



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 304 833**

② Número de solicitud: 200503240

⑤ Int. Cl.:
C07K 14/01 (2006.01)
C12N 15/34 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **23.12.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2008**

Fecha de la concesión: **07.10.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **21.10.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
21.10.2009

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Serrano de las Heras, Gemma;
Bravo García, Alicia y
Salas Falgueras, Margarita**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉑ Título: **Inhibidor de la enzima uracil DNA glicosilasa y aplicaciones.**

㉒ Resumen:

Inhibidor de la enzima uracil DNA glicosilasa y aplicaciones.

Se describe una proteína con capacidad de unirse e inhibir la enzima uracil DNA glicosilasa (UDG) viral y su empleo como agente terapéutico, en particular, como agente antiviral.

ES 2 304 833 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Inhibidor de la enzima uracil DNA glicosilasa y aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con una proteína inhibidora de la enzima uracil DNA glicosilasa (UDG) viral y su empleo como agente terapéutico, en particular, como agente antiviral.

10 **Antecedentes de la invención**

Las infecciones virales en personas y animales, especialmente en personas, están ampliamente extendidas y plantean al personal sanitario múltiples problemas. Los agentes farmacéuticos capaces de luchar eficaz y específicamente contra los virus se encuentran en número más que limitado provocando además generalmente efectos secundarios indeseables. Las infecciones virales, no solamente destruyen las células huésped, sino que afectan también al funcionamiento de diversas proteínas y enzimas. La invasión viral favorece la infección por otros agentes patógenos tales como otros virus, bacterias, hongos, etc. Así, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), debido a la pérdida inmunitaria que produce, abre la vía a otros virus (herpes simplex, citomegalovirus, virus de la hepatitis B) y a otros agentes patógenos que invaden el organismo humano, creando situaciones peligrosas.

A pesar de intensos esfuerzos, hasta ahora aún no se han conseguido encontrar agentes quimioterapéuticos que, con éxito esencialmente reconocible, interfieran originaria o sintómicamente con los episodios patogénicos causados por agentes virales. Por lo tanto, el tratamiento de las enfermedades virales mediante agentes quimioterapéuticos sigue siendo incompleto.

Conjugados de anticuerpos, formados por un anticuerpo monoclonal conjugado o hibridado y una toxina, se han utilizado para erradicar poblaciones específicas de células diana, dirigiéndolos hacia células diana “no deseadas”, portadoras de los antígenos diana de superficie, y destruyéndolas. Las diversas toxinas que han sido empleadas por diferentes investigadores pueden clasificarse, en un sentido amplio, en dos grupos. El primer grupo consta de toxinas intactas, tales como ricina intacta. Estas toxinas no pueden aplicarse *in vivo* de una manera segura debido a su toxicidad letal. Las toxinas del segundo grupo se designan como hemitoxinas. Las hemitoxinas son proteínas monocatenarias inactivadoras de los ribosomas que actúan catalíticamente sobre los ribosomas eucarióticos e inactivan a la subunidad 60S, dando como resultado una inhibición, dependiente de la dosis, de la síntesis de proteínas celulares al nivel de la elongación de péptidos.

Una hemitoxina de interés es la proteína antivírica de la hierba carmín (PAP, del inglés pokeweed antiviral protein) que se aísla de *Phytolacca americana*. Desde hace muchos años se ha reconocido que la PAP presenta actividad antivírica. Se ha demostrado que la PAP bloquea la transmisión en plantas de virus que contienen ARN. También se ha informado de que la PAP inhibe la replicación de dos virus animales que contienen ARN: el poliovirus y el influenza virus así como de que la PAP inhibe la multiplicación del virus del herpes simple de tipo I y de tipo II (patente estadounidense US 4.672.053). Aunque se ha informado de que los conjugados con PAP de los anticuerpos monoclonales G3.7/CD7, F13/CD14 y B43/CD19 inhiben la replicación del VIH-1, estos conjugados han resultado incoherentes en su capacidad para inhibir la replicación de los virus.

A la vista de lo anterior, sigue existiendo la necesidad de proporcionar nuevos compuestos o fármacos antivirales. Ventajosamente, dichos nuevos antivirales deberían presentar una eficacia igual o superior a la de los antivirales descritos en el estado de la técnica y no deberían provocar efectos secundarios indeseables.

La mayoría de las células procarióticas y eucarióticas codifican la enzima uracil DNA glicosilasa (UDG). La función de esta enzima es eliminar los residuos de uracilo que aparezcan en el DNA debido a la desaminación de citosinas o a la incorporación errónea de dUMP durante el proceso de replicación. Por ejemplo, si ocurre una desaminación de citosina y no es reparada, se producirá una mutación de transición de C a T en la hebra de DNA en la que se ha dado dicha desaminación y, consecuentemente, se producirá una mutación de transición de G a A en la hebra complementaria tras la siguiente ronda de replicación. Una vez se elimina el uracilo por la enzima UDG se crea un sitio apurínico o apirimidínico (sitio AP). El mecanismo encargado de reparar estos sitios AP es el de la ruta de reparación por escisión de base.

En células humanas, se han identificado hasta cinco enzimas diferentes con actividad UDG. Curiosamente, una de estas enzimas, denominada UNG2, está presente en las partículas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1). Además, algunos virus DNA, como los herpesvirus y los poxvirus, codifican su propia actividad UDG. La capacidad de la enzima UDG de influir en la replicación viral de diferentes herpesvirus ha llevado a implicar a dicha enzima en el mecanismo de replicación del virus en la célula hospedadora. En los virus mencionados, se sabe que la enzima UDG es esencial para el proceso infeccioso. Se ha propuesto que la función de esta enzima en los procesos de replicación viral está asociada con la capacidad de dichos virus de replicarse en células que no se están dividiendo donde los niveles de enzima UDG celular son considerados bajos (Priest y cols. (2005) Mol. Cell 17: 479-490) y, en consecuencia, su inhibición tiene interés terapéutico. Hasta ahora, se han diseñado algunos inhibidores de la enzima UDG codificada por el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1). Estos compuestos sintéticos de naturaleza no proteica

han sido ensayados en sistemas *in vitro*. Por otro lado, se sabe que la proteína UGI codificada por el bacteriófago PBS2 inhibe la enzima UDG del virus HSV-1. Sin embargo, este inhibidor tiene el inconveniente de que también bloquea la actividad UDG de la enzima UNG2 humana.

5 Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de una proteína con capacidad inhibidora de la enzima UDG. Debido a que la actividad UDG de algunos virus es esencial para el proceso infectivo, dicha proteína podría constituir una herramienta útil para el diseño de compuestos antivirales.

10

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma con capacidad inhibidora de la enzima UDG.

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido aislado que codifica para dicha proteína.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende dicho polinucleótido.

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende dicho polinucleótido o dicha construcción génica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende dicho polinucleótido, o dicha construcción génica, o dicho vector.

25

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de dicha proteína que comprende cultivar dicha célula bajo condiciones que permiten la producción de dicha proteína y, si se desea, recuperar dicha proteína del medio de cultivo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende dicha proteína.

30

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende dicha proteína junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicha proteína en la elaboración de una composición farmacéutica antiviral.

35

Breve descripción de las figuras

40

La Figura 1 muestra la actividad UDG en extractos de *B. subtilis*. Se incubó el sustrato ssDNA-U¹⁶ marcado radiactivamente (S) (0,55 ng) con la cantidad indicada de extracto en ausencia de Mg²⁺. Como control interno, se incubó el sustrato con la enzima UDG de *E. coli*. Las mezclas de reacción fueron tratadas con NaOH o no. La formación del producto de corte (P) fue analizada en gels de poliacrilamida/urea.

45

En la Figura 2 se muestra la inhibición de la actividad UDG de *B. subtilis* por la proteína p56. Se añadió la cantidad indicada de p56 a 1,6 µg de extracto. Las reacciones fueron tratadas con NaOH.

La Figura 3 muestra la co-elución de UDG de *B. subtilis* con la proteína p56FLAG utilizando columnas anti-FLAG M2 (Sigma). A la derecha se indica la masa molecular (kDa) de los marcadores utilizados.

50

En la Figura 4 se muestra la interacción de la proteína p56 con la enzima UDG de *E. coli* analizada en un gel de poliacrilamida nativo.

Descripción detallada de la invención

55

La invención se relaciona, en general, con una proteína con capacidad inhibidora de la enzima uracil DNA glicosilasa (UDG), que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma que mantiene dicha capacidad inhibidora de la enzima UDG, y con su empleo como agente terapéutico, en particular, como agente antiviral.

60

En un aspecto, la invención se relaciona con una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma con capacidad inhibidora de la enzima uracil DNA glicosilasa (UDG).

65

Por razones de simplicidad, bajo la denominación “proteína de la invención” se incluyen dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma con capacidad inhibidora de la enzima UDG. El término “proteína”, tal como aquí se utiliza, incluye todas las formas de modificaciones post-traduccionales, por ejemplo glicosilación, fosforilación o acetilación.

En una realización particular, la proteína de la invención comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1 y presenta, al menos, capacidad de unirse a dicha enzima UDG e inhibir su

ES 2 304 833 B1

actividad, por lo que puede ser utilizada como agente antiviral. En una realización concreta, la proteína de la invención es la denominada proteína p56 del bacteriófago phi29 (φ 29).

5 En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a un péptido sustancialmente homólogo y funcionalmente equivalente a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Tal como aquí se utiliza, un péptido es “sustancialmente homólogo” a dicha proteína cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de dicha proteína, de, al menos, un 60%, ventajosamente de, al menos un 70%, preferentemente de, al menos, un 85%, y, más preferentemente de, al menos, un 95%. Asimismo, la expresión “funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que el péptido en cuestión mantiene la capacidad inhibidora de la actividad de la enzima UDG. La capacidad inhibidora de la actividad de la enzima UDG se puede determinar mediante el ensayo descrito en el Ejemplo 1 (véase el apartado 1.5 de los Materiales y Métodos); asimismo, la capacidad de unión de un péptido o proteína a la enzima UDG se puede determinar mediante el ensayo descrito en el Ejemplo 1 (véase el apartado 1.6 de los Materiales y Métodos).

15 En una realización particular, dicha variante es una forma mutante de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 que mantiene la capacidad inhibidora de la actividad de la enzima UDG. Dicha forma mutante puede presentar inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a la proteína que comprende la SEQ ID NO: 1, con la condición de que conserve la capacidad inhibidora de la actividad de la enzima UDG.

20 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variantes incluidas dentro del ámbito de la presente invención incluyen la proteína identificada en esta descripción como la proteína p56FLAG obtenida mediante modificación del gen 56 (que codifica para la proteína p56 de φ 29) para que codifique una proteína p56 que contiene la secuencia aminoacídica DYKDDDDK (péptido FLAG) [SEQ ID NO: 9] fusionada a su extremo C-terminal, tal como se describe en el Ejemplo 1 (véase el apartado 1.3 de los Materiales y Métodos). Mediante cromatografía de afinidad, se ha demostrado que dicha proteína p56FLAG interacciona con la enzima UDG (véase el Ejemplo 1).

25 Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, el término “fragmento” se refiere a un péptido que comprende una porción de dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, una secuencia de aminoácidos contiguos comprendida dentro de dicha SEQ ID NO: 1; para su empleo en la presente invención dicho fragmento debe tener capacidad inhibidora de la actividad de la enzima UDG.

30 La proteína de la invención se puede obtener a partir de un organismo productor de la misma, mediante un procedimiento que comprende cultivar dicho organismo bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha proteína y recuperarla. En una realización particular de esta invención, el organismo productor es el bacteriófago φ 29. En el Ejemplo 1 se describe la producción, aislamiento y purificación de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, en concreto la proteína p56 de φ 29, así como de una variante de la misma (p56FLAG) con capacidad de unirse a la enzima UDG e inhibir su actividad enzimática.

35 Adicionalmente, la proteína de la invención puede formar parte de una proteína de fusión. En este sentido, a modo ilustrativo, no limitativo, dicha proteína de fusión puede contener una región A constituida por un primer péptido que comprende la proteína de la invención unida a una región B que comprende un segundo péptido. Dicho segundo péptido puede ser cualquier péptido apropiado, por ejemplo, un péptido con actividad antiviral. En una realización particular, dicho segundo péptido puede ser una proteína de la invención. Dicha región B puede estar unida a la región amino-terminal de dicha región A, o bien, alternativamente, dicha región B puede estar unida a la región carboxilo-terminal de dicha región A. Ambas regiones A y B pueden estar unidas directamente o a través de un péptido espaciador (linker) entre dichas regiones A y B. La proteína de fusión puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión en células hospedadoras apropiadas.

40 La proteína de la invención puede encontrarse, si se desea, en una composición que comprende dicha proteína de la invención y un vehículo inerte. Dicha composición constituye un aspecto adicional de esta invención.

45 Prácticamente cualquier vehículo inerte, es decir, que no resulte perjudicial para la proteína de la invención, puede ser utilizada en la elaboración de dicha composición. En una realización particular, a modo ilustrativo, no limitativo, dicha composición comprende una proteína de la invención y un tampón constituido por Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 7 mM y 50% de glicerol, adecuado para guardar la proteína de la invención purificada a -70°C.

50 A partir de la información proporcionada por la proteína de la invención, se puede identificar y aislar la secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha proteína mediante el empleo de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la creación de genotecas de DNA genómico (DNAG) o de DNA copia (cDNA) de organismos productores de dicha proteína; el diseño de oligonucleótidos adecuados para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una región del clon genómico de los organismos productores de dicha proteína que sirva para obtener sondas destinadas a escrutar dichas genotecas; y el análisis y selección de los clones positivos.

ES 2 304 833 B1

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido aislado, en adelante polinucleótido de la invención, que codifica para dicha proteína de la invención.

5 En una realización particular, el polinucleótido de la invención comprende, o está constituido por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 2. En una realización concreta, el polinucleótido de la invención codifica para la proteína p56 de $\varphi 29$. Alternativamente, el polinucleótido de la invención puede presentar variaciones en su secuencia respecto a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2, por ejemplo, sustituciones, inserciones y/o deleciones de uno o más nucleótidos, con la condición de que el polinucleótido resultante codifica para una proteína de la invención. Por tanto, dentro del ámbito de la presente invención se encuentran polinucleótidos sustancialmente homólogos al polinucleótido de SEQ ID NO: 2 y codifica para una proteína de la invención.

15 En el sentido utilizado en esta descripción, un polinucleótido es “sustancialmente homólogo” al polinucleótido de SEQ ID NO: 2 cuando su secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 de, al menos, un 60%, ventajosamente de, al menos un 70%, preferentemente de, al menos, un 85%, y, más preferentemente de, al menos, un 95%. Típicamente un polinucleótido sustancialmente homólogo al polinucleótido de SEQ ID NO: 2 se puede aislar de un organismo productor de la proteína de la invención en base a la información contenida en dicha SEQ. ID. NO: 2, o bien se construye en base a la secuencia de DNA mostrada en la SEQ. ID. NO: 2, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones conservativas o no conservativas. Otros ejemplos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica, en adelante construcción génica de la invención, que comprende dicho polinucleótido de la invención.

30 La construcción génica de la invención puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión del polinucleótido de la invención, constituyendo de este modo un cassette de expresión. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “operativamente unida” significa que la proteína de la invención, codificada por el polinucleótido de la invención, es expresada en el marco de lectura correcto bajo el control de las secuencias de control o reguladoras de expresión.

35 Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción de la proteína de la invención, e incluyen secuencias promotoras, secuencias codificantes para reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. En una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos procariotas, por ejemplo, bacterias, etc., mientras que en otra realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos eucariotas, por ejemplo, células de insecto, células vegetales, células de mamífero, etc. Ventajosamente, la construcción de la invención comprende, además, un marcador o gen que codifica para un motivo o para un fenotipo que permita la selección de la célula hospedadora transformada con dicha construcción.

40 La construcción génica de la invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook *et al.*, “Molecular cloning, a Laboratory Manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3].

45 La construcción génica de la invención puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector recombinante, en adelante vector de la invención, que comprende el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. En una realización particular, el vector de la invención es un vector de expresión.

50 A modo ilustrativo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ácido nucleico puede ser un plásmido que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de vectores en los que puede insertarse el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención incluyen el plásmido pCR2.1-TOPO (vector de expresión de *Escherichia coli*) comercializado por Invitrogen o el plásmido pPR53 (vector de expresión de *Bacillus subtilis*) (Bravo y Salas (1997) J. Mol. Biol. 269: 102-112).

55 La obtención del vector de la invención puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook *et al.*, “Molecular cloning, a Laboratory Manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3]. En una realización particular, dicho vector es un vector útil para transformar células animales.

60 El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. El vector de la invención puede ser utilizado para transformar células eucariotas, tales como células de levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, o células procariotas, tales como bacterias, por ejemplo, *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por el vector de la invención incluyen *E. coli* TOP10 (Invitrogen), *E. coli* BL21(DE3) (Studier y Moffatt (1986) J. Mol.

ES 2 304 833 B1

Biol. 189: 113-130), *B. subtilis 110NA* (Moreno y cols. (1974) Virology 62: 1-16) y *B. subtilis* YB886 (Yasbin y cols. (1980) Gene 12: 155-159).

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora, en adelante célula de la invención, transformada, transfectada o infectada con un vector proporcionado por esta invención. La célula de la invención comprende, por tanto, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un cassette de expresión proporcionado por esta invención o bien un vector de la invención, y es capaz de expresar la proteína de la invención.

La célula de la invención puede ser una célula eucariota, tal como una célula de levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae*, o una célula procariota, tal como una bacteria, por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de células que pueden ser utilizadas para la obtención de células de la invención incluyen *E. coli* TOP 10 (Invitrogen), *E. coli* BL21(DE3) (Studier y Moffatt (1986) J. Mol. Biol. 189: 113-130), *B. subtilis 110NA* (Moreno y cols. (1974) Virology 62: 1-16) y *B. subtilis* YB886 (Yasbin y cols. (1980) Gene 12: 155-159).

Las células de la invención pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook *et al.*, 1989, citado *supra*].

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de una proteína de la invención, que comprende cultivar una célula de la invención bajo condiciones que permiten la producción de dicha proteína y, si se desea, recuperar dicha proteína del medio de cultivo. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula dependerá de la célula utilizada. El procedimiento para producir la proteína de la invención incluye, opcionalmente, el aislamiento y purificación de dicha proteína de la invención.

Como se ha mencionado previamente, la proteína de la invención tiene capacidad inhibidora de la enzima UDG, por lo que puede ser utilizada como agente terapéutico, en particular, como agente antiviral.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con la proteína de la invención como agente terapéutico. En una realización particular, la invención se relaciona con la proteína de la invención como agente antiviral.

En general, para su administración a un sujeto, la proteína de la invención se formulará en una composición farmacéutica. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende una proteína de la invención junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término "sujeto", tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero no se limita, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

De forma más concreta, para su administración a un sujeto, la proteína de la invención se formulará en una forma farmacéutica adecuada para su administración por cualquier vía de administración a un sujeto. Para ello, la composición farmacéutica de la invención incluirá los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la elaboración de la forma farmacéutica de administración elegida.

La composición farmacéutica de la invención comprende, al menos, una proteína de la invención en una cantidad terapéuticamente eficiente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficiente" se refiere a la cantidad de proteína de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de proteína y el efecto terapéutico a conseguir.

A modo ilustrativo, la dosis de proteína de la invención a administrar a un sujeto será una cantidad terapéuticamente eficiente y puede variar dentro de un amplio intervalo. La composición farmacéutica de la invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos. La dosis de proteína de la invención a administrar dependerá de numerosos factores, entre los que se incluyen las características de la proteína de la invención empleada, tales como por ejemplo, su actividad y vida media biológica, la concentración de la proteína de la invención en la composición farmacéutica, la situación clínica del sujeto, la severidad de la infección o patología, la forma farmacéutica de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente.

La composición farmacéutica de la invención puede formularse en una forma farmacéutica de administración sólida, por ejemplo, (comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.) para su administración por cualquier vía de administración apropiada. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se administra por vía oral, rectal, tópica o parenteral (e.g., intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc.). En cada caso se elegirán los excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida.

En una realización particular, la proteína de la invención se formulará en una forma farmacéutica adecuada para su administración por vía tópica. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas formas farmacéuticas incluyen aero-

ES 2 304 833 B1

soles, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, pomadas, cremas, apósitos, parches, ungüentos, colutorios, etc. Para ello, la composición farmacéutica de la invención incluirá los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la elaboración de la forma farmacéutica de administración. Información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de la proteína de la invención puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En otra realización particular, la proteína de la invención se formulará en una forma farmacéutica para su administración por vía oral. En una realización particular, dicha forma farmacéutica de administración por vía oral de la proteína de la invención puede ser sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de formas farmacéuticas adecuadas para la administración de la proteína de la invención por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, jarabes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en la técnica, tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona, etc.; cargas, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol, glicina, etc.; lubricantes para la preparación de comprimidos, por ejemplo, estearato de magnesio, etc.; disgregantes, por ejemplo, almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón, celulosa microcristalina, etc.; agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tales como laurilsulfato sódico, etc. Información sobre dichos excipientes o vehículos, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de la proteína de la invención puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, citado *supra*.

En otra realización particular, la proteína de la invención se formulará en una forma farmacéutica para su administración por vía parenteral (e.g., intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc), por ejemplo, en forma de soluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en una forma farmacéutica unitaria apropiada. Pueden usarse excipientes adecuados, tales como agentes tamponantes, tensioactivos, conservantes, etc. Información sobre dichos excipientes o vehículos, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de la proteína de la invención puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, citado *supra*.

La producción de dichas formas farmacéuticas de administración de la proteína de la invención por cualquiera de las vías elegidas puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, tales como los métodos habituales descritos o referidos en las Farmacopeas Española y de los Estados Unidos y en textos de referencia similares. A modo ilustrativo, información sobre los procedimientos para la producción de dichas formas farmacéuticas de administración de la proteína de la invención puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, citado *supra*.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se utiliza como antiviral, es decir, en el tratamiento y/o prevención de infecciones virales, tales como las infecciones causadas por herpesvirus y poxvirus.

La composición farmacéutica de la invención puede usarse con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o facilitarse como una composición farmacéutica separada para su administración al mismo tiempo (administración simultánea) que la composición farmacéutica de la invención o en momentos diferentes (administración secuencial). En una realización particular, dichos fármacos utilizados en la terapia de combinación incluyen agentes antivirales.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de la proteína de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica antiviral, es decir, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de infecciones virales.

Dicha composición farmacéutica antiviral una composición farmacéutica de la invención y comprende, al menos, una proteína de la invención junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, dicha composición farmacéutica antiviral puede contener, además de una proteína de la invención, uno o más compuestos o fármacos anti-virales adicionales, de naturaleza proteica o no, con el fin de aumentar la eficiencia como agente antiviral de la proteína de la invención, generándose de este modo una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o sucesiva (secuencial en el tiempo) respecto a la administración de la composición farmacéutica de la invención.

El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

ES 2 304 833 B1

Ejemplo 1

La proteína p56 inhibe la actividad de la enzima UDG y además se une a ella

5 1. Materiales y Métodos

1.1 Construcción del plásmido pCR2.1-TOPO.p56

Se utilizó el sistema de clonaje TOPO TA desarrollado por Invitrogen. Brevemente, se amplificó una región del DNA de $\varphi 29$, que contiene el gen 56, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes oligonucleótidos como cebadores:

5'-CGCATTGTATGAGCTTTCTAGGATGG-3' [SEQ ID NO: 3]

15 5'-GCAGGGAATTCTGCAGTCAAAGGACTTTATC-3' [SEQ ID NO: 4]

En esta amplificación, se empleó la DNA polimerasa Taq, que tiene la particularidad de añadir un residuo de deoxiadenosina a los extremos 3' del fragmento amplificado (267 pb) generando extremos protuberantes. Como vector de expresión inducible, se utilizó la forma lineal del plásmido pCR2.1-TOPO comercializado por Invitrogen, cuyos extremos 3' protuberantes tienen un residuo de deoxitimidina y están unidos covalentemente a la enzima DNA topoisomerasa I del virus *Vaccinia*. Con este sistema de clonaje no es necesario ni la digestión con enzimas de restricción ni el empleo de la DNA ligasa, ya que la propia DNA topoisomerasa I es la responsable de la reacción de ligación. Posteriormente, se utilizó la mezcla de ligación para transformar la estirpe *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Se seleccionaron transformantes resistentes a kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y se analizó el contenido plasmídico mediante digestión con enzimas de restricción. El plásmido recombinante se denominó pCR2.1-TOPO.p56. Se confirmó la integridad del gen 56 mediante secuenciación.

1.2 Construcción del plásmido pPR53.p56

Se clonó el fragmento *Pst*I de 272 pb del plásmido pCR2.1-TOPO.p56, que lleva el gen 56, en el sitio *Pst*I del vector de expresión pPR53 (Bravo y Salas (1997) J. Mol. Biol. 269: 102-112). Para el clonaje, se utilizó la estirpe *B. subtilis* YB886 (Yasbin y cols. (1980) Gene 12: 155-159). Se seleccionaron transformantes resistentes a fleomicina (0,8 $\mu\text{g/ml}$). El plásmido recombinante se denominó pPR53.p56. La estirpe YB886[pPR53.p56] produce constitutivamente la proteína p56.

1.3 Construcción del plásmido pPR53.p56FLAG

Mediante mutagénesis dirigida, se modificó la secuencia del gen 56 para que codificase una proteína p56 que llevase el péptido DYKDDDDK fusionado al extremo C-terminal (proteína p56FLAG). Se realizó la mutagénesis en dos etapas. Primero, se amplificó el gen 56 mediante PCR utilizando el plásmido pPR53.p56 como molde y los siguientes oligonucleótidos como cebadores:

45 5'-CCTCTAGAGTCGACCTGCAG-3' [SEQ ID NO: 5]

5'-GTCATCGTCATCCTTATAGTCAGGACTTTATCCAACCTTAG-3' [SEQ ID NO: 6]

En la segunda etapa, se utilizó el fragmento amplificado de 298 pb como molde y como cebadores los oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 [5'-CCCTCAGGGCTGCAGTTATTACTTGTGCATCGTCATCCTTATAGTC-3'].
50

Los oligonucleótidos cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 llevan una secuencia de reconocimiento para la enzima *Pst*I. A continuación, se digirió el fragmento amplificado (322 pb) con la enzima *Pst*I, y se clonó el producto de digestión de 293 pb en el sitio *Pst*I del vector de expresión pPR53 (Bravo y Salas (1997) J. Mol. Biol. 269: 102-112). Se utilizó la mezcla de ligación para transformar la estirpe *B. subtilis* YB886 (Yasbin y cols. (1980) Gene 12: 155-159). Se seleccionaron transformantes resistentes a fleomicina (0,8 $\mu\text{g/ml}$). El plásmido recombinante se denominó pPR53.p56FLAG. La estirpe YB886[pPR53.p56FLAG] produce constitutivamente la proteína p56FLAG. Posteriormente, para realizar estudios de interacción proteína-proteína *in vivo*, se introdujo el plásmido pPR53.p56FLAG en la estirpe *B. subtilis* 110NA (Moreno y cols. (1974) Virology 62: 1-16).
60

1.4 Purificación de la proteína p56

Se introdujo el plásmido pCR2.1-TOPO.p56 en la estirpe *E. coli* BL21 (DE3) mediante técnicas de electroporación. Se creció la estirpe BL21(DE3)[pCR2.1-TOPO.p56] en medio LB conteniendo kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) a 34°C. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 560 nm (DO_{560}) de 0,9, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Al cabo de 30 minutos, se añadió rifampicina (120 $\mu\text{g/ml}$) y se continuó la incubación del cultivo durante 75 minutos. Se guardó el pellet de células a -70°C hasta el momento de su utilización. Para la purificación de p56, las células
65

ES 2 304 833 B1

fueron lisadas con alúmina en el tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, β -mercaptoetanol 7 mM, 5% de glicerol) conteniendo NaCl 0,65 M. Después de eliminar la alúmina y los restos celulares mediante centrifugación, se incubó el lisado con polietilenimina (0,3%) durante 20 minutos y, a continuación, se centrifugó a 12.000 r.p.m. en el rotor Sorvall-GSA durante 10 minutos. Se lavó el pellet con tampón A conteniendo 0,7 M de NaCl. Tras la centrifugación (12.000 r.p.m. en el rotor Sorvall-SS34 durante 20 minutos), se realizaron sucesivas etapas de precipitación con sulfato amónico (saturaciones al 65%, 45% y 30%, respectivamente). Se llevó el sobrenadante de la última precipitación a una saturación final del 50%. Después de la centrifugación, se resuspendió el pellet en el tampón A, siendo la concentración de sal de 55 mM (estimada por conductividad). Se cargó la preparación de proteína en una columna Mono Q equilibrada con tampón A conteniendo NaCl 55 mM. La proteína p56 fue eluida de la columna con NaCl 0,3 M. Finalmente, se cargó la preparación de proteína en un gradiente de glicerol (del 15% al 30%) y se centrifugó a 62.000 r.p.m. en un rotor Beckman-SW.65 durante 20 horas. Se juntaron las fracciones que contenían la proteína p56, y se procedió a su precipitación con sulfato amónico al 70%. Se resuspendió la proteína p56 en tampón A conteniendo glicerol al 50% y se almacenó a -70°C.

1.5 Inhibición de la actividad UDG mediada por la proteína p56

Detección de actividad UDG en extractos de B. subtilis

Para la preparación de extractos celulares, se creció la estirpe *B. subtilis* 110NA (Moreno y cols. (1974) Virology 62: 1-16) en medio LB a 30°C hasta una DO_{560} equivalente a 10^8 células viables por ml de cultivo. Entonces, se concentró el cultivo 10 veces en el tampón U (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, β -mercaptoetanol 12 mM, EDTA 1 mM) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas obtenida de Roche Applied Science (una tableta de "Complete, Mini, EDTA-free" para 10 ml). Se lisó el cultivo utilizando la prensa French (20.000 p.s.i.) y, a continuación, se centrifugó el lisado a 7.000 r.p.m. y 4°C en el rotor Sorvall-SS.34 durante 10 minutos. Se guardó el sobrenadante (extracto celular) a 4°C hasta un máximo de dos semanas. Se determinó la concentración total de proteína en el extracto (1,35 μ g/ml) por el método de Lowry.

Las enzimas con actividad UDG que pertenecen a la Familia-1 eliminan los residuos de uracilo tanto de un DNA de cadena sencilla como de un DNA de cadena doble. La eliminación del residuo de uracilo genera un sitio sin base (sitio AP) en el DNA, que en *B. subtilis* es reconocido y procesado por la proteína ExoA. En ausencia de una actividad endonucleasa AP, puede conseguirse el corte de la cadena de DNA en el sitio AP mediante tratamiento con NaOH y calor. Para medir la actividad UDG del extracto celular, se empleó un DNA de cadena sencilla (34 nucleótidos) que llevaba un residuo de uracilo en la posición 16 (sustrato ssDNA-U¹⁶). La secuencia de nucleótidos del polinucleótido ssDNA-U¹⁶ es la siguiente: 5'-CTGCAGGTGATGCGCUGTACCGATCCCCGGGTAG-3' [SEQ ID NO: 8]. Este DNA fue marcado radiactivamente en el extremo 5' utilizando [γ -³²P] ATP (3.000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia). La mezcla de reacción (20 μ l) contenía 0,55 ng del sustrato ssDNA-U¹⁶ y la cantidad indicada del extracto celular (desde 0,05 μ g hasta 3,2 μ g) en el tampón U. La mezcla fue incubada a 37°C durante 10 minutos. A continuación, fue tratada con NaOH (0,2 M) e incubada a 90°C durante 30 minutos. La muestra fue analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida (20%) conteniendo urea (8 M). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1A.

Para analizar si la proteína p56 es un inhibidor de la actividad UDG, se incubó el sustrato ssDNA-U¹⁶ (0,55 μ g) con 1,6 μ g del extracto celular (cantidad suficiente para obtener el corte total del sustrato) y con cantidades diferentes de la proteína p56 (entre 0,5 ng y 16 ng). Como se ha descrito anteriormente, las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 10 minutos, se trataron con NaOH (0,2 M) e incubaron a 90°C durante 30 minutos.

1.6 Interacción de la proteína p56 con la enzima UDG

Para analizar si la enzima UDG es una diana celular de la proteína p56, se realizaron ensayos de cromatografía de afinidad. Brevemente, se creció la estirpe *B. subtilis* 110NA[pPR53.p56FLAG] en medio LB con fleomicina (0,8 μ g/ml) a 30°C hasta una DO_{560} equivalente a 10^8 células viables por ml. Se concentró el cultivo 10 veces en el tampón TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) y se lisó utilizando la prensa French (20.000 p.s.i.). Se centrifugó el lisado a 7.000 r.p.m. y 4°C en el rotor Sorvall-SS.34 durante 10 minutos. Se cargó el sobrenadante en una columna anti-FLAG M2 (Sigma). Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con el tampón TBS conteniendo el péptido FLAG (500 μ g/ml) (Sigma). Las proteínas eluidas fueron precipitadas con acetona, resuspendidas en el tampón de carga (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, SDS al 2%, 5% de β -mercaptoetanol, 30% de glicerol) y separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida/Tricina/SDS (Schagger y von Jagow (1987) Anal. Biochem. 166: 368-379). El gel fue teñido con SyproRuby (Molecular Probes). Como control negativo, se utilizó extracto de la estirpe 110NA[pPR53]. En un segundo experimento, la proteína p56 (2 μ g) fue incubada con la enzima UDG de *E. coli* (0,2 μ g, New England Biolabs). Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción fue analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida (16%) nativos. El gel fue teñido con SyproRuby.

II. Resultados

2.1 La proteína p56 interacciona con la enzima UDG

La incubación del sustrato (ssDNA-U¹⁶) con 0,2 μ g del extracto celular de *B. subtilis* generó un producto de corte. Además, los resultados muestran (Figura 1A) que dicho sustrato fue totalmente cortado al utilizar 1,6 μ g del extracto celular. El mismo producto de corte fue detectado al incubar el sustrato con la enzima UDG de *E. coli* (New England

Biolabs). Por lo tanto, los resultados demuestran que el extracto de *B. subtilis* era capaz de eliminar el residuo uracilo del sustrato generando un sitio AP, es decir, dicho extracto tiene actividad UDG. Sin embargo, en las condiciones ensayadas (ausencia de Mg^{2+}), el extracto de *B. subtilis* carecía de actividad endonucleasa AP, ya que no se detectó corte del sustrato cuando las mezclas de reacción no fueron tratadas con NaOH (Fig. 1A).

5

2.2 La proteína p56 inhibe la actividad UDG

Para demostrar que la proteína p56 es un inhibidor de la actividad UDG, se incubó el sustrato ssDNA-U¹⁶ (0,55 ng) con 1,6 μ g del extracto celular (cantidad suficiente para obtener el corte total del sustrato) y con cantidades diferentes de la proteína p56 (entre 0,5 ng y 16 ng). Como se ha descrito en el apartado 1.5 de Materiales y Métodos, las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 10 minutos, se trataron con NaOH (0,2 M) e incubaron a 90°C durante 30 minutos. La Figura 1B muestra los resultados obtenidos. En presencia de 2 ng de la proteína p56, se detectó una disminución en la cantidad del producto de corte. Además, el sustrato permaneció intacto al añadir 8 ng de la proteína p56. Es decir, los resultados muestran que la proteína p56 inhibe la actividad UDG.

15

Como se muestra en la Figura 2A, cinco proteínas (A-E) co-eluyeron con p56FLAG. Mediante “peptide mass fingerprinting” y utilizando el programa MASCOT (Perkins y cols. (1999) *Electrophoresis* 20: 3551-3567), la proteína D fue identificada como la enzima UDG (26 kDa). Se detectó una banda que movía más rápida que UDG libre (Figura 2B). Mediante “Western-blot” y “peptide mass fingerprinting”, se confirmó que dicha banda contenía p56 y UDG.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 304 833 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma con capacidad inhibidora de la enzima uracil DNA glicosilasa (UDG).
2. Un polinucleótido aislado que codifica para una proteína según la reivindicación 1.
3. Polinucleótido según la reivindicación 2, que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2.
- 10 4. Una construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 2 ó 3.
5. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 2 o una construcción génica según la reivindicación 3.
- 15 6. Una célula que comprende un polinucleótido según la reivindicación 2 ó 3, una construcción génica según la reivindicación 4, o un vector según la reivindicación 5.
- 20 7. Un procedimiento para la obtención de una proteína según la reivindicación 1, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 6, bajo condiciones que permiten la producción de dicha proteína y, si se desea, recuperar dicha proteína del medio de cultivo.
8. Una composición que comprende una proteína según la reivindicación 1 y un vehículo inerte.
- 25 9. Una composición farmacéutica que comprende una proteína según la reivindicación 1 junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
10. Empleo de una proteína según la reivindicación 1 en la elaboración de una composición farmacéutica antiviral.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

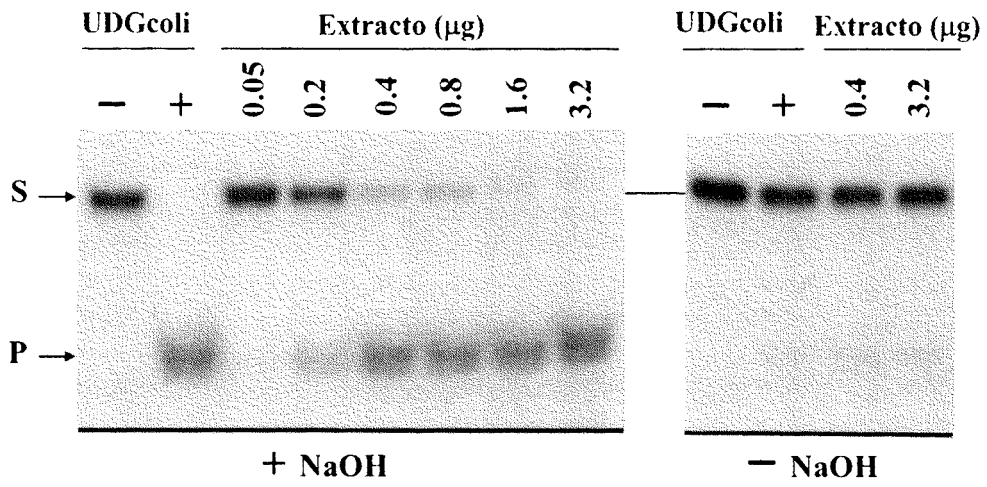
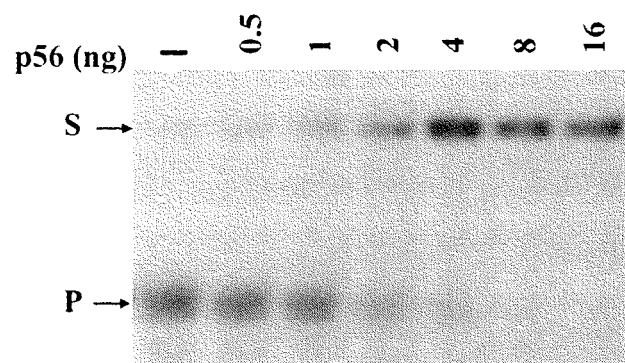


FIGURA 2



ES 2 304 833 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> INHIBIDOR DE LA ENZIMA URACIL DNA GLICOSILASA Y APLICACIONES

<160> 9

10 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 56

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 1

20 Met Val Gln Asn Asp Phe Val Asp Ser Tyr Asp Val Thr Met Leu Leu
5 10 15
25 Gln Asp Asp Asp Gly Lys Gln Tyr Tyr Glu Tyr His Lys Gly Leu Ser
20 25 30
30 Leu Ser Asp Phe Glu Val Leu Tyr Gly Asn Thr Ala Asp Glu Ile Ile
35 40 45
Lys Leu Arg Leu Asp Lys Val Leu
50 55

35 <210> 2

<211> 171

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<400> 2

45 atggtgcaaa atgattttgt tgactcatac gatgtgacaa tgttgcttca agatgatgac 60
ggtaaacagt attatgagta ccacaagggg ctgagtttgt cagactttga ggttctatac 120
50 ggtaacactg ctgatgaaat tataaaacta aggttggata aagtactatg a 171

<210> 3

55 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Oligonucleótido cebador empleado para amplificar el gen p56 del bacteriófago ϕ 29

<400> 3

65 cgcattgat gagcttcta ggatgg

ES 2 304 833 B1

<210> 4
<211> 31
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido empleado para amplificar el gen p56 del bacteriófago ϕ 29
10
<400> 4
gcaggaatt ctgcagctcaa aggactttat c 31

15 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido empleado para amplificar el gen 56 mediante PCR utilizando el plásmido pPR53.p56 como
25 molde
<400> 5
30 cctctagagt cgacctgcag 20

<210> 6
<211> 41
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Oligonucleótido empleado para amplificar el gen 56 mediante PCR utilizando el plásmido pPR53.p56 como
molde
<400> 6
45 gtcacgtgca tccttatagt caggacttta tccaacctta g 41

<210> 7
50 <211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido empleado para amplificar el gen 56 mediante PCR utilizando el fragmento de 298 pb del
plásmido pPR53.p56 como molde
60 <400> 7
ccctcagggc tgcagttatt acttgtcatc gtcacacctta tagtc 45

65 <210> 8
<211> 34
<212> ADN

ES 2 304 833 B1

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> sustrato ssDNA-U¹⁶

<400> 8

10 ctgcaggtga tgcgcugtac cgateccccgg gtag

34

<210> 9

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptido FLAG

<400> 9

25 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 304 833

② N° de solicitud: 200503240

③ Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	YOSHIKAWA, H. et al. "Nucleotide sequence of the major early region of bacteriophage ϕ 29". GENE. 1982, Vol. 17, páginas 323-335; todo el documento, especialmente figura 3, ORF 5. & BASE DE DATOS EMBL [En línea], 01.11.1996, "Left end of bacteriophage ϕ 29 coding for 15 potential proteins". N° de acceso: Q38503.	1-9
Y		10
Y	STUDEBAKER, A.W. et al. "Depletion of uracil-DNA glycosylase activity is associated with decreased cell proliferation". BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. 26.08.2005. Vol. 334, N° 2, páginas 509-515; todo el documento.	10
A	WANG, Z. et al. "Uracil-DNA glycosylase inhibitor gene of bacteriophage PBS2 encodes a binding protein for uracil-DNA glycosylase". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 15.01.1989. Vol. 264, N° 2, páginas 1163-1171; todo el documento.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.03.2007

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/01 (2006.01)

C12N 15/34 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)