UL34 del PrV (223) -----PPARFPASLLHTLLG-----LR-RLAGYAVACVTGALAIVIIILNMR---  
 pM50 del MCMV (265) VTAAETTYSSERTISFLTRHAN-----AINCALILAAAIALVLLWLLYWHARSAG

**pUL50 del HCMV (389) SPTRSAHRD---**  
 UL34 del HSV-1 (276) -----  
 UL34 del HSV-2 (277) -----  
 orf24 del VZV (270) -----  
 U34 del HHV-6A (272) SGGVV-----  
 U34 del HHV-6B (272) SGPVV-----  
 U34 del HHV-7 (254) DFSAV-----  
 BFLF1 del EBV (326) VALLIMFLRWT  
 ORF67 del HHV-8 (263) LGLVWMRPS--  
 UL34 del PrV (263) -----  
 pM50 del MCMV (315) HP-----

FIG. 5

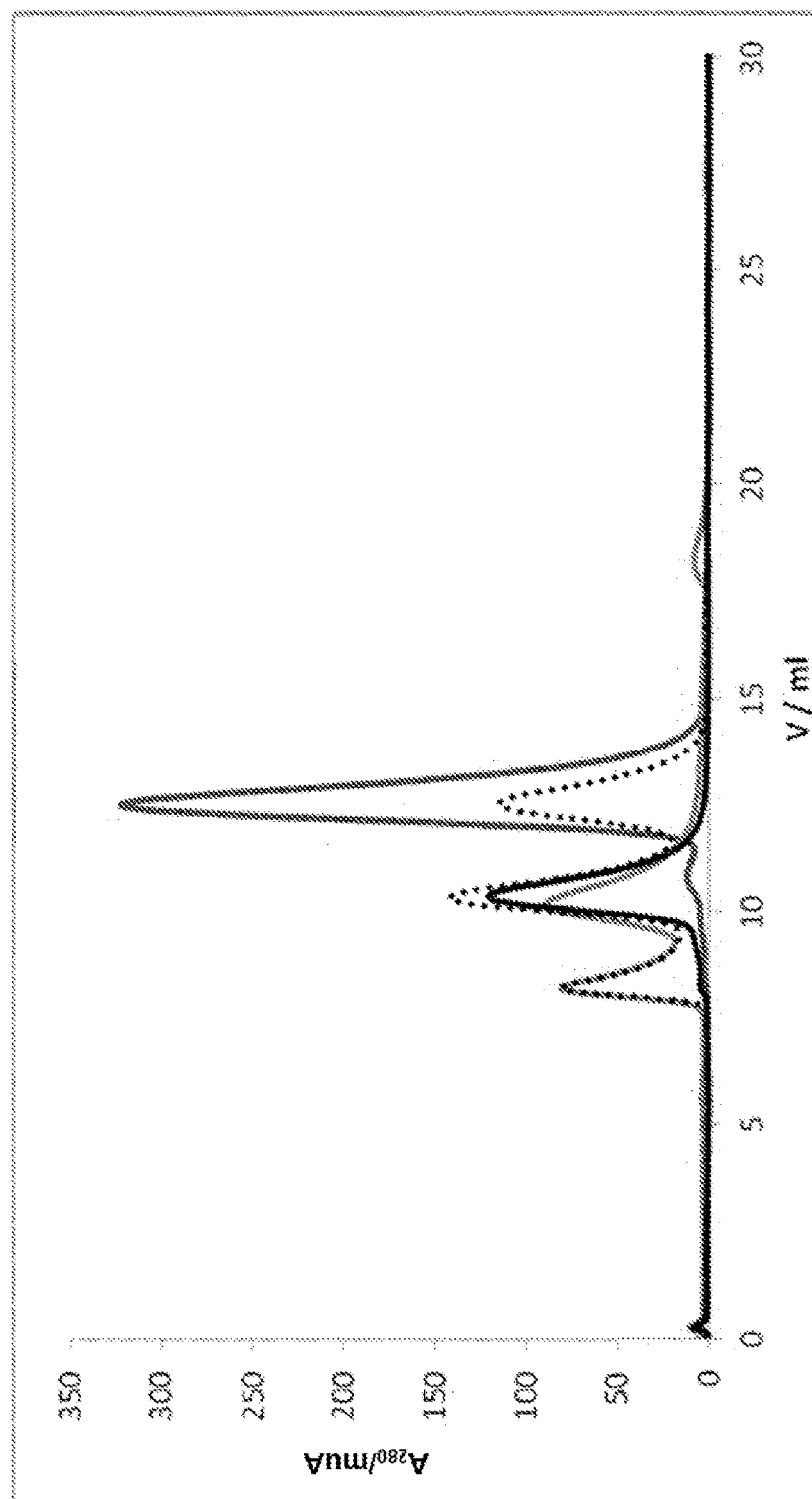
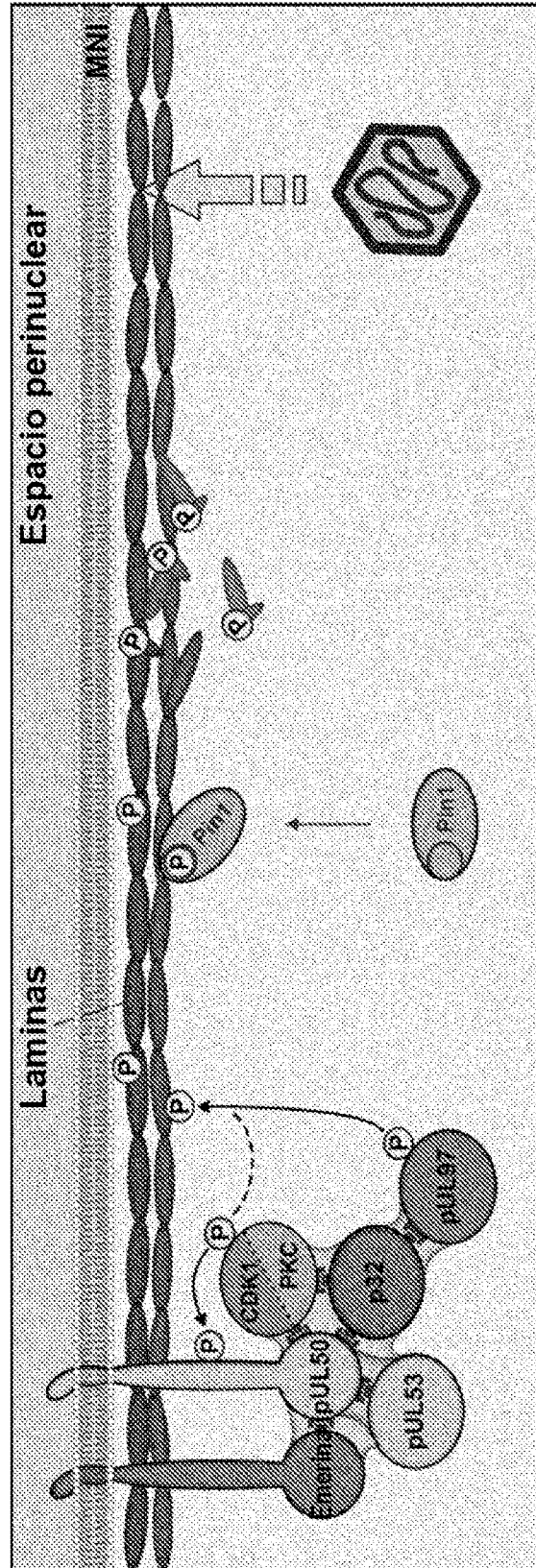
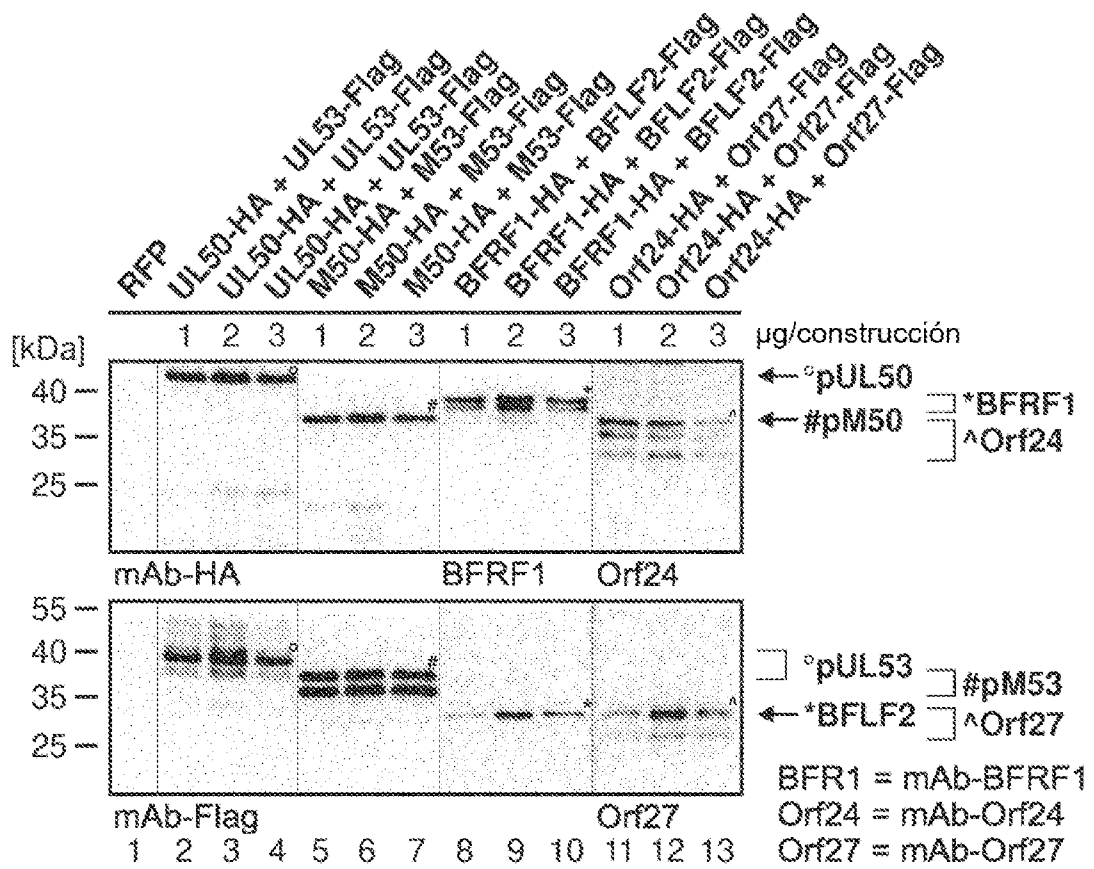


FIG. 6

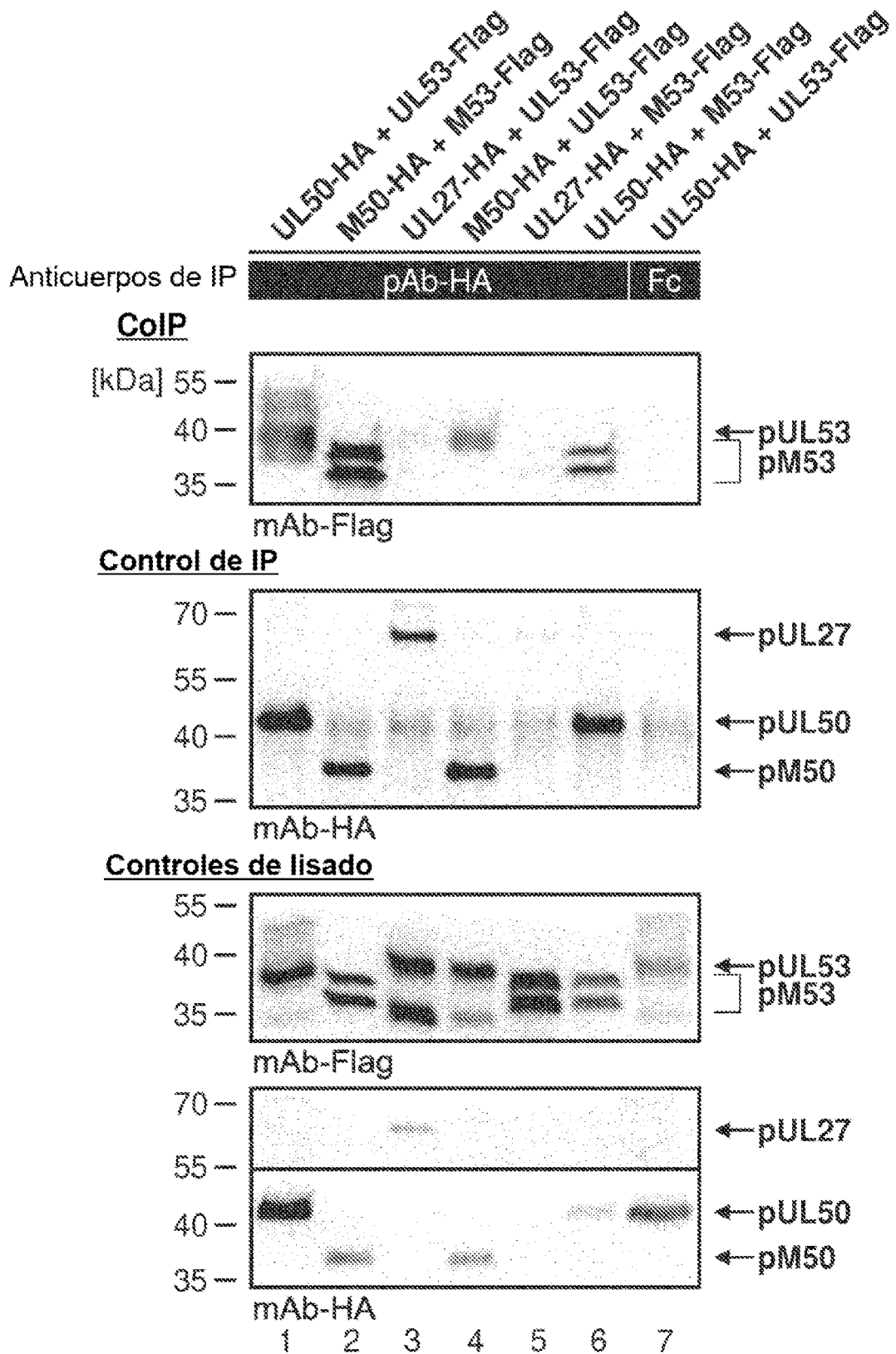


**NEC**      **NEC**      **fos. de**      **reclutamiento**      **laminas**      **LDA**      **Salida de**  
**central**      **central**      **Ser22**      **de Pin1**      **cis-trans**      **formadas**      **la cápside**  
**estructura**  
**"ganchos en surco"**

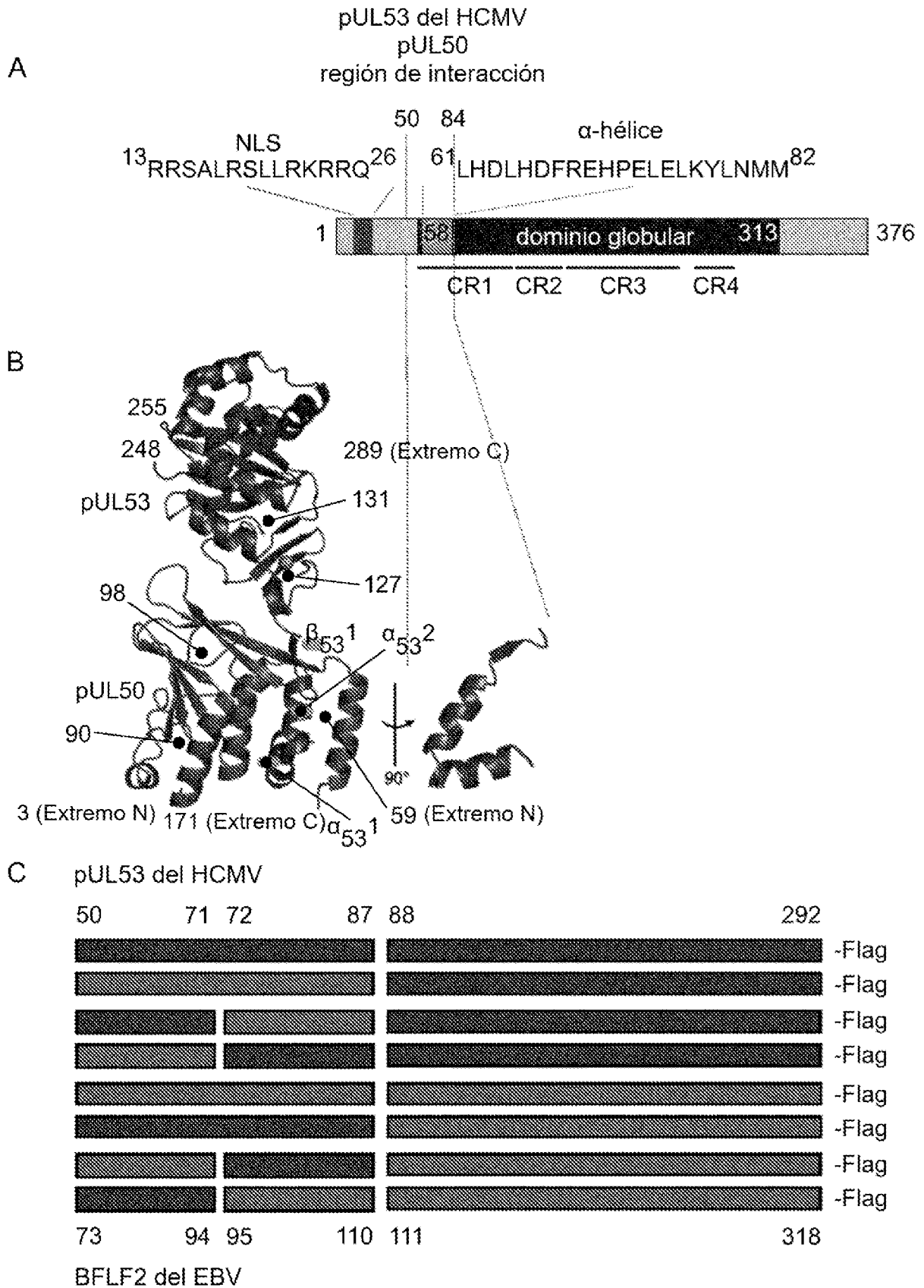
FIG. 7



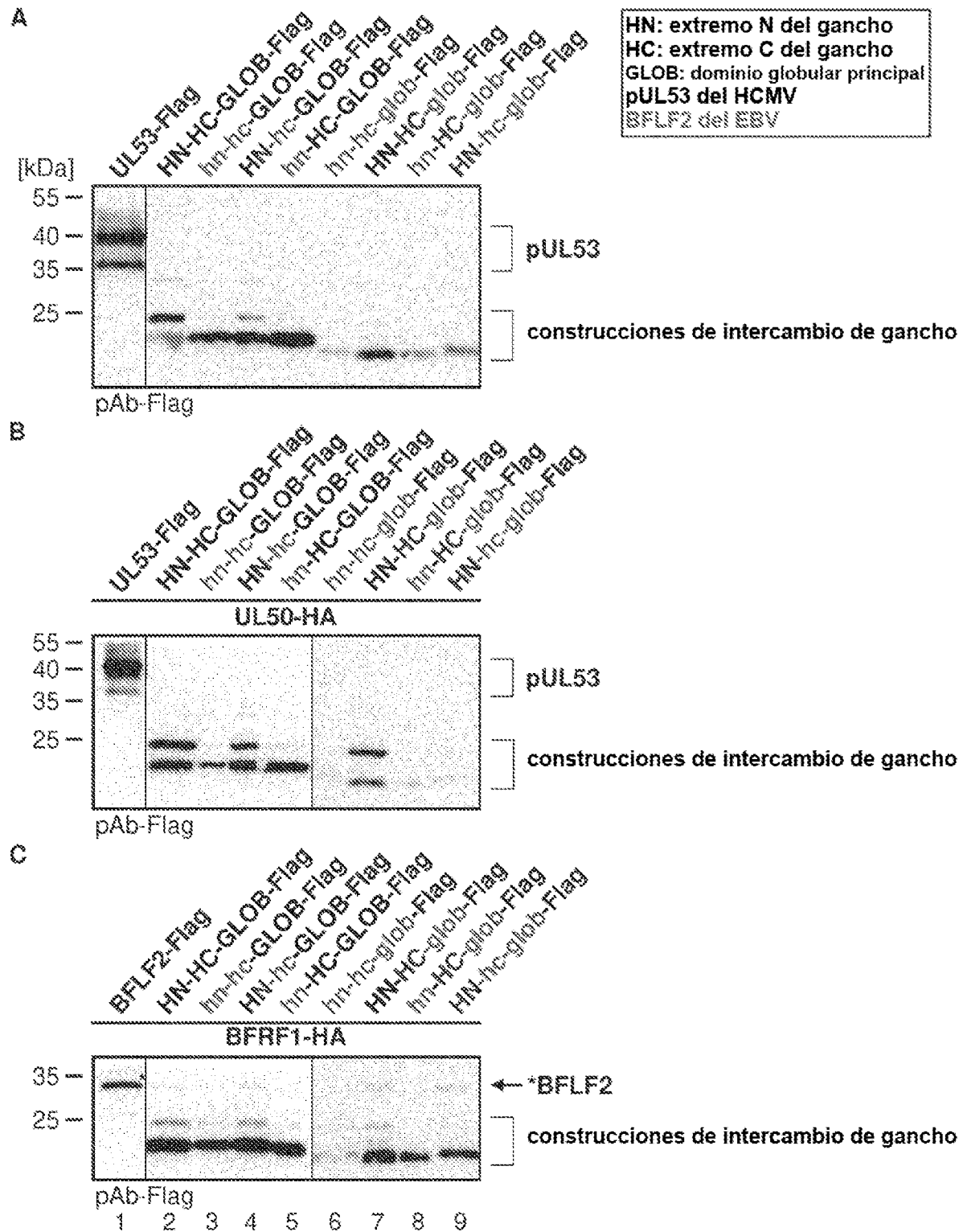
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**

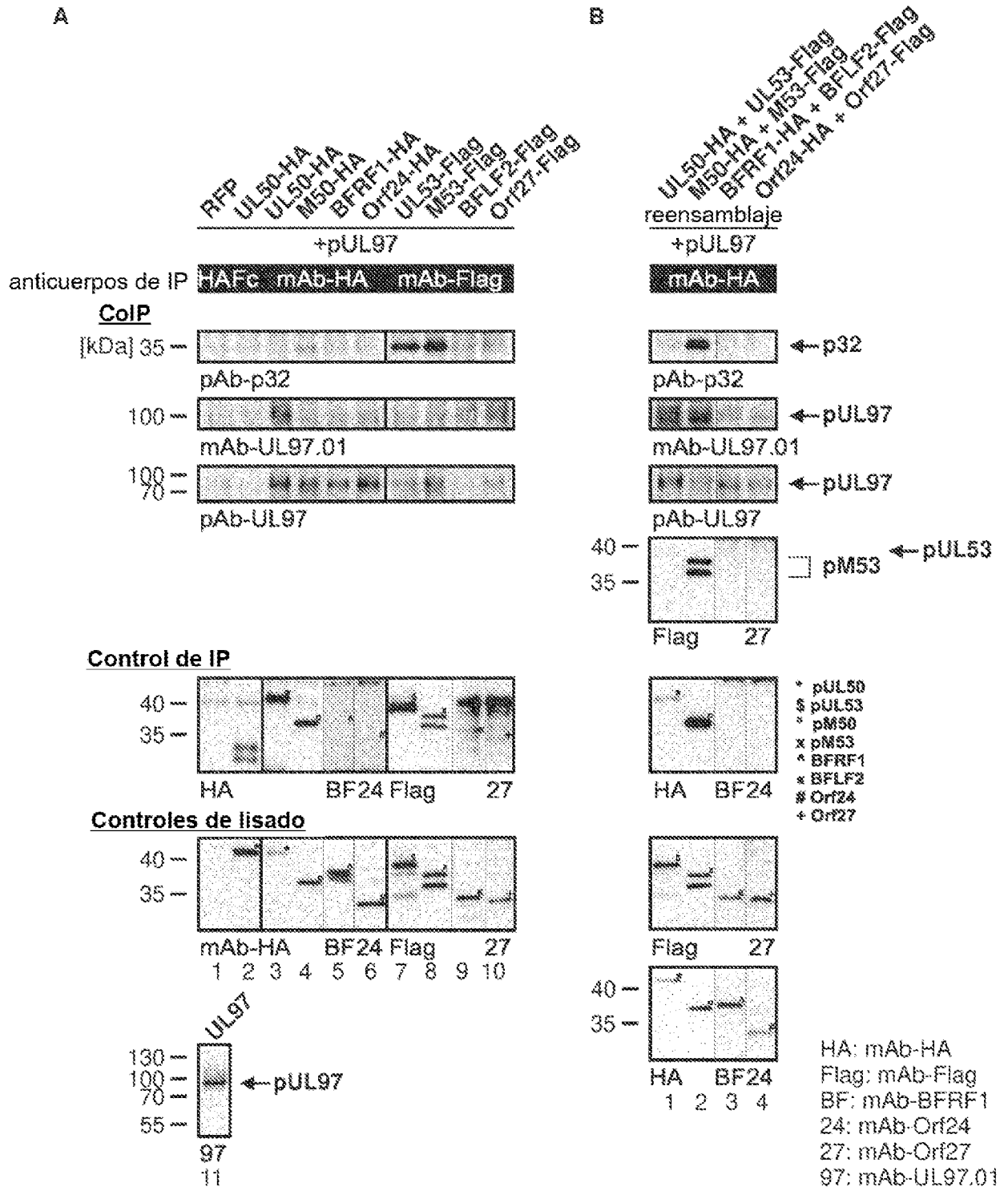


FIG. 12

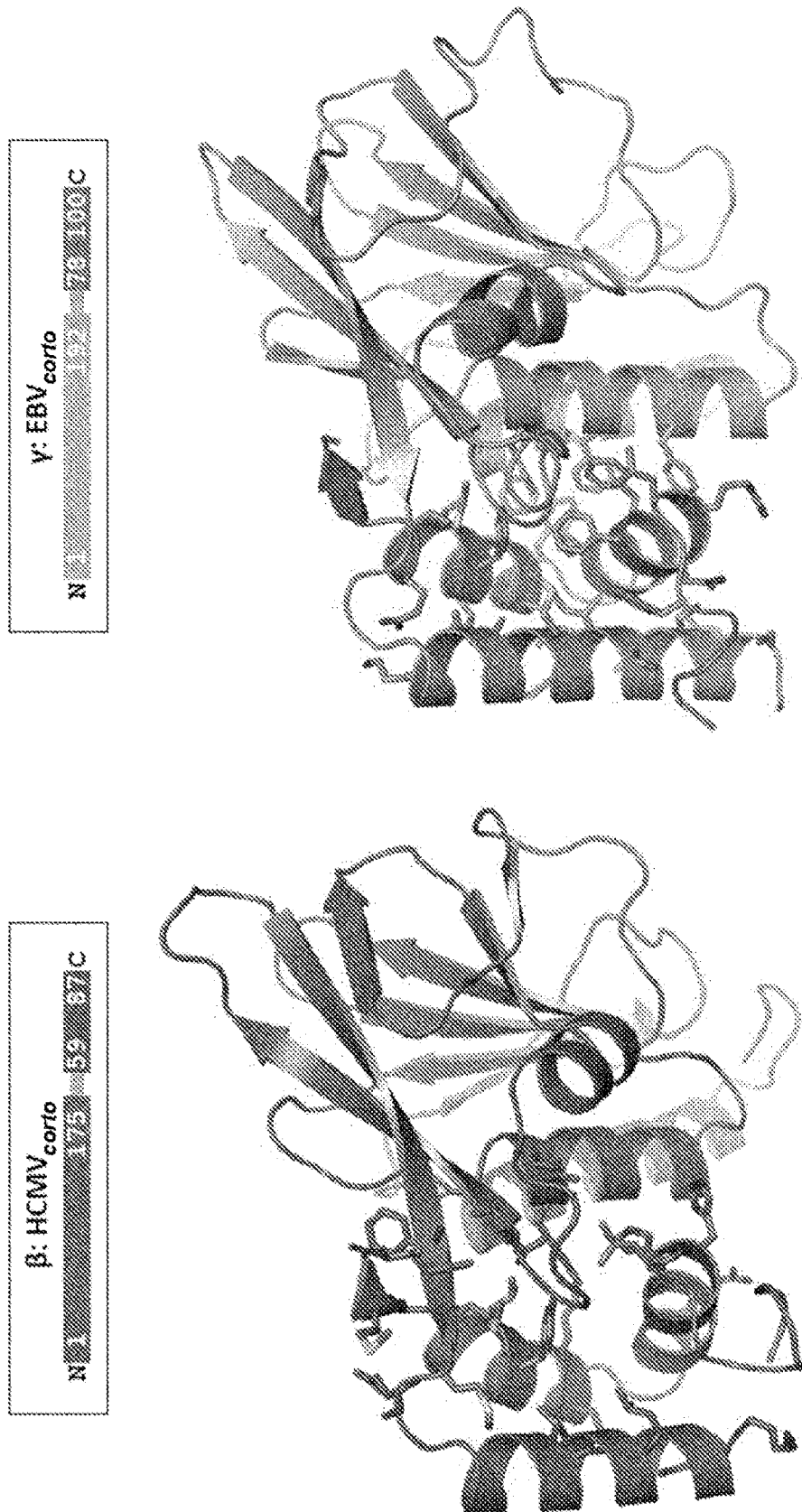


FIG. 13

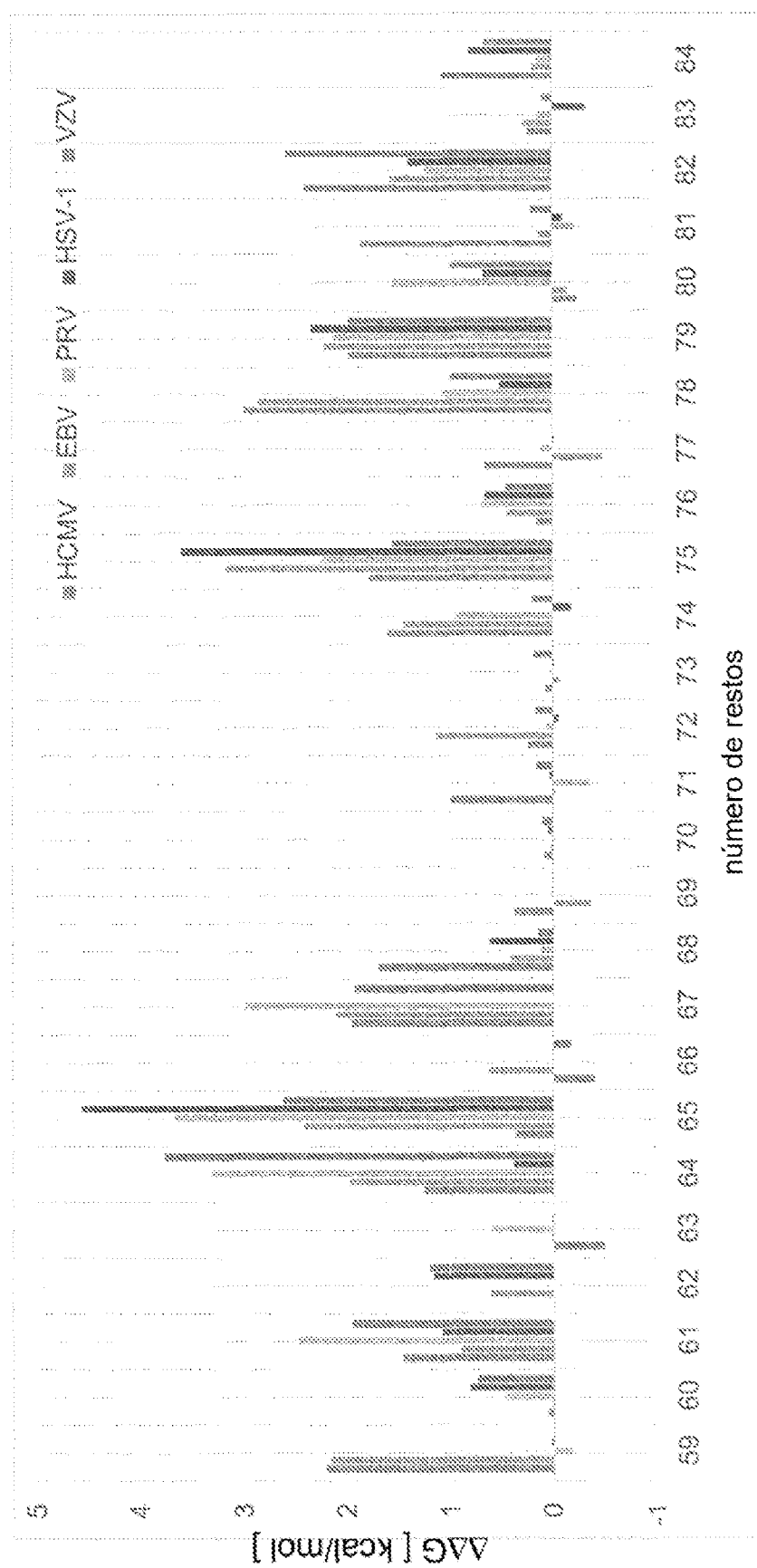
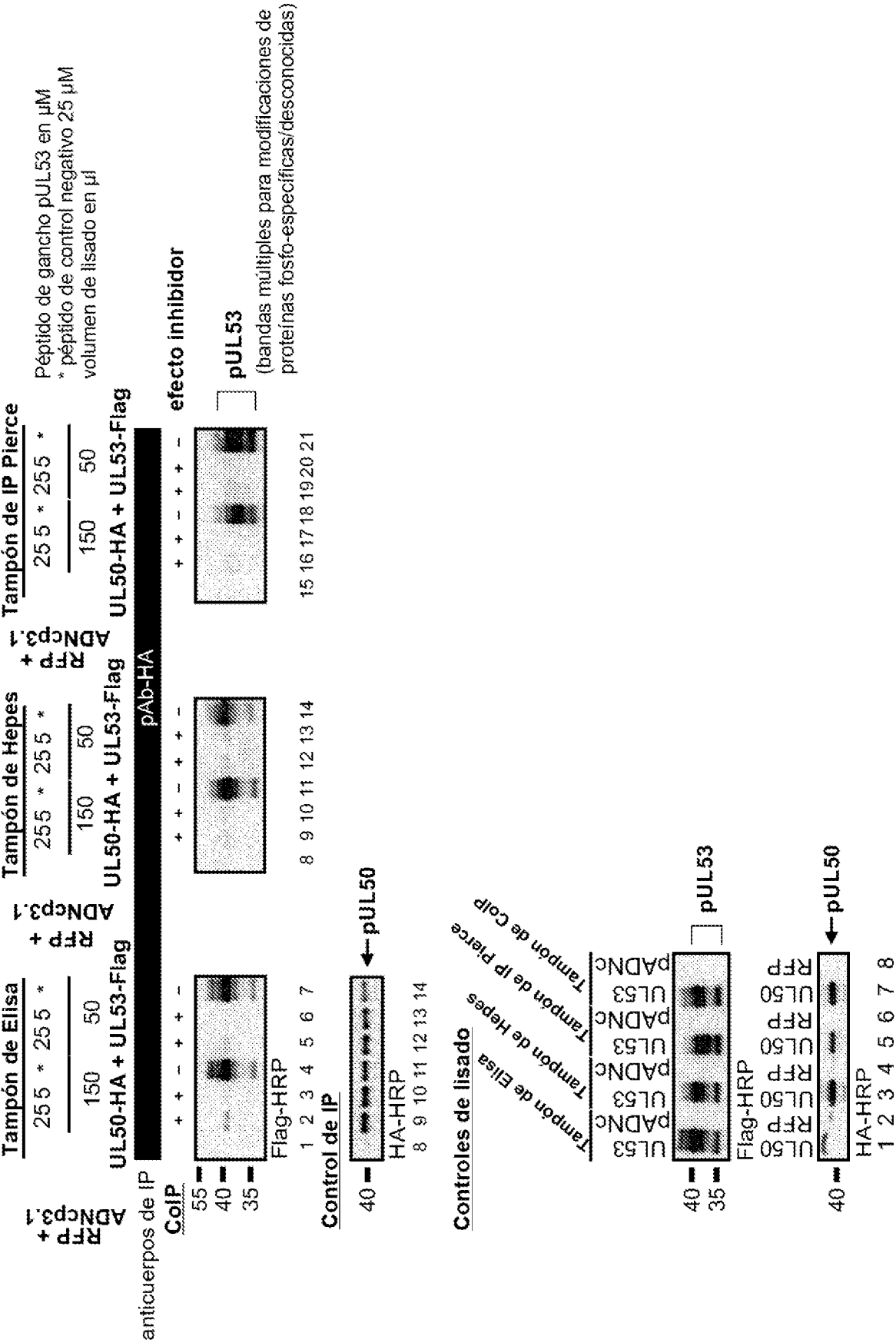


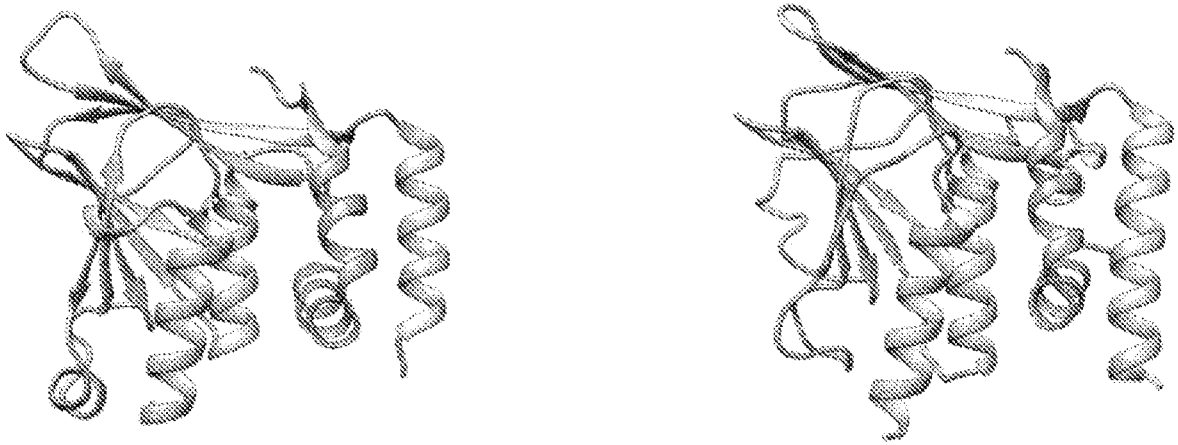
FIG. 14

|                   |  |               |                     |                     |         |     |
|-------------------|--|---------------|---------------------|---------------------|---------|-----|
| HCMV              |  | T L H D L     | H D I F R E H P E L | E L K Y L N M M K M | A I T G | 88  |
| EBV               |  | L F S L R D F | F R G I S A N F E L | G K D F L R E M N T | P I H   | 110 |
| Gancho compartido |  | F Y L W S M   | F I A I M R Y F E L | G M K Y L N M M M K | P M I G | 88  |

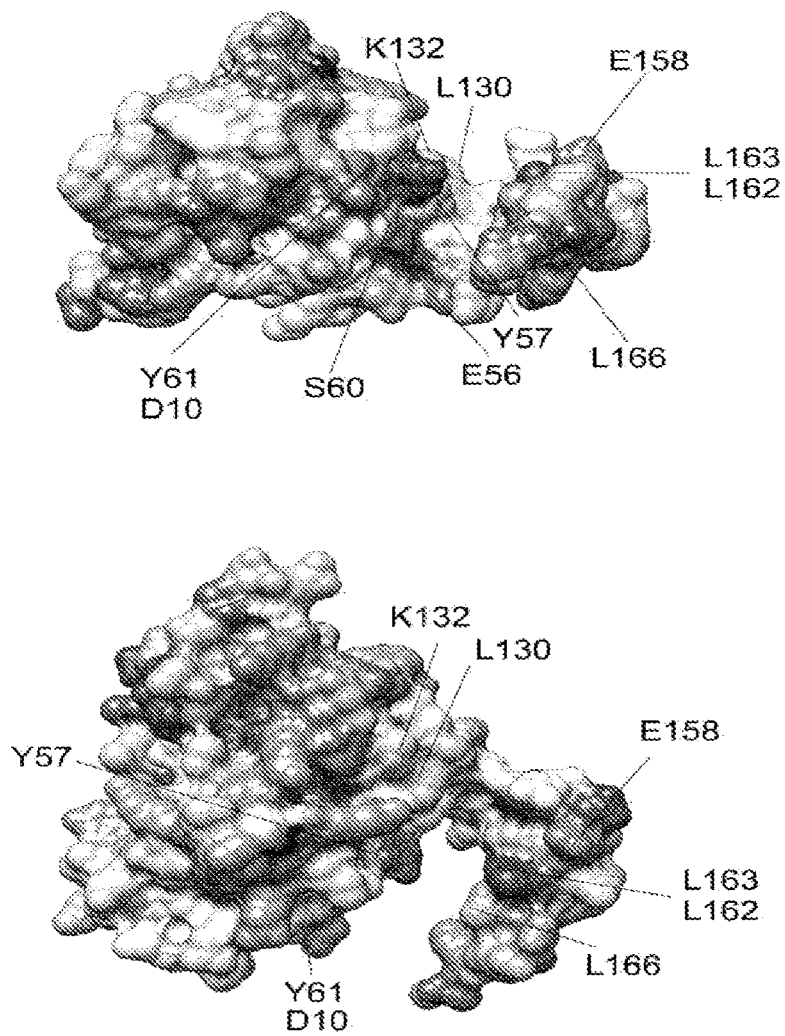
FIG. 15



**FIG. 16A**



**FIG. 16B**



**FIG. 17**

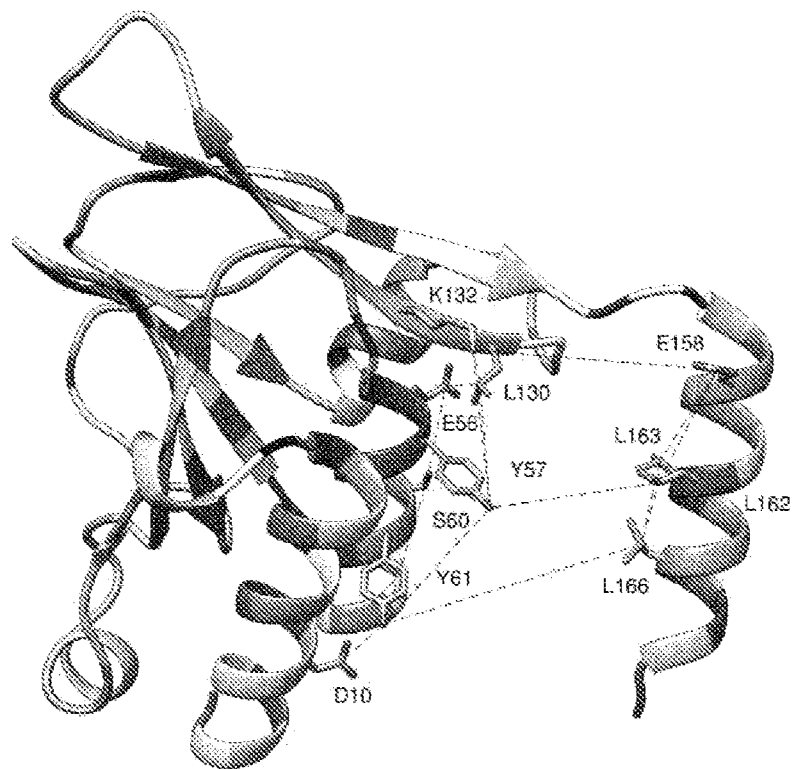


FIG. 18A

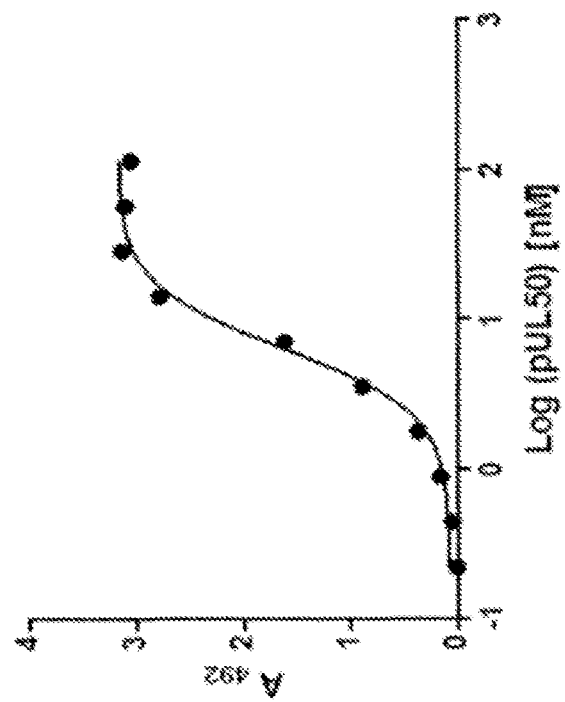
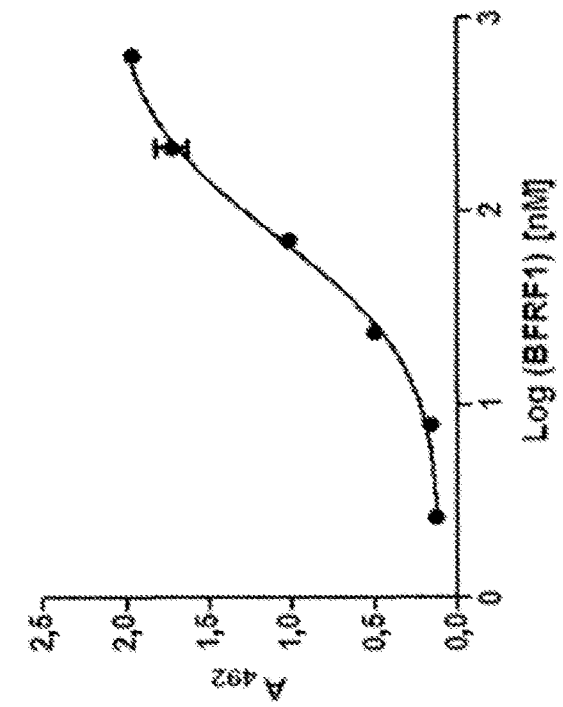


FIG. 18B



FIG. 18C

