



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 523**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03730996 .0**

86 Fecha de presentación : **08.01.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1478770**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Procedimiento de cribado para antivirales contra ortopoxvirus.**

30 Prioridad: **08.01.2002 US 345646 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **Siga Technologies, Inc.**
420 Lexington Avenue, Suite 620
New York, New York 10170, US
STATE OF OREGON, Acting By And Through The
State Board Of Higher Education On Behalf Of
Oregon State University

72 Inventor/es: **Hruby, Dennis, E.;**
Bolken, Tove y
Byrd, Chelsea

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de cribado para antivirales contra ortopoxvirus.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un fármaco anti-poxvirus eficaz para su utilización en el tratamiento o prevención de la enfermedad humana causada por los poxvirus patógenos. Más particularmente, la presente invención se refiere a los fármacos antivirales dirigidos contra la proteinasa de poxvirus responsable de la maduración de la proteína del núcleo, una etapa que es absolutamente esencial para la producción y propagación de los viriones infecciosos.

Antecedentes de la invención**Descripción de la técnica relacionada**

El espectro del bioterrorismo se cierne sobre la sociedad moderna. La capacidad para hacer crecer y manipular microorganismos ha proporcionado a los científicos biomédicos unas herramientas maravillosas para desarrollar terapias y fármacos para combatir tanto las enfermedades infecciosas como las genéticas. Desafortunadamente, estas mismas tecnologías presentan un lado oscuro. Con un equipo mínimo no demasiado sofisticado, las herramientas microbiológicas y de ingeniería genética permiten a personas u organizaciones preparar fácilmente grandes cantidades de microorganismos patógenos para una dispersión deliberada en el medio ambiente. De forma diferente a las armas convencionales, los microorganismos patógenos presentan la capacidad de replicarse y diseminarse, no distinguen entre el soldado y el ciudadano de a pie, y una vez se han liberado, no se pueden recuperar o controlar.

Mientras que la preocupación por la guerra biológica se limitaba originariamente a su despliegue potencial durante los conflictos entre las fuerzas armadas de las naciones industrializadas, la amenaza creciente de terrorismo y violencia doméstica han hecho surgir en la actualidad la posibilidad de que dichos agentes se puedan utilizar también para estos fines. En este aspecto, de entre los agentes biológicos que se cree pueden causar una amenaza mayor se encuentran *Bacillus anthracis* (ántrax), *Yersinia pestis* (peste bubónica), *Francisella tularensis* (tularemia), *Cocciella burnetti* (fiebre Q), virus ARN hemorrágicos (por ejemplo, Dengue, Marburg, Ebola y encefalitis equina venezolana) y la viruela. Aunque la introducción deliberada de uno de dichos agentes puede resultar devastadora, el que presenta el potencial mayor de causar daño a la población general es la viruela o unos ortopoxvirus modificados genéticamente relacionados.

La viruela es la enfermedad más destructiva de la historia. Se estima que ha matado, mutilado o desfigurado a aproximadamente 1/10 de toda la humanidad, sólo en el siglo 20, más de 300 millones de personas sucumbieron a esta enfermedad. El virus de la viruela, agente causal de la viruela, es altamente infeccioso, que causa una enfermedad evidente en las personas más susceptibles que entran en contacto con él.

La viruela se contrae generalmente por inhalación de la diseminación de las gotitas de aerosol por parte de las personas infectadas. Tras un periodo de incubación de 10 a 14 días, se manifiesta la verdadera enfermedad que se caracteriza por fiebre alta y malestar. De dos a tres días después desciende la temperatura del paciente y aparece la erupción sistémica, que caracteriza por unas lesiones pustulares prototípicas que pueden durar de 2 a 3 semanas. En las formas más virulentas de viruela, como la causada por la Viruela mayor, hasta el 30% de las personas infectadas mueren. Los enfermos que se recuperan presentan cicatrices para toda la vida.

La enfermedad presenta una serie de características que la convierten en un agente de bioterrorismo "ideal": 1) el virus crece fácilmente, se puede liofilizar y no necesita una cadena de frío para mantener su viabilidad; 2) la infección se propaga por vía respiratoria; 3) el periodo de presencia del virus prolongado, combinado con la facilidad para viajar, permiten que la persona infectada pueda propagar la enfermedad ampliamente; 4) las cicatrices resultante dejan secuelas psicológicas; y 5) el virus es muy estable en el medio ambiente una vez ha aparecido, haciendo difícil la descontaminación.

Aunque la viruela reviste una preocupación importante, no deben olvidarse otros patógenos potenciales de ortopoxvirus. Por ejemplo, se han dado recientemente varias incidencias del virus de la viruela del mono en humanos, a pesar de que la propagación humano-humano parece estar limitada. Otro escenario más escalofriante es la posibilidad de que una cepa de laboratorio del virus *Vaccinia* o del virus de la viruela aviar se pueda modificar por ingeniería genética para producir una toxina con el fin de convertirla en un patógeno potente. Afortunadamente, los ortopoxvirus están altamente relacionados a nivel del ADN (por ejemplo 90% entre la viruela y *Vaccinia*) lo que hace probable que cualquier agente antiviral desarrollado pueda inhibir la replicación de todo el grupo de virus.

La viruela ya no está presente en el entorno natural, existen algunos remanentes de estos de laboratorio conocidos del virus de la viruela y se espera que serán destruidos en un futuro próximo. La erradicación de la viruela fue posible porque es una enfermedad humana específica sin reservorios animales, existía un serotipo único y la vacuna atenuada desarrollada por Jenner estimuló efectivamente tanto las partes celular como humoral del sistema inmunitario, que proporciona una inmunidad duradera. La viruela fue eliminada de los EEUU en los años 1960 y se interrumpió la inmunización profiláctica de rutina en el año 1973.

Los siguientes 30 años se produjo una población que era inmunológicamente naïf y altamente susceptible a la infección por poxvirus. Debido al pequeño pero significativo riesgo de las complicaciones serias por la vacunación, especialmente en personas inmunocomprometidas debido a la infección por VIH u otros agentes, no se aconseja la vacunación masiva de la población. Sin embargo, en caso de que se introdujera en la población una infección por ortopoxvirus, la vacuna viva sería un arma eficaz para limitar la propagación de la enfermedad una vez se haya diagnosticado.

La vacunación antes de la exposición, o en el periodo de 2 a 3 días después de la exposición, permite una protección casi completa. La vacunación tardía a los 4-5 días post-exposición puede proteger de la muerte. Desafortunadamente, en el caso de una introducción deliberada del agente infeccioso en una zona altamente poblada, podría existir un gran reservorio de personas infectadas hasta que se lleguen a diagnosticar los casos centinela. Además, están disponibles unos depósitos relativamente limitados de vacuna. Por estas razones, como medida protectora, es imperativo que esté disponible un fármaco anti-ortopoxvirus eficaz para tratar aquellos individuos expuestos al virus que disponen de un tiempo suficiente para producir una inmunidad protectora y ayudarles a detener una epidemia.

El único fármaco bien conocido que es eficaz en la inhibición de la infección por ortopoxvirus en células en cultivo es la metisazona o IBT (N-metilisatin β -tiosemicarbazona). Sin embargo, este fármaco tiene un valor limitado para el tratamiento de las personas infectadas. Se ha demostrado que el cidofovir es un inhibidor anti-ortopoxvirus potente, pero presenta muchos efectos adversos y debe administrarse por inyección. Por ello, actualmente no está disponible ningún fármaco anti-ortopoxvirus seguro, eficaz, administrable por vía oral.

Visión general de la proteólisis vírica

La expresión “proteólisis vírica” fue introducido por primera vez por Linderstrom-Lang y Oteasen para describir las reacciones en las que los enlaces peptídicos en los polipéptidos se hidrolizan selectivamente, al contrario de la degradación de la proteína que implica una segmentación extensa de los enlaces peptídicos en el sustrato. Los enzimas requeridos para la segmentación de los enlaces peptídicos se denominan proteasas que se dividen en peptidasas y proteinasas. Las peptidasas son exopeptidasas que hidrolizan los aminonúcleos solos del extremo amino-terminal o el carboxi-terminal de una cadena de péptidos. Por el contrario, las proteinasas (también denominadas enzimas proteolíticas o endopeptidasas) son capaces de reconocer selectivamente y fraccionar enlaces peptídicos específicos en los sustratos.

Las proteinasas están además subdivididas en cuatro clases basadas en la identidad de sus residuos aminoácidos catalíticos, cuyas posiciones tridimensionales relativas están conservadas en un grupo y en el mecanismo de catálisis. Los cuatro tipos de proteinasas son: serina, cisteína (tiol), aspártico (ácido) y metalo-. Las proteinasas serina presentan una triada catalítica de residuos de ácido aspártico, histidina y serina y parece ser el tipo más común y más extenso de proteinasa. Las proteinasas cisteína mantienen una díada catalítica compuesta de residuos cisteína e histidina muy próximos mientras que la díada catalítica de las proteinasas del ácido aspártico requiere dos residuos de ácido aspártico. Para las metaloproteinases, se requiere un catión divalente (normalmente Zn^{+2}) junto con los residuos esenciales de histidina y ácido glutámico para la catálisis.

Las proteinasas se pueden presentar en su forma más básica al tener un sitio catalítico, como se ha descrito anteriormente, y una bolsa de unión a sustrato. Los dos sitios se encuentran normalmente muy próximos. Generalmente, las proteinasas están compuestas por dos dominios globulares, los aminoácidos implicados en la catálisis son aportados por cada mitad de la hendidura de unión a sustrato. Para la mayoría de proteinasas serina, cisteína y aspártico, los dos dominios globulares se encuentran dentro del mismo polipéptido. Sin embargo, en el caso de las proteinasas víricas, se emplea un complejo dímero para juntar los dos centros catalíticos individuales para formar la hendidura. A pesar de que casi todas las hendiduras de unión a sustrato consiguen una estructura tridimensional parecida con respecto a los aminoácidos catalíticos para cada clase de proteinasa, la conservación estructural no se extiende a la bolsa de unión a sustrato, que distingue una proteinasa determinada de todas las otras. Es esta región de unión a sustrato la que confiere especificidad a la proteinasa.

Generalmente, se espera que para que se de la hidrólisis de un enlace peptídico específico, deben cumplirse dos requerimientos. Primero, los enlaces peptídicos susceptibles deben estar definidos por los residuos aminoácidos circundantes con unas cadenas laterales específicas que son necesarias para la especificidad primaria y secundaria. La especificidad primaria presenta una característica cualitativa que se dirige a la selección del enlace a romper y la especificidad secundaria transmite una característica secundaria mediante la facilitación de la segmentación del enlace seleccionado. Segundo, el enlace susceptible se presenta normalmente adyacente a la superficie del sustrato en una región flexible accesible a las proteinasas y el péptido susceptible debe presentarse en una conformación tridimensional que encaja con la bolsa del sitio activo de la proteinasa. Está se refiere como “especificidad conformacional”.

Muchos tipos de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, la glicosilación y la acilación son necesarios para la adquisición y la regulación de las propiedades de la proteína como la actividad enzimática, las interacciones proteína-proteína y la localización intracelular. Asimismo, la proteólisis limitada se utiliza a menudo para regular la activación o el ensamblaje de la proteína causando unos cambios en la estructura terciaria que juntan los residuos aminoácidos funcionales distantes. De modo interesante, la energía libre necesaria para la reconstrucción de enlaces peptídicos hidrolizados es elevada y no se han identificado todavía mecanismos biológicos para la reparación de enlaces peptídicos rotos. De este modo los cambios introducidos en estos sustratos mediante fragmentación peptídica son

esencialmente irreversibles. Esta combinación de especificidad de fragmentación e irreversibilidad de la reacción han dado como resultado la utilización común de la reacción de procesamiento proteolítico como un mecanismo unidireccional para una gran variedad de procesos biológicos que incluyen la digestión de alimentos, la fragmentación de un péptido señal, transducción de señales, producción de factor péptido/hormona de crecimiento, coagulación de la sangre, cascada de sistema complemento, eliminación de patógeno, migración y reproducción celular.

Para muchos virus vegetales y animales, una infección exitosa depende del procesamiento proteolítico en una o más etapas. De hecho, es excepcional el virus que no necesita un procesamiento proteolítico durante su ciclo de replicación. Los enzimas proteolíticos necesarios se pueden proporcionar o bien por la célula huésped, el virus infeccioso o por ambos. Las proteinasas proporcionadas por la célula huésped generalmente contribuyen al procesamiento de las proteínas de la membrana o de la envuelta que circulan a través del compartimento secretor de la célula. Dentro de estos compartimentos secretores es donde las proteínas de la envuelta vírica experimentan la maduración mediante la fragmentación de los péptidos señal (además de la acilación y glicosilación), tales como las glicoproteínas E1 y E2 del virus Sindbis. Por otra parte, las proteinasas responsables del procesamiento proteolítico de las proteínas víricas normalmente son codificados por los virus mismos.

La fragmentación proteolítica de los polipéptidos virales se ha clasificado como proteólisis “formativa” o “morfogénica”, dependiendo de la función de la reacción durante el ciclo replicativo. La proteólisis replicativa se refiere al procesamiento de las poliproteínas víricas en productos de proteínas estructurales o no estructurales. Se han identificado gran número de proteinasas de fragmentación formativa virales y son codificadas por virus animales como piconavirus, flavivirus, alfavirus, retrovirus y coronavirus. La proteólisis formativa proporciona a los virus un mecanismo, como a los retrovirus y los virus ARN de hebra positiva, para utilizar un único molde de ARN para la expresión de varias proteínas víricas a partir de un precursor proteínico amplio. La proteólisis morfogénica se refiere a la fragmentación de proteínas virales estructurales reunidas en los previriones durante la maduración del virión. La proteólisis morfogénica se da junto con el ensamblaje del virión y a menudo es necesaria para la adquisición de infectividad tanto de los virus ADN como los ARN tales como piconavirus, alfavirus, retrovirus, adenovirus y bacteriófago T4. A pesar de que se sabe poco acerca de la proteólisis morfogénica, se han propuesto varias funciones diferentes para dicho procedimientos, incluyendo: la facilitación de la dimerización ARN genómica correcta en el ensamblaje de las partículas retrovirales; empaquetamiento unidireccional del bacteriófago ADN T4; finalización del virión poliovirus infeccioso en una configuración flexible y la promoción del desensamblaje de las partículas de adenovirus durante la iniciación de la infección.

Independientemente del tipo de reacción de maduración proteolítica empleada, resulta esencial que la actividad de las proteinasas virales sea regulada adecuadamente para asegurar la producción eficiente de la progenie de viriones infecciosos. En general, en los sistemas biológicos, la regulación de las proteinasas se alcanza de diferentes modos, que incluyen la compartimentalización de los enzimas y el sustrato, la presencia de unos inhibidores específicos y/o activadores y la activación proteolítica de los zimógenos. Los virus han adoptado unas estrategias similares. Por ejemplo, en los retrovirus se ha propuesto el entorno extracelular ácido para desencadenar la fragmentación morfogénica de las proteínas estructurales mediante el desplazamiento de una porción de la poliproteína *gap-pol* que evita que el sitio activo de la proteinasa interaccione con su sustrato mientras están dentro de la célula. En el caso de los adenovirus, parece que el ADN y el péptido unido a disulfuro producidos a partir de una proteína estructural pVI durante las etapas tardías de la replicación son necesarios para la activación de la proteinasa viral y la consiguiente maduración del virus. Finalmente, quizás el ejemplo más elegante de regulación de la actividad de la proteinasa viral sea el dado por la proteína del núcleo del virus Sindbis que sufre autoproteólisis para volverse inactiva tras el ensamblaje de la nucleocápsida. La inactivación de la actividad de la proteinasa se consigue mediante la localización de la región carboxi-terminal de la proteína en la bolsa catalítica en concierto con el evento de fragmentación proteolítica.

Ciclo de replicación VV y modificación postraducional de los productos de genes virales

Dada la importancia de la proteólisis limitada como medio para regular la expresión del gen en los sistemas biológicos, y la extensión y diversidad de modos que incluso los sistemas virales más simples utilizan aparentemente dicho mecanismo regulador, resulta interesante considerar si y cómo un virus complejo como el virus *Vaccinia* puede incorporar dicho procedimiento en su ciclo replicativo. El virus *Vaccinia* (VV) es el prototipo de *Poxviridae*, una familia de virus ADN que se distinguen por su morfología única y el sitio citoplasmático de replicación.

El genoma VV ADN de 191 kpb codifica por lo menos 263 productos de genes cuya expresión se regula de un modo temporal durante el ciclo replicativo que empieza con la entrada del virus en la célula huésped y acaba con el ensamblaje de las estructuras macromoleculares complejas para formar una partícula infecciosa. De forma diferente a muchos virus, VV produce una multiplicidad de formas de viriones, todos parecen ser infecciosos. A pesar de que los detalles moleculares del ensamblaje de poxvirus y la diferenciación permanecen poco precisos y controvertidos, la perspectiva más ampliamente aceptada de los eventos que resultan es la siguiente. Tras (o junto a) la replicación del ADN vírico, los ensamblajes de las moléculas de progenie de ADN, los enzimas de virión y las proteínas estructurales se fusionan para formar partículas de pre-virión. Dichas partículas adquieren dos membranas echando brotes a través del compartimento intermedio (entre el retículo endoplasmático y el Golgi) para convertirse en un virus intracelular maduro infeccioso (IMV). Una porción de los IMV se envuelve entonces mediante dos membranas adicionales derivadas de la red trans-Golgi para formar un virus intracelular envuelto (IEV). Tras la migración a la superficie celular la membrana más externa IEV se fusiona con la membrana del plasma para dar lugar al virus envuelto extracelular (EV). El EV puede o bien permanecer asociado a la célula (virus con envuelta asociado a la

célula, CEV) o bien liberarse al medio exterior como virus envuelto extracelular (EEV). Algunos poxvirus, tales como los cowpoxvirus (CPV), todavía producen otra forma de virión. En las células infectadas por CPV, se producen una gran cantidad de cuerpos de inclusión que están compuestos principalmente de una única proteína viral de 160 kDa. Dentro este tipo de inclusiones de tipo-A están ocultos unos viriones (e infecciosos).

5 Teniendo en cuenta el gran número de proteínas virales codificadas, la multiplicidad de viriones VV y el número de sitios intracelulares diferentes utilizados durante el ensamblaje vírico y el procedimiento de morfogénesis, uno puede prever que VV puede utilizar numerosos patrones de modificación de la proteína celular y de marcaje para regular dichos procedimientos complejos. Efectivamente, se ha demostrado que durante el transcurso de la replicación vírica, las proteínas VV maduran mediante numerosas modificaciones post-traduccionales que incluyen la acilación, la fosforilación, la glicosilación, la ADP-ribosilación y el procesamiento proteolítico. A pesar de que los detalles a cerca del papel tan limitado que las reacciones proteolíticas pueden desempeñar durante la replicación VV no estaban disponibles cuando se iniciaron estudios en el año 1990, la información que está disponible ahora en la bibliografía sugiere que se pueden emplear tanto las vías de fragmentación formativa como morfogénica. Por ejemplo, tanto las proteínas del factor de crecimiento VV (VGF) como la hemaglutinina (HA) parecen presentar unos péptidos señal que son eliminados mediante una proteólisis formativa durante su tránsito a través del retículo endoplasmático y transporte hasta la membrana plasmática. De forma similar, se sabe que tres de las principales proteínas estructurales encontradas en el núcleo del virión VV maduro, 4a, 4b y 25K, se han producido a partir de unos precursores de peso molecular superior en las últimas etapas durante la infección, convirtiéndolos en unos candidatos a la fragmentación morfogénica. Era esta última cuestión, es decir la naturaleza de la reacción de procesamiento por la que las proteínas del núcleo VV mayor maduran, a la que se han dirigido los experimentos realizados en laboratorio durante la última década.

Proteólisis de VV- que se sabía con anterioridad al año 1990

25 Los genes que se expresan en la etapa tardía durante una infección de VV (es decir, aquéllos que se expresan tras la iniciación de la síntesis de ADN vírico) incluyen la mayoría de las proteínas estructurales necesarias para el ensamblaje de la progenie del virión. La primera indicación de que algunas de las proteínas estructurales VV se pueden someter a un procesamiento proteolítico se produjo cuando Holowczak y Joklik observaron diferencias en los pesos moleculares aparentes de las proteínas marcadas radiactivamente presentes en las células infectadas por VV al compararlas con las encontradas en los viriones purificados. Por consiguiente, se utilizó radiomarcado de las células infectadas por VV para demostrar que la proteína precursora de gran tamaño se puede seguir en un polipéptido más pequeño, con una desaparición concomitante de una proteína de un tamaño mayor. Esta conversión se puede inhibir específicamente por la rifampicina sin ningún efecto aparente sobre la síntesis del precursor. La proteína precursora se puede designar como P4a y el producto procesado proteolíticamente se denomina 4a.

35 Los experimentos de seguimiento por radiomarcado adicionales revelaron que muchos otros polipéptidos estructurales VV, además de P4a, se fragmentaron aparentemente durante las fases tardías del ciclo de replicación de VV. Dichas proteínas procesadas proteolíticamente, referidas utilizando la designación de Sarov y Joklik de las proteínas del virión, incluido 4a, 4b, VP8 (referida como 25 K en esta investigación), 9 y 10. De hecho ésta puede representar una infravaloración del número de proteínas tardías VV que están sometidas a proteólisis. Las proteínas del núcleo VV 4a, 4b y VP8 (25 K) son las proteínas más abundantes en la partícula VV, que conjuntamente constituyen aproximadamente el 33% de la masa del virión.

45 Se han utilizado el mapeado del péptido tríptico y los reactivos inmunológicos para establecer las relaciones entre los precursores de P4a, P4b y P25K y sus productos procesados 4a, 4b y 25 K. Se mapeó la localización de los tres locus que codifican para dichos genes y se determinó la secuencia de nucleótidos de sus marcos de lectura abiertos. Al finalizar la secuenciación del genoma entero de la cepa Copenhagen de VV, los genes que codifican para los precursores P4a, P4b y P25K recibieron las denominaciones de A1OL, A3L y L4R, respectivamente. El procesamiento proteolítico de las proteínas estructurales parece ser esencial para la formación de la progenie de viriones infecciosos. Esta conclusión surge de la observación de que existen varios tratamientos con fármacos diferentes (por ejemplo, rifampicina y α -amantina) o mutaciones letales condicionales en el genoma, que afectan aparentemente a la proteólisis (y maduración de partículas) sin afectar toda la síntesis de proteína.

55 Whitehead *et al.*, J. of Virology, 1994, vol. 68, nº 11, páginas 7603-7608 da a conocer un ensayo de fragmentación basado en la célula para G1L, una proteinasa de proteína del núcleo de ortopoxvirus (vCPP) que comprende: la transfección de las células con el gen G1L y ORF L4R que codifica para el polipéptido P25K, un sustrato de G1L que contiene un grupo AGX; el tratamiento de las células con [³⁵S]-metionina-cisteína; el lisado de las células y la detección de P25K fragmentado en los lisados de las células.

60 Sumario de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un fármaco anti-poxvirus eficaz para su utilización en el tratamiento o prevención de la enfermedad humana causada por un poxvirus patógeno. La diana de los esfuerzos para el desarrollo de un fármaco antiviral es la proteinasa responsable de la maduración de proteína del núcleo, una etapa que es absolutamente esencial para la producción y diseminación de los viriones infecciosos.

Se ha identificado el producto del gen vírico responsable de la catálisis de la maduración de la proteína del núcleo y han utilizado unos enfoques genéticos para validarlo como una diana antiviral. La tecnología de expresión del vector

se utiliza para expresar y purificar las grandes cantidades de proteínasa de la proteína del núcleo. La proteínasa purificada puede servir como material de partida para dos enfoques para la identificación de los inhibidores potenciales: 1) análisis estructura-función acoplado al diseño de fármacos racional; y 2) desarrollo de un ensayo de fragmentación *in vitro* adecuado para el uso en un cribado de alto rendimiento frente a unas librerías limitadas de los inhibidores de proteínasa potenciales. Los compuestos líder identificados por cualquier enfoque inhibirán la inhibición de la replicación de varios ortopoxvirus en células de cultivo tisular. Dichos compuestos serán unos fármacos antivirales útiles para proporcionar una defensa de respuesta rápida frente a la introducción deliberada de un poxvirus patógeno en el entorno.

En particular, el objetivo de la presente invención es desarrollar un fármaco anti-poxvirus que es potente, específico, que se puede producir o sintetizar de un modo poco costoso, que se puede administrar oralmente, y cuyos modos de acción son comprensibles. Por esta razón, se ha seleccionado la proteínasa de proteína del núcleo de ortopoxvirus (vCPP) como diana para el desarrollo del fármaco. Los presentes inventores han identificado las proteinasas cisteína codificados por los genes I7L y G1L como vCPP. El papel de dichas enzimas en el ciclo replicativo de ortopoxvirus se entiende relativamente bien; parecen presentar unos sitios de reconocimiento únicos del sustrato y el requerimiento para dichas enzimas se conserva entre todos los ortopoxvirus.

Breve descripción de las figuras adjuntas

Figura 1. Expresión transitoria del enzima I7L con el sustrato P25K:FLAG en células BSC₄₀. Las células se infectaron con virus *Vaccinia* salvaje y se transfectaron o bien con pRB21:17L, P25K:FLAG o su combinación y se determinó la fragmentación del sustrato de P25K:FLAG por VWestern Blot utilizando un mAc anti-flag. El sustrato P25K:FLAG se muestra sólo en el carril 4 y probablemente se fragmenta ligeramente por la proteínasa I7L producida viralmente. I7L demuestra que fragmenta el sustrato de 28 kDa en un producto de 25 kDa (carril 5).

Figura 2. Expresión transitoria del enzima I7L con el sustrato P25K:FLAG en células BSC₄₀. Las células se infectaron con el virus ts 16 y se transfectaron o bien como pRB21:17L, P25K:FLAG, P25K:FLAG:IDI; P25K:FLAG:RPD, pRB21:17L:mut o su combinación y se determinó la fragmentación del sustrato de P25K:FLAG por VWestern Blot utilizando un mAc anti-flag. El sustrato P25K:FLAG se muestra sólo en el carril 4. I7L demuestra que fragmenta el sustrato de 28 kDa en un producto de 25 kDa (carril 5). El mutante P25K IDI (mutado en el sitio AGS) es fragmentado por I7L (carril 6) y el mutante RPD (mutado en el sitio AGA) muestra fragmentación en otros sitios (AGS) (carril 7). El mutante I7L ha perdido su capacidad de fragmentar el sustrato (carril 8).

Figura 3. Marcaje de seguimiento por radiomarcado e inmunoprecipitación de las proteínas del núcleo VV.

Figura 4. Alineamiento de una secuencia AA determinada de las proteínas VV 4b y 25 K frente a sus precursores.

Figura 5. Alineamiento de una secuencia AA predeterminada que rodea los sitios de fragmentación de las proteínas VV y FPV.

Figura 6. Vía de procesamiento proteolítico de un precursor de proteína del núcleo VV 4a.

Figura 7. Sumario de la fragmentación proteolítica en unos sustratos que contienen VV AG*A.

Figura 8. Interconversión de los precursores VV. Las células infectadas por VV se marcaron con ³H-timidina hasta 7 horas post-infección cuando se persigue para 0(A), 5(B), 11(C) ó 17(V) horas antes de la extracción. Los extractos se sometieron a un fraccionamiento por gradiente de sacarosa y se ensayaron las fracciones para la radioactividad con ácido frío precipitable.

Figura 9. Estructura y sitios de fragmentación del gen trazador P25K:FLAG. Se destacan tanto los sitios de fragmentación primario AGA (II) y el secundario AGS (I).

Figura 10. Mapeado de ORF G1L como complementación de la proteínasa mediante expresión transitoria.

Figura 11. Alineamiento de los residuos de sitio activo propuestos de la proteínasa G1L y varios enzimas que degradan insulina y otras metaloproteinasas zinc.

Figura 12. Inhibición de la replicación de VV por 1,10 fenantrolina 1 μ M (A) e iodoacetamida 10 μ M (B). Los cuadrados indican la presencia de fármaco, los diamantes las infecciones control.

Figura 13. El micrografo de electrones de VV a las 8 horas post-infección. El panel de la derecha son los viriones infecciosos maduros de la infección control. El panel de la izquierda contiene las partículas inmaduras no infecciosas que se acumulan en presencia de α -amantina.

Figura 14. Ensayo FPA. Se sintetizará un péptido con un grupo de fluorescencia en el amino terminal y un grupo de apagado (quench). en el carboxilo terminal. Tras la fragmentación, la emisión de fluorescencia aumentará debido a la falta de proximidad entre el fluoróforo y el apagado.

Figura 15. Ensayo HTRF. Péptido de sitio de fragmentación contendrá un grupo de biotina en N-terminal que se conjugará con XL665 estreptavidina. El C-terminal presentará una oligo-histidina. Adición del conjugado α -his al criptato de europio enjaulado permitirá la transferencia de resonancia de energía fluorescente (FRET) entre el criptato-Eu y XL665. La fragmentación inhibirá FRET.

Figura 16. Los sitios de fragmentación de la proteína del núcleo VV. Representación esquemática de los tres principales precursores de proteína de núcleo. Las posiciones de los sitios de fragmentación AGX se indican con el número de aminoácido de la Gly.

Figura 17. Procesamiento proteolítico de la poliproteína P4b por I7L. Las células BSC₄₀ se infectaron con ts 16 VV y se transfectaron con plásmidos que contienen los genes I7L y P4b respectivamente. Las células se extrajeron 24 h post-infección y los extractos se analizaron por Western Blot con antisuero anti-flag. El carril 1, las células infectadas con ts 16 sólo; carril 2, células infectadas con ts 16 y transfectados con P4b; carril 3, las células infectadas con ts 16 y cotransfectadas tanto con plásmidos P4b e I7L; carril 4, células infectadas con ts 16 y cotransfectadas con plásmidos P4b y pI7LH241A (ver Tabla 1); carril 5, las células infectadas con ts 16 y transfectadas con P4bIDI; carril 6, las células infectadas con ts 16 y cotransfectadas con P4bIDI y pI7L; carril 7, células infectadas con ts 16 y cotransfectadas con plásmidos P4IDI y pI7LH241A. Las bandas que corresponden a la proteína precursora P4b y su producto de fragmentación maduro 4b se indican en la derecha. El peso molecular se indica en la izquierda.

Figura 18. Procesamiento proteolítico de la poliproteína P4b por I7L. Las células BSC₄₀ se infectaron con ts 16 VV y se transfectaron con plásmidos que contienen los genes I7L y P4a respectivamente. Las células se extrajeron 24 h post-infección y los extractos se analizaron por Western Blot con antisuero anti-flag. El carril 1, las células no infectadas; carril 2, células infectadas con ts 16 sólo; carril 3, las células infectadas con ts 16 y transfectadas con plásmidos P4a; carril 4, células infectadas con ts 16 y cotransfectadas tanto con plásmidos P4a como pI7L; carril 5, células infectadas con ts 16 y cotransfectadas con P4a y pI7LH241A; carril 6, células infectadas con ts 16 y transfectadas con P4aIDI617; carril 7, células infectadas con ts 16 y cotransfectadas con plásmidos P4aIDI617 y pI7L; carril 8, células infectadas con ts 16 y cotransfectadas con P4aIDI617 y pI7LH241A; carril 9, células infectadas con ts 16 y transfectadas con P4aIDI697; carril 10, células infectadas con ts 16 y cotransfectadas con P4aIDI617 y pI7L; carril 11, células infectadas con ts 16 y cotransfectadas con P4aIDI697 y pI7LH241A. Las bandas que corresponden a la proteína precursora P4a y los productos de fragmentación pequeños se indican en la derecha. El peso molecular se indica en la izquierda.

Figura 19. Caracterización de I7L. Punto de hidrofobicidad predicho de la proteína I7L utilizando el programa Kyte-Doolittle. Las posiciones de la tríada catalítica putativa (H241, D248, C328) así como la mutación ts 16 y la mutación del residuo de histidina para inactivar I7L están indicados con flechas. Las posiciones de los aminoácidos se indican debajo. Homología de secuencia para el mismo gen del virus de la viruela, virus de la viruela del camello y virus de la viruela del mono se indican debajo por los rectángulos con las posiciones de los aminoácidos diferentes indicados en la posición correcta mediante una barra negra. Homología de secuencia del dominio catalítico conservado entre VV I7L, la proteasa ASFV, proteasa adenovirus y la proteasa cisteína de la levadura se indican en la parte superior de la figura con unas flechas que apuntan a los aminoácidos altamente conservados.

Figura 20. Procesamiento proteolítico de P25K, P4a y P4b por el mutante I7L.

Figura 21. Rescate del marcador de ts 16 con I7L longitud total, I7L truncada y I7L mutante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona unos medios para descubrir y desarrollar compuestos capaces de inhibir el crecimiento de ortopoxvirus patógenos (como la viruela) y patologías asociadas a la enfermedad en el huésped humano.

El desarrollo de un fármaco antiviral eficaz requiere la identificación de una interacción específica o actividad cuya interrupción será letal para el virus y relativamente benigna para el huésped. Ya que estos virus, tales como ortopoxvirus, son unos parásitos intracelulares obligados que utilizan muchos enzimas de las células huésped y las vías metabólicas durante su replicación, a veces esta tarea es bastante difícil y este hecho es responsable principalmente de la escasez relativa de los fármacos antivirales con éxito. Los fármacos que tiene una efectividad probada, tales como aciclovir, generalmente se dirigen frente a nucleótido metabolizadores o enzimas biosintéticos. Ya que muchos de los enzimas codificados por ortopoxvirus implicados en la biosíntesis del ácido nucleico son altamente homólogos con sus homólogos de mamíferos (por ejemplo, la timidina cinasa del virus *Vaccinia* comparte más del 90% de la identidad con el enzima humano), anteriormente ha resultado difícil, si no imposible, identificar los compuestos que bloquean específicamente dichos enzimas virales.

La mayoría de virus utiliza la proteólisis catalizada por proteinasas codificadas por virus como una etapa clave en su ciclo de desarrollo, presentando una nueva clase de dianas para el desarrollo de fármacos antivirales. Recientemente, se han desarrollado los inhibidores de proteinasa que se dirigen específicamente a VIH, el virus de hepatitis C y los enzimas influenza que han demostrado ser muy eficaces en la prevención de la enfermedad en el huésped humano. De este modo, resulta muy interesante destacar que la maduración proteolítica de las proteínas de núcleo de ortopoxvirus es absolutamente necesaria para producir la progenie infecciosa. Los estudios realizados en laboratorio durante los últimos diez años pasados han identificado las únicas señales cis requeridas para la fragmentación endoproteolítica

directa de los precursores de la proteína del núcleo, han establecido los requerimientos contextuales de la maduración de la proteína del núcleo y han sugerido sólidamente que la proteinasa que lleva a cabo la reacción esencial está codificado por virus. La presente invención aprovecha dicha diana atractiva y la amplia experiencia investigando este problema, para desarrollar un fármaco antiviral efectivo que bloquea la replicación de ortopoxvirus basado en la inhibición mecánica específica de la proteinasa de la proteína del núcleo viral (vCPP).

En particular, la presente invención proporciona:

1. el vCPP responsable de la maduración de la proteína del núcleo de ortopoxvirus.
2. La utilización de unos enfoques genéticos letales condicionales para validar el vCPP como un producto del gen esencial.
3. La utilización de la tecnología de vector de expresión mamífero y/o procariota para permitir la producción y purificación de grandes cantidades de vCPP.
4. Análisis estructura-función y bioquímicos de la vCPP purificada.
5. Un ensayo de fragmentación *in vitro* para medir la actividad de un enzima vCPP y la utilización de dicho ensayo en unos procesos de cribado de alto rendimiento basado en el mecanismo frente a sublibrerías de inhibidores potenciales de proteinasas.
6. Prueba de los compuestos líder que inhiben la replicación de los varios ortopoxvirus en cultivos de tejidos celulares, debido al bloqueo de la actividad vCPP.

La presente invención proporciona un medio para la identificación de compuestos anti-poxvirus que son muy específicos en su perfil inhibidor frente a vCPP, son altamente potentes por lo que se requieren unas concentraciones bajas y presentan unas características químicas que proporcionan una biodisponibilidad excelente sin causar una toxicidad generalizada. También dichos compuestos son fáciles de sintetizar y son económicos, no presentan problemas de formulación infrecuentes y son estables para proporcionar una vida media larga.

Expresión y purificación de vCPP

La producción de un antisuero policlonal monoespecífico hace posible seguir la síntesis y el camino intracelular de la proteína vCPP y para apoyar la purificación y el desarrollo del ensayo.

El ORF vCPP completo (con o sin la etiqueta oligohistidina) se puede expresar en vectores de expresión para la utilización como una fuente de inmunógeno para inducir un antisuero con una reactividad amplia que reconoce múltiples epítomos dentro de la proteína intacta. Los vectores de expresión procariotas se pueden utilizar, sin embargo, ya que vCPP es una proteinasa, la expresión de su actividad en las células bacterianas puede ser letal y evita el aislamiento del clon de interés. Si surge este problema se pueden emplear dos procedimientos alternativos. Primero, es posible emplear los vectores de expresión en los que la expresión del inserto extraño está bajo un control muy estricto, para minimizar la expresión en ausencia de la inducción, y purifica la vCPP en las etapas tempranas post inducción antes de que se destruyan las células que expresan. Segundo, se pueden clonar y expresar una forma inactiva de la proteína vCPP.

Es sabido que la mutación de los residuos dentro del grupo HXXEH inhibe la actividad del enzima G1L. Se pueden introducir las mutaciones similares en la(s) díada(s) catalíticas potenciales de I7L. También se pueden generar los subdominios específicos para el antisuero, ya sea utilizando los vectores de expresión procariota para producir unas proteínas de fusión en marco que contienen sólo unas pequeñas porciones de la proteína vCPP o mediante la síntesis de los péptidos sintéticos que corresponden a dichas regiones (que acopla los péptidos para transportar las proteínas, si es necesario). Ambos enfoques se han utilizado con éxito para obtener un antisuero específico de región frente a varias de las proteínas de núcleo VV. Los análisis por ordenador de los ORF G1L e I7L sugieren que son epítomos inmunogénicos potenciales localizados a través de dichas proteínas, con muchos de ellos localizados en la superficie de la proteína. Además de utilizarse en los experimentos *in vivo*, el antisuero específico del subdominio podría resultar útil para probar los dominios catalíticos y de unión de la proteína vCPP.

Si se necesitan unos reactivos inmunológicos adicionales para probar la estructura de vCPP, se puede utilizar la proteína vCPP purificada como inmunógeno en la producción de anticuerpos monoclonales. En cualquier caso, las inmunoreactividades de todos los sueros derivados se pueden mapear y confirmar utilizando un conjunto de anidados genéticamente modificados de las truncaciones de la proteína vCPP o mediante la técnica BIAcore.

Con el fin de sobreproducir un enzima para la caracterización bioquímica y para la utilización en el desarrollo del ensayo, se puede sobreexpresar la proteína vCPP tanto en las células eucariotas como procariotas, se pueden purificar y caracterizar. Una de las fuentes de la proteína vCPP es la célula mamífera infectada por VV. La expresión en las células de mamíferos presenta la ventaja de que se producirá una modificación post-traducción potencial, se cataliza mediante los enzimas celulares o virales. A pesar de que es posible que se aíslen unas cantidades suficientes de la proteína vCPP de la infección por la cepa VV de tipo salvaje en presencia de rifampicina para bloquear el

procesamiento, los avances recientes en la tecnología del vector VV hacen posible sobreexpresar la proteína vCPP sin dificultad.

El ORF que expresa la vCPP se puede insertar en un vector plásmido anterior al promotor T7 y el potenciador de traducción EMC. Entonces, dicho plásmido se transfecta en un recipiente de células de mamíferos que están superinfectadas con un recombinante VV (cepa MVA): T7. Bajo dichas condiciones, se expresa la copia genómica del gen de la ARN polimerasa T7, la cual conduce a un nivel de expresión elevado de la proteína vCPP del plásmido. Sin embargo, ya que la cepa MVA de VV no es capaz de completar su ciclo replicativo en las células de mamíferos, el procesamiento contextual de las proteínas del núcleo VV se abortará, por lo que la proteína vCPP se acumulará. Alternativamente, se pueden utilizar los vectores de expresión baculovirus comercialmente disponibles. A pesar de que no están glicosiladas (que es poco probable en el caso de vCPP), las proteínas de mamíferos producidas en las células de insectos son frecuentemente funcionales.

Para sobreexpresar la proteína vCPP en las células procariotas, se puede utilizar el sistema SPEX. Éste es un vector de expresión de proteína que utiliza una bacteria gram-positivo GRAS (generalmente referidas como seguras) no patógena como varios *Streptococcus* o *Lactococcus sp.* para producir y exportar proteínas. Este sistema se describe en la patente US nº 5.821.088 los contenidos de la cual se incorporan en la presente memoria como referencia. El sistema SPEX aprovecha una vía conservada que todas las bacterias gram-positivas pueden utilizar para exportar y anclar proteínas en la superficie celular. Las proteínas heterólogas se dirigen para expresar en la superficie celular del huésped gram-positivo o se secreta en el medio de cultivo utilizando unas porciones de la proteína M, una proteína fibrilar de la superficie de *Streptococcus pyogenes*, como una parte de la fusión.

La secuencia señal y la secuencia de propéptido de la proteína M se fusionan con el producto gen de interés para conseguir la traslocación a través de la membrana celular de la célula huésped gram-positiva que resulta en la secreción directa de la proteína deseada en el medio de cultivo. Algunas de las ventajas de dicho sistema de vector que los hacen muy adecuado para la producción procariota de la vCPP incluye: 1) la metodología de vector de recombinación de clonación *E. coli* de uso estándar 2) transferencia en una etapa seleccionable del vector de recombinación en las cepas de expresión SPEX; 3) selección de una expresión cromosómicamente integrada o basado en plásmido; 3) cepas de vector de expresión GRAS (puede ser más fácil producir de lotes GLP de enzimas); 4) no liberación de productos intracelulares tóxicos como LPS; 5) los productos de proteínas se producen en una forma soluble y pueden asumir una conformación activa (diferente de muchas proteínas producidas en *E. coli* que forma unas inclusiones insolubles en el periplasma); 6) no hay limitación aparente de los productos de proteínas expresados (≥ 150 kDa); 7) producción de bajo coste en un medio de laboratorio simple sin productos bovinos (no hay contaminación potencial por BSE); 8) buen rendimiento, 3-5 mg de proteína por litro de un cultivo bacteriano sin optimización y 9) se pueden clasificar para la producción por las bacterias gram positivas son adecuadas para la fermentación de alta densidad. Utilizando dicho sistema, ya se ha conseguido la expresión de un gran número de proteínas extrañas antigénicamente auténticas y enzimáticamente activas.

La proteína vCPP de las fuentes tanto mamíferas como bacterianas se puede purificar utilizando una combinación de procesos cromatográficos tradicionales y/o de inmunoafinidad. Se recomienda trabajar rápidamente, trabajar en frío y almacenar fracciones cromatográficas en unas condiciones que probablemente facilitan el mantenimiento de la actividad enzimática (por ejemplo, acidificando el glicerol y/o manteniendo elevadas concentraciones de proteínas). Con el fin de mejorar más la capacidad para purificar la vCPP, los vectores de expresión eucariotas y/o procariotas se pueden reconstruir de modo que la proteína vCPP se expresa con un tracto oligohistidina corto fusionado con su N- o C-terminal. Las proteínas G1L y/o I7L marcadas con his se pueden purificar después directamente mediante una cromatografía por afinidad a metal, utilizando los procedimientos conocidos en la técnica.

La adición de 6-10 residuos de histidina en uno de los extremos de la proteína vCPP no afectará su actividad enzimática. Se ha demostrado anteriormente que la adición de una etiqueta histidina al N-terminal de las proteinasas sortase o speB de *S. pyogenes* no presenta un efecto demostrable en la capacidad de la proteína para llevar a cabo la catálisis en su estado natural. Igualmente, los científicos disponen de unos protocolos de purificación desarrollados con éxito para las proteinasas SpeB, sortase y DegP.

Ensayo de fragmentación de vCPP

A pesar del hecho que la proteólisis de los precursores de la proteína del núcleo VV se da *in vivo* sólo dentro del contexto del ensamblaje del virión, los inventores presentes han establecido un ensayo de fragmentación para su utilización junto con el diseño racional de fármaco y/o HTS. Este ensayo se basa en la capacidad de desarrollar unos ensayos de fragmentación *in vitro* para una variedad de otras proteinasas virales que también participan en las reacciones de fragmentación morfogénicas. Al disponer de una proteinasa vCPP purificada a mano, se identifica un sustrato adecuado, se diseña un formato útil y se desarrollan las condiciones que favorecen una fragmentación endoproteolítica del grupo AG (X). Los ensayos de fragmentación específica para los enzimas SpeB, sortase y DegP ya se han establecido y en esta memoria se utilizan enfoques similares. A continuación se destacan tres tipos diferentes de ensayos, presentado según orden de complejidad y utilidad potencial en el desarrollo posterior de fármacos.

- a) ELISA. Se proporciona un péptido que comprende el grupo AG(X), y opcionalmente además unos aminoácidos circundantes del sitio de fragmentación P4b. Se marca el péptido. La etiqueta es un marcador

fluorescente, como un IAEDANS o didanil-L-cisteína (Molecular Probes, OR), unido a uno de los grupos terminales del péptido, como el amino terminal. El péptido se aplica en una de las placas de microtitulación preactivadas, y se deja en incubación, por ejemplo, toda la noche, seguido por una solución de bloqueo que recubre la superficie reactiva de la placa. Se añade vCPP a la placa y se monitoriza la extensión de la fragmentación a lo largo del tiempo mediante la liberación de la fluorescencia como cuando se monitoriza utilizando, por ejemplo, un microfluorímetro TECAN. Alternativamente, se puede utilizar una lectura de salida inmunológica, utilizando el formato ELISA estándar junto con el antisuero específico del sitio de fragmentación como anticuerpo primario.

- b) FPA (ensayo de proximidad de fluorescencia). Este ensayo se basa en una pareja de fluorescencia-apagado de sondas que están conjugadas con los extremos NH_2 y COOH del péptido. Al estar el grupo de apagado muy próximo al grupo fluorescente, como antes de la fragmentación, se absorbe la energía de fluorescencia por el grupo de apagado que da como resultado una señal relativamente baja o de referencia. Tras la fragmentación del péptido por la proteínasa, “se elimina” el grupo de apagado de la proximidad inmediata del grupo fluorescente y la fluorescencia de la sonda se incrementa por encima del valor de referencia. Este es un ensayo muy sensible y es el formato óptimo, denominado “mezcla y medición”, para el HTS.

Se proporciona un péptido que comprende el sitio de fragmentación AG(X) definido con un grupo dabcil succinimidilo éster (dabcilo) conjugado con un grupo terminal, un grupo EDANS, ácido 5-(2-aminoetil) amino-naftaleno-1-sulfónico, conjugado con el otro grupo terminal. En una forma de realización posible, el grupo dabcilo se conjuga con el NH_2 terminal, mientras que el grupo EDANS se conjuga con el COOH terminal. El Dabcilo no tiene propiedades de fluorescencia pero sí presenta una elevada absorbancia que coincide con el espectro de emisión de picos de EDANS. Este péptido se titula en los pocillos de unas placas de vista negras y después se añade la vCPP proteasa. Un aumento de la fluorescencia indica la fragmentación del péptido.

- c) HTRF. Se sintetiza un péptido similar al que se ha descrito en el ensayo FPA para que incluya un sitio de fragmentación AG(X) y las modificaciones en unos de los extremos para permitir el marcado con los reactivos necesarios para la transferencia de energía de resonancia. El amino terminal del péptido se biotinila y el carboxilo terminal presenta una etiqueta polihistidina. El ensayo HTRF depende de la transferencia de energía de resonancia-fluorescencia (FRET) del grupo excitado criptato de europio (criptato Eu) a una alofocianina modificada (XL665). La estreptavidina, que está disponible comercialmente, se puede utilizar para modificar el amino terminal y anticuerpo anti-His6 acoplado a criptato de Eu (Packard Bioscience Co, Meriden, CA) para modificar el carboxilo terminal del péptido. Cuando se excita este reactivo a una longitud de onda de 337 nm, el criptato de Eu debido a la proximidad, transfiere energía a XL665. Entonces XL665 pierde energía, emitiendo luz a una longitud de onda de 665 nm. Tras la fragmentación del péptido, la transferencia de energía de resonancia del criptato de Eu excitado a XL665 no tiene lugar y la señal de emisión resultante a una longitud de onda de 665 nm se reduce.

40 *Diseño racional de fármacos inhibidores de vCPP*

Fácilmente, un experto ordinario en la materia será capaz de utilizar cualquier formato de ensayo que prefiera, y puede variar las condiciones de la reacción (proteasa: proporción de sustrato, fuerza iónica, temperatura, hidrofobicidad, etc...) con el fin de optimizar la reacción. La validación de que se está produciendo la fragmentación en el sitio antes indicado se puede obtener mediante un análisis de microsecuencia de los productos de fragmentación, la utilización de sustratos de péptidos que contienen unos sitios de fragmentación mutados y la inclusión de inhibidores de proteasa específicos para las clases previstas de proteasa a las que pertenece vCPP. De forma similar, el antisuero generado anteriormente se puede utilizar conjuntamente con estos ensayos para mapear las superficies interactivas y los sitios activos del enzima.

Los análisis estructurales de la proteína también se pueden conducir como un enfoque para determinar su estructura tridimensional. Al someter al enzima purificado a los procesos analíticos como DC (dicroísmo circular), RMN dos-dimensional (resonancia magnética nuclear), o cristalización/difracción de rayos X se puede obtener muy rápidamente mucha información estructural acerca de vCPP. Esta información, acoplada con la identificación de los residuos catalíticos y el conocimiento de la clase de proteínasa a la que pertenece vCPP, permite llevar a cabo el modelo estructural. Utilizando dicha información, un experto ordinario en la materia será capaz de identificar los subconjuntos de las entidades químicas que es probable que se unan a una proteínasa de una clase determinada con determinadas características químicas. Este subconjunto químico se puede utilizar como punto de partida y para ensayar los inhibidores probables en el ensayo de fragmentación. Cualquiera que de un resultado positivo puede servir como punto de partida para la química iterativa posterior.

HTS vCPP

Una de las técnicas más poderosas y útiles para la identificación de entidades químicas útiles en la industria farmacéutica es el cribado de alto rendimiento automatizado. La mayoría de los fármacos disponibles y muchos de los que se están desarrollando actualmente se han descubierto de este modo. Desafortunadamente, la HTS al azar frente a la química de compuestos naturales al azar o la química combinatoria es lenta, cara y muy laboriosa.

Un experto ordinario en la materia puede utilizar fácilmente uno de los formatos de ensayo descritos anteriormente, como un enfoque mezcla y medición como FPA o HTRF, para cribar manualmente los subconjuntos de bibliotecas químicas que se han seleccionado como inhibidores potenciales de la proteínasa. Una de las utilidades de HTS es que para cualquier inhibidor potencial que se identifique, se pueden establecer rápidamente los intervalos de concentraciones eficaces y el ensayo de especificidad frente a otras proteinasas, y realizarlo de un modo replicativo.

Cribado in vivo para la actividad inhibidora de vCPP

Los compuestos líder identificados mediante el diseño racional de fármacos y por HTS se pueden ensayar para estudiar su eficacia *in vivo* de la siguiente manera:

- a) Se sustituyen concentraciones elevadas de los compuestos líder en cultivos celulares no infectados de varias especies diferentes, L-929 (murina), RK-13 (de conejo), RL-1 (de rata), HeLa (humana) y BSC₄₀ (de mono). Se observaron las células para detectar las alteraciones morfológicas, la velocidad de crecimiento, la síntesis de ADN y la viabilidad medidas por exclusión del tinte Azul tripán vital.
- b) Se colocaron unas concentraciones elevadas de los compuestos líderes en unas células BSC₄₀ infectadas con VV. Las células infectadas se analizaron para estudiar la producción de virus infeccioso, síntesis de proteína viral, síntesis de ADN viral, estado del ensamblaje del virión y la fragmentación de la proteína del núcleo tal como se ha descrito anteriormente. Si el inhibidor es específicamente vCCP de marcaje, se observará un fenotipo tardío abortivo.
- c) Para que un inhibidor de vCPP sea considerado como un fármaco antiviral, debe ser eficaz contra varios poxvirus. Por lo tanto, el inhibidor de vCPP se ensaya contra varias cepas VV (WR, IHD, Copenague), la viruela del conejo y la viruela de la vaca. Además, cualquier inhibidor prometedor se ensaya contra no ortopoxvirus como la viruela aviar, virus orf, ectromella y entomopoxvirus para determinar la amplitud de la infección.

Ejemplos

Como sistema experimental, la presente invención utiliza el virus *Vaccinia* (VV) debido a la riqueza de información disponible en la técnica, la capacidad probada para hacerlo crecer y manipularlo en el laboratorio, el perfil de bioseguridad aceptable u debido al alto nivel de conservación funcional y de secuencia de los virus de la viruela.

Ejemplo 1

El marco de lectura abierto de I7L en el virus *Vaccinia* codifica para una proteasa cisteína de 423 aminoácidos que contiene la triada catalítica conservada (His241, Asp248, Cys328) indicativa de dichas proteasas. También contiene un residuo de glutamina invariante (Q) justo por encima del residuo cisteína previsto para ayudar a formar el orificio oxianión en el sitio activo. Se cree que la proteína I7L es la proteasa de la proteína del núcleo para el virus *Vaccinia*.

Los sustratos posibles de la proteasa de la proteína del núcleo son P4a, P4b, P25K y P17K (2), los cuales se procesan todos proteolíticamente. El alineamiento de los sitios de fragmentación de dichos precursores revela un grupo de fragmentación AG*X conservado. Para los experimentos descritos a continuación se seleccionó P25K como el sustrato del ensayo. P25K contienen dos sitios de fragmentación putativos, AGS en los aminoácidos 17-19 y AGA en los aminoácidos 31-33. Con el fin de determinar si I7L es la proteasa de la proteína del núcleo, se clonaron I7L fusionado a una etiqueta 6x histidina C-terminal y P25K fusionado a una etiqueta FLAG C-terminal en los plásmidos para los estudios de expresión transitoria en el virus *Vaccinia*. Ambos plásmidos se transfectaron en las células BSC₄₀ con el virus *Vaccinia*. El análisis por Western Blot utilizando un anticuerpo M2 específico de FLAG mostró que cuando I7L y P25K se co-expresaban, el sustrato P25K se fragmentaba produciendo una banda de 25 KDa (Fig. 1, carril 5 y Fig. 2, carril 5).

Para caracterizar más el sitio de fragmentación, se realizaron dos mutaciones en el marco de lectura abierto P25K modificando los aminoácidos de los dos sitios fragmentados por mutagénesis dirigida lateral. El primer mutante presenta los aminoácidos 17-19 cambiados de AGS a IDI. El segundo mutante presenta los aminoácidos 31-33 cambiados de AGA a RDP. Se analizó la capacidad de las proteínas mutantes para ser procesadas mediante la expresión transitoria en las células infectadas VV. Como se demostró por inmunoensayo utilizando el anticuerpo M2 específico de FLAG, cuando el plásmido mutante IDI se co-expresa con I7L, se sigue observando fragmentación (Fig. 2, carril 6), que muestra que I7L se corta en el sitio AGA. Sin embargo, existe una fragmentación parcial del mutante RDP (Fig. 2, carril 7), que puede significar que I7L se puede cortar en el sitio AGS también. A partir de estos resultados, es posible que P25K sufra un proceso proteolítico de dos etapas de fragmentación en el sitio AGS y después la fragmentación del sitio AGA. Los presentados a continuación muestran que I7L es capaz de fragmentar P25K en los sitios AGS y AGA y procesar la proteína precursora a partir de una proteína de 28 KDa a una proteína de 25 KDa.

Se ha demostrado que un gran número de proteínas del núcleo VV, incluyendo 4a, 4b y 25K, parece que se procesan a través de una vía de fragmentación morfogénica común que está íntimamente ligada con el ensamblaje y maduración del virión. Dichos sustratos se sintetizan como precursores durante la fase tardía de la expresión del

gen vírico. La forma precursora es esencial para las proteínas que vana ser marcadas para la fabricación del virus y que se van a asociar con el ensamblaje del virión. La fragmentación de los precursores sólo se da dentro del contexto del virión maduro. Todos los precursores de las proteínas parece que se fragmentan en un nuevo grupo AG(X). Este grupo es diferente del utilizado en cualquier otro sistema viral y no es reconocido por una proteinasa conocida. Se ha identificado el enzima responsable de estas fragmentaciones como una proteína tardía VV y parece ser la proteinasa cisteína codificada por I7L.

Ejemplo 2

Identificación de los sitios de fragmentación P4b y P25K- el grupo AGA

Etiquetado por radiomarcado de las células infectadas por VV tras el inicio de la síntesis de ADN vírico y el análisis de los extractos por SDS: electroforesis de gel de poliacrilamida y autoradiografía, se observaron tres especies de proteínas principales radiomarcadas con un peso molecular aparente de 95 KDa (P4a), 65 KDa (P4b) y 28 KDa (P25K). Tras la adición de un medio que contiene un exceso de aminoácidos no marcados y una incubación continuada de las células infectadas, se persiguieron estas tres proteínas en las especies 62 KDa (4a), 60 KDa (4b) y 25 KDa (25K) que co-migran con las tres proteínas principales del núcleo del virión. De modo interesante, contrariamente a muchas reacciones proteolíticas, el procedimiento de conservación no es rápido con un plazo de 30-45 minutos observados entre el tiempo de síntesis del precursor y la aparición del producto de fragmentación. Además, la proteólisis de los precursores de las proteínas del núcleo VV parecen necesitar una síntesis de proteína *de novo* persistente además de cicloheximida en el momento del seguimiento de la formación del producto completamente inhibido. Ambas observaciones concuerdan con la hipótesis de que la fragmentación se produce dentro del contexto del ensamblaje del virión, un procedimiento que requiere tanto tiempo como una síntesis proteica continuada. Esta fue la base inicial para proponer la hipótesis del “procesamiento contextual” de la proteólisis de la proteína del núcleo VV.

Para determinar los sitios en los que los precursores de la proteína del núcleo VV se fragmentan, se aislaron las proteínas 4a, 4b y 25K maduras, se purificaron y se sometieron a un análisis de microsecuencia del N-terminal. A continuación, se compararon las secuencias derivadas con las secuencias de aminoácidos previstas de los ORF P4a, P4b y P25K. Se identificaron los aminos terminales de las proteínas 25K y 4b como residuo 33 de P25K y residuo 62 de P4b, respectivamente (Figura 4). La disminución prevista en el peso molecular debido a la pérdida de los aminoácidos 32 y 61 de los N-terminales de P25K y P4b, respectivamente, se correspondió bien con el cambio en la migración observado en los geles tras el procesamiento proteolítico. Debido a que se habían aislado los péptidos pequeños, no se pudo determinar si el procesamiento de los precursores P4b y P25K provenía a través de una fragmentación proteolítica, una digestión exoproteolítica o una combinación de los dos procedimientos.

La comparación de las secuencias de aminoácidos en los precursores P4b y P25K que rodean los derivados de N-terminal de las proteínas 4b y 25K maduras reveló la presencia de un grupo idéntico. Los N-terminales de ambos productos de fragmentación se encontraron dentro de un tripéptido conservado Ala-Gly-Ala (AGA), y en sitio de fragmentación previsto se da en el enlace roto Gly-Ala. La importancia del grupo AGA como un sitio de fragmentación determinante se sugirió mediante dos líneas de evidencia. Primero, no existían otros elementos de secuencia aparentes conservados más arriba o más debajo de los sitios de fragmentación putativos P4b y P25K.

Segundo, a pesar de que los homólogos de las proteínas del núcleo del virus de la viruela aviar (FPV) 4b y 25K sólo comparten el 52% y 33% de identidad, respectivamente con las proteínas VV (50), ambos precursores FPV contenían un grupo AGA exactamente en el mismo sitio que los precursores de proteínas del núcleo VV (Figura 5). De forma interesante, a pesar que la proteína 4a se sometió a los análisis similares, no se obtuvieron datos de microsecuencia, lo que sugiere que el N-terminal está bloqueado.

Ejemplo 3

La vía de maduración de P4a

La secuencia de aminoácidos prevista del precursor P4a no contiene el grupo tripéptido AGA utilizado en el procesamiento de P4b y P25K. Esto aumenta la posibilidad que la proteína P4a se haya procesado por una vía diferente, o que P4a se haya procesado por la misma vía que P4b y P25K pero en unos sitios que se han fragmentado menos eficientemente.

El apoyo a esta hipótesis surgió de la observación que la fragmentación del precursor P4a parece producirse a un velocidad menor que la de los precursores P4b y P25K *in vivo* (51). Teniéndolo en cuenta, se investigó la secuencia de aminoácidos prevista del precursor P4a de 891 aminoácidos para hallar la secuencia AGX y se encontraron las tres señales, AGN (residuos 94-96), AGS (residuos 613-615) y AGT (residuos 696-698). Si se produce la fragmentación en los tres sitios en el precursor P4a, se liberaría una proteína interna de aproximadamente el tamaño correcto para 4a.

Para verificar la hipótesis que la proteína del núcleo VV 4a se fragmentó de P4a por proteólisis en los tres sitios internos AGX, se generaron unos reactivos inmunológicos que eran específicos para las subregiones del precursor P4a y se utilizaron junto con varios procesos de mapeado de péptidos y secuenciación de proteínas. Los resultados

obtenidos demostraron que el precursor P4a se fragmentó en dos lugares, el sitio AGS entre los residuos 613 a 615 y el sitio AGT entre los residuos 697 y 698. Tanto la proteína 4a N-terminal grande (residuos 1 a 614) como la proteína C-terminal de 23 KDa (residuos 698 a 891) se convirtieron en constituyentes principales del núcleo del virión. No se conoce la localización y el recorrido del péptido interno pequeño que estaba previsto que se liberara (residuos 618-697). Sin embargo, utilizando la mutagénesis dirigida, se produjeron unas proteínas P4a mutantes en las que se inactivaron genéticamente uno de los sitios AGS o AGT. Utilizando los procesos de expresión transitoria, fue posible demostrar la existencia *in vivo* de las quimeras 4a-9K o 9K-23K, que sugieren que la secuencia interna de 9 KDa no es inherentemente inestable. Además, la capacidad para aislar y microsecuenciar ambos productos finales de la fragmentación en los sitios AGS y AGT sugiere fuertemente que el procesamiento se dio a través de un evento de fragmentación endoproteolítico único. Aunque se fragmentaron los sitios internos AGS y AGT del precursor P4a, dos líneas independientes de los datos del mapeado del péptido demostraron claramente que el sitio AGN en los residuos 94 a 96 no se procesó. De este modo, dichos resultados sugieren que el procesamiento de los tres precursores principales de la proteína del núcleo probablemente está ligado y es catalizado coordinadamente por la misma proteinasa viral durante el ensamblaje del virus, cuando se da una fragmentación endoproteolítica en el grupo interno AGX (en el que X puede ser A, S o T, pero no N).

Ejemplo 4

20 El grupo de fragmentación AG(X)

Las tres proteínas del núcleo VV que se sabía eran procesadas proteolíticamente son cortadas por los grupos AGX. Por lo tanto era interesante preguntarse dentro del contexto de todo el genoma VV, cuantas veces se preveía que el tripéptido AGX iba a estar presente en la proteína VV y determinar la frecuencia con la que se utiliza el grupo como sitio de fragmentación. Utilizando la secuencia de nucleótidos completa del genoma VV (Copenhague) (49), se determinó la secuencia de aminoácidos prevista de cada ORF y se recogió en una base de datos única. Una búsqueda en dicha base de datos del tripéptido AGX reveló que se produce 82 veces de entre los 198 ORF principales, que es sustancialmente menos frecuente que los 204 sitios esperados si se da AGX al azar. De estos 82 sitios, 18 se parecen a sitios que han demostrado con anterioridad que han sido fragmentados activamente, es decir AGA de P25K y P4b y AGT y AGS de P4a.

Para explorar si alguno o todos estos grupos AGX sirven como sitios de fragmentación durante la replicación de VV, se ha centrado la atención en el tripéptido AGA como caso ensayo. El grupo AGA se presenta siete veces. Las proteínas que contienen el grupo AGA son: los precursores de las proteínas del núcleo P4b y P25K (ambas están fragmentadas), los productos de genes A12L y A17L de función desconocida, la proteína P37 palmitilada codificada por el ORF F13L que se encuentra en la membrana externa que envuelve las partículas EEV, la ADN polimerasa VV (ADNP) codificada por el ORF E9L y una proteína de rango de huésped (HR) codificada por el gen KIL. Para determinar si dichas proteínas se procesaron a lo largo de la infección por VV, se produjeron o se obtuvieron unos antisueros específicos (α ADN de P. Traktman y α P37K de R. VVitek) para cada producto de gen individual y se utilizaron de acuerdo con el radio marcado de seguimiento por radiomarcado y los procedimientos de inmunoprecipitación.

Los resultados obtenidos indicaron claramente que las proteínas ANDP, P37K y HR no eran procesadas proteolíticamente. Por el contrario, los productos de los genes de los ORF de A17L y A12L se sintetizaron como los precursores 23 KDa y 24 KDa que fueron procesados a los productos de 21 KDa y 17 KDa. La reacción de procesamiento se inhibió por la rifampicina y los productos procesados se encontraron asociados con la partícula del virión, lo que sugiere que los productos de los genes A17L y A12L han madurado utilizando la misma vía que los precursores P4b y P25K. Dichos resultados nos han permitido proponer varias normas que gobiernan las fragmentaciones morfogénicas en VV (Figura 7).

Para ser procesada, una proteína precursora debe: 1) contener un grupo AGA (o AGX); 2) que se exprese en las etapas tardías de la infección (ADNP es una proteína temprana, HR es una proteína temprana-inmediata); y 3) ser destinada para la incorporación en el núcleo del virión (P37 es una proteína tardía pero está localizada en membrana no en el núcleo). Incluso con dichas restricciones, dado el número de ocurrencias de AGX más un gran número de proteínas encontradas en el virión complejo VV, esto sugiere que de 40 a 50 proteínas virales pueden ser sometidas a las fragmentaciones morfogénicas durante el ensamblaje del virión.

Al proponer dichas normas que gobiernan la proteólisis morfogénica nos hizo examinar de nuevo el procesamiento del producto del gen A12L. Dicho producto del gen se expresa en las etapas tardías. Aparentemente es una proteína del núcleo. Y no contiene uno sino tres grupos AGX. Además el tripéptido AGA próximo al N-terminal del precursor de 23 KDa A12L que se sabe que se fragmenta, existen dos grupos AGK hacia el C-terminal de la proteína. Para determinar si uno, o ambos, sitios AGK son reconocidos, se llevó a cabo un radioetiquetado por radiomarcado-seguimiento a lo largo del tiempo de las células infectadas por VV seguido por inmunoprecipitación con el suero policlonal α 12L. Para gran sorpresa, se ha descubierto que el precursor A12L de 23 KDa se fragmentó en un número de productos que incluyen especies de 15, 10,6 y 8 KDa. El análisis por microsecuencia de los productos demostró que los tres productos surgen por fragmentación de uno, dos o los tres grupos AGX. De modo interesante, incluso con periodos de seguimiento prolongados no se pudo el precursor seguir hasta el producto de 8 KDa completamente procesado. Más bien, los tres productos parecen ser estables con [10,6 KDa] > [15 KDa] > [8KDa]. Además, los tres productos derivados de A12L se pueden encontrar en el virión lo que sugiere que pueden tener unas funciones biológicas diferentes. De este modo,

dichos resultados han identificado una nueva variante, AGK, del grupo AGX que se fragmenta *in vivo* y proporcionó el primer ejemplo de la proteína del núcleo VV que es sometida a una vía de maduración de tres etapas.

5 Ejemplo 5

Procesamiento de la proteína del núcleo VV es una vía de fragmentación morfogénica

Como enfoque para ensayar si la proteólisis de la proteína del núcleo VV tiene un función formativa o morfogénica en el ciclo de vida del virus, se desarrolló un procedimiento de fraccionamiento por gradiente de sacarosa que permitió la separación y purificación de partículas VV radiomarcadas inmaduras y maduras. Dependiendo del tiempo de post-infección en el que se extrajeron las células infectadas, se pueden detectar cuatro picos distintos de cuentas precipitables con ácido que muestran diferentes velocidades de sedimentación. Utilizando los procesos de seguimiento por radiomarcado, los picos pueden mostrar que tienen una relación precursor-producto cuando se siguen entidades de sedimentación lenta en los más rápidos con el tiempo. Los picos se refieren como A, B, C y partículas V siendo A la forma de precursor inicial encontrado cerca de la parte superior del gradiente y V es el producto de sedimentación más rápido. Como los previriones maduros, se mueven rápido en el gradiente y se vuelven resistentes al tratamiento con ADNasa 1. La composición de la proteína del núcleo de las partículas A es predominantemente los precursores no fragmentados, sólo están presentes cantidades traza de las proteínas del núcleo maduras, 4a, 4b, 25K y 23K. Sin embargo, ya que la velocidad de sedimentación de las partículas aumenta, la maduración proteolítica procede de modo que las partículas C estaban compuestas exclusivamente de proteínas del núcleo maduras. Conjuntamente, estos resultados indican que existen varias formas distintas y separables de los previriones VV, que los precursores de la proteína del núcleo VV están asociados a previsiones antes de la fragmentación y que la maduración de las proteínas del núcleo está ligada coordinadamente a la conversión de previriones no infecciosos a partículas virales infecciosas. Esto proporciona un gran apoyo a la hipótesis de que la maduración del precursor de la proteína del núcleo VV tiene una función morfogénica.

En otro conjunto de experimentos diseñados para monitorizar la localización intracelular e intraviral de las proteínas del núcleo VV durante la infección, se produjo una colección de antisueros policlonales mono-específicos que reconocen los precursores de proteínas del núcleo individuales y/o sus productos fragmentados. El uso de dichos sueros en los análisis de inmunofluorescencia de células infectadas por VV demostró que los precursores de las proteínas del núcleo VV no están distribuidos a través del citoplasma de células infectadas. Más bien, los precursores de las proteínas del núcleo se localizan casi exclusivamente en los "virosomos o fábricas de virus" en los que se ensambla la progenie de viriones. En las últimas etapas de la infección, la tinción puntual también fue evidente a través del citoplasma que se creía que eran partículas de virus individuales. Dicha hipótesis se confirmó por microscopía de inmunoelectrón. Los estudios IEM también demostraron que los precursores de las proteínas del núcleo VV estaban asociados con viriones inmaduros y que cuando los viriones avanzaban a lo largo del ciclo de maduración las proteínas del núcleo procesadas nuevamente permanecían asociadas con el núcleo condensado.

Los resultados de los experimentos presentados anteriormente indican que la forma precursora de las proteínas del núcleo VV es necesaria para la localización adecuada en el virosoma y el previrión ensamblado. Esto hace surgir la pregunta de qué característica de los precursores de la proteína del núcleo es responsable de dicho comportamiento, ya que no todas las proteínas presentes en la célula infectada por VV se empaquetan. Se puede proponer que es la estructura total de las proteínas del núcleo, los patrones de proteína con los que interactúa, o es la presencia de una señal de marcaje específica la que proporciona dicha propiedad.

Por lo menos en el caso de P4b y P25K, un candidato para la señal de marcado potencial es el N-terminal del péptido líder que se elimina por proteólisis durante el ensamblaje viral. Para ensayar esta hipótesis, se construyó un gen mutante de P25K en el que la secuencia que codifica para el líder (los 31 aminoácidos N-terminales) se delecionó. Se expresó la proteína ($\Delta 31$) P25K en el contexto de la expresión transitoria vía una célula infectada por VV. Dicha proteína, que puede ser funcionalmente equivalente a la proteína del núcleo 25K madura, no se empaquetó en los viriones.

Para determinar si todo el líder del precursor de la proteína del núcleo era necesario para proporcionar dicho fenotipo, se construyó un conjunto de delecciones en los 61 aminoácidos líder de la proteína P4b. La delección de los aminoácidos 15, 30 ó 44 no tuvo ningún efecto sobre el procesamiento de P4b, lo que indica que la información esencial estaba próxima al sitio de fragmentación. Lo que prueba que era la secuencia o la estructura del líder la que impartía dicha propiedad y se proporcionaba mediante la fusión de los 30 aminoácidos N-terminales de la timidina quinasa viral (TK), una proteína temprana soluble, a la proteína 25K de un modo que reconstituye el sitio AGA. Esta proteína de fusión TK:25K o no estaba empaquetada o no está procesada.

De modo interesante, los líderes de las proteínas del núcleo para ser funcionalmente intercambiables ya que se generaron dos mutantes de intercambio preparando las quimeras P4b líder: 25K y P25K líder: 4b. En ambos casos, las proteínas se pueden empaquetar y procesar. Este resultado está en contra de que toda la estructura terciaria de los precursores de la proteína del núcleo sea la localización principal determinante ya que las proteínas de fusión pueden seguramente interrumpir las características estructurales. En conjunto, estos resultados sugieren que los péptidos amino terminal de las proteínas del núcleo VV son bastante intercambiables y que los residuos inmediatamente próximos al sitio AGA parecen contribuir más directamente a la localización intracelular e intraviral correcta.

Ejemplo 6

Caracterización de las señales cis responsables de la fragmentación de P25K

Basados en los datos anteriores en la bibliografía de proteinasa viral, se intentaron varios enfoques diferentes para el desarrollo de un sistema de ensayo para estudiar el procesamiento proteolítico de las proteínas del núcleo VV. Estos incluyen: (i) ensayos de fragmentación *in vitro* mezclando precursores de proteína del núcleo VV aislados de células infectadas con mutantes VV sensibles a la temperatura deficientes en fragmentación junto con los extractos de células infectadas con VV de tipo salvaje o células no infectadas; (ii) mezcla de viriones VV solubilizados con precursores de proteína del núcleo VV preparados *in vivo* o *in vitro*; (iii) co-traducción del ARNm precursor de la proteína del núcleo con mezclas de ARNm celular y/o vírico en lisados de reticulocitos de conejo, y (iv) ensayos de expresión transitoria utilizando el sistema híbrido T7/VV (52) para expresar varios constructos de genes trazadores que contienen unos sitios de fragmentación de proteína del núcleo VV.

Sin excepción, no se observó fragmentación del sustrato ensayado con ninguno de estos sistemas. Esto conduce, en parte, a la hipótesis de trabajo que la maduración proteolítica de las proteínas del núcleo VV es contextual, ligada directamente al ensamblaje del virión. Las predicciones de dicha hipótesis eran que para la proteína VV fuera fragmentada en el grupo AGX debía ser sintetizada en las últimas etapas de la infección, envuelta en el virión ensamblado y asociada con el núcleo VV. Cualquier perturbación de la cinética de síntesis, el marcaje intracelular o la estructura de los precursores de la proteína del núcleo VV se espera que anule el procesamiento.

Al ensayar dicha hipótesis se requiere el desarrollo de un ensayo con el que examinar los factores cis y trans que median la maduración proteolítica de los precursores de la proteína del núcleo VV *in vivo*. Para conseguir este objetivo, hay que superar varias dificultades. Primero, los genes que codifican para los precursores de proteínas del núcleo VV demostraron ser esenciales para la replicación del virus. Los mutantes letales condicionales no estaban disponibles en estos locus, y tampoco estos locus eran susceptibles de una inactivación directa mediante las técnicas de inserción de genes conocida en la técnica. Segundo, las proteínas del núcleo VV son relativamente solubles y difíciles de manipular *in vitro*. Tercero, basándose en los primeros experimentos, parece que la fragmentación se produce sólo en el contexto de partículas de virión maduras. Cuarto, los precursores de la proteína del núcleo VV se expresan fuertemente en los últimos periodos de la infección haciendo difícil la detección de un precursor de la proteína del núcleo añadido exógenamente.

Para superar estos desafíos, se desarrolló un ensayo de *trans* procesamiento para seguir la maduración proteolítica de la proteína del núcleo VV mediante el marcado de un precursor de la proteína del núcleo P25 VV en el extremo C-terminal con un epítipo octapéptido, FLAG (55). El gen L4R se seleccionó como diana para dichos estudios porque es el más pequeño de los tres genes precursores de la proteína del núcleo principales, facilitando de este modo las manipulaciones genéticas y porque el producto del gen L4R, la proteína P25K, es relativamente soluble y susceptible a los análisis bioquímicos.

Al utilizar los ensayos de expresión transitoria en las células co-infectadas con VV, la proteólisis del producto del gen de fusión P25K:FLAG se puede monitorizar mediante inmunoblot y procedimientos de inmunoprecipitación utilizando un antisuero específico para el epítipo FLAG o la proteína 25K. *In vivo*, el precursor P25K:FLAG se fragmentó en productos más pequeños y las relaciones precursor- producto se establecieron mediante protocolos de etiquetado radiomarcado-seguimiento. La fragmentación *in vivo* del precursor P25K:FLAG se inhibió con rifampicina, insinuando que la reacción utilizaba la misma vía que los precursores de la proteína del núcleo VV auténtica. Además, el producto P25K:FLAG se encontró asociado con los viriones maduros se acuerdo con la hipótesis que la fragmentación se da concomitantemente con el ensamblaje del virión. Durante dichos experimentos, se identificó un intermedio de fragmentación potencial (P25K') en el que procesamiento se estaba produciendo en el sitio AGS situado entre los residuos 17-19 del líder P25K (Figura 9).

La sustitución mutagénica dirigida de uno o ambos sitios tanto el principal AGA (posiciones 31-33) o el intermedio AGS (posiciones 17-19) dentro del precursor P25K:FLAG con el tripéptido IDI de fragmentación bloqueada en los sitios mutados, que indica que ambos sitios se utilizaron y reconocieron independientemente *in vivo* y que la proteólisis se estaba dando *bona fide*. La velocidad de procesamiento del precursor P25K:FLAG es aproximadamente la mitad que la del precursor P25K auténtico. Esta observación se explicó en parte utilizando inmunofluorescencia para demostrar que la proteína P25K:FLAG fue dirigida menos eficazmente hacia el virosoma. Debido a que el procesamiento de la proteína del núcleo VV parece que se da durante el ensamblaje del virión, es probable que sólo la proteína P25K:FLAG que se une al virosoma entre en la vía de procesamiento.

El defecto en la dirección puede ser debido a la estructura modificada del precursor P25K:FLAG o al gen de fusión que se expresa desde el plásmido de forma opuesta al gen genómico que se replica dentro del virosoma mismo. En cualquier caso, estos resultados proporcionan una evidencia bioquímica y genética para establecer las ventajas del ensayo de procesamiento trans y proporciona una evidencia directa que el grupo AGX desempeña un papel directo en la selección del sitio de fragmentación.

A pesar de que la importancia principal del grupo AGX en el procesamiento viene dada por el fallo de fragmentación de los mutantes IDI, deben existir otros determinantes adicionales de la selección del sitio de fragmentación. No todas las proteínas que contienen un grupo AGX se fragmentan proteolíticamente. Un ejemplo tal es el sitio AGN

de P4a que no se corta, a pasar del hecho que otros dos sitios más debajo de los sitios AGX en el mismo precursor se cortan. De forma similar, tal como se ha descrito anteriormente, la ADN polimerasa VV, la proteína de la envuelta 37K biotinilada y las proteínas HR presentan todos unos grupos AGA que no se fragmentan. Por lo tanto, el grupo AGX parece ser esencial pero no es suficiente para definir un sitio de fragmentación específico. Los sustratos determinantes adicionales dentro de los precursores pueden contribuir a la selección del sitio de fragmentación. A modo de enfoque para identificar algunos de estos otros determinantes se ha empleado el ensayo de procesamiento *trans* descrito anteriormente junto con los procedimientos de mutagénesis dirigida. Específicamente, utilizando el gen P25K:FLAG como el molde, se introdujeron mutaciones de sustitución, inserción y delección en el sitio AGA y alrededor del mismo. El fenotipo de cada mutante individual se analizó por expresión transitoria y procedimientos de inmunoblot.

En total, se construyeron más de 50 mutantes P25K:FLAG diferentes. Se comprobaron los genotipos de los mutantes por secuenciación y se ensayaron sus fenotipos. Los resultados obtenidos se resumen a continuación, utilizando la nomenclatura de Schecter y Berger (56) en la que las posiciones de los residuos amino- y carboxilo terminales se indican como P1, P2, etc., y P1', P2', etc., respectivamente. La ocupación del residuo de la posición P1' fue extremadamente permisiva con sólo una sustitución de una prolina que bloquea la fragmentación. Por el contrario, la ocupación permisiva de P1 (serina o alanina) y P2 (cisteína, serina o asparagina) fue extremadamente restrictiva. Los análisis de los mutantes dobles P1/P2 apoya esta conclusión y sugiere niveles adicionales de restricción combinatoria. La inserción o delección de secuencias inmediatamente adyacentes (amino- o carboxi- terminales) al grupo AGA anularon completamente la fragmentación, lo que sugiere la presencia de elementos estructurales adicionales. La mutación de los residuos prolina o básicos conservados en dichas regiones no tuvo efecto en la fragmentación mientras que parece que la presencia del residuo hidrofóbico en el sitio P4 era necesaria.

Ejemplo 7

Candidatos para vCPP- G1L e I7L

a) *G1L*- Tal como se ha mencionado anteriormente, se intentaron numerosos enfoques diferentes para reconstituir la proteólisis de la proteína del núcleo VV *in vitro*, y todos ellos fueron infructuosos debido a los requerimientos contextuales de esta reacción. Por lo tanto, con el fin de identificar la proteinasa que es responsable de la fragmentación de los precursores de la proteína del núcleo VV fue necesario implementar un proceso de mapeado *in vivo*. Para alcanzar este objetivo, se desarrolló un ensayo de procesamiento *trans* controlado transcripcionalmente.

La transcripción de los genes VV es controlada estrechamente por el mecanismo de cascada reguladora. Todos los enzimas requeridos para la síntesis y la modificación del ARNm temprano están empaquetados en el virión infeccioso. Tras la entrada en la célula, la expresión temprana de genes inicia la replicación del ADN vírico que conduce a la expresión sucesiva de los genes víricos intermedios y tardíos. Durante la infección vírica normal, se ha demostrado que el ADN vírico replicado de nuevo, desnudo sirve como molde para la expresión de los factores de transcripción de los genes tardíos (A1L, A2L y G8R) así como los genes tardíos por sí mismos. Se puede rescatar la transcripción de un promotor tardío aportado exógenamente en las células infectadas, cuya replicación del ADN se ha bloqueado por AraC, por co-transfección de las copias de plásmidos de los factores de transcripción de genes tardíos. Esto proporciona las bases para el desarrollo del ensayo de procesamiento *trans* controlado transcripcionalmente que utiliza una copia del plásmido ORF P25K:FLAG como gen trazador.

Las células se infectaron con VV en presencia de AraC para bloquear la expresión del gen tardío del genoma vírico. La transfección del ADN VV de longitud total en las células infectadas por VV tratadas con AraC da como resultado la expresión y fragmentación de los precursores de las proteínas del núcleo VV, lo que indica que ambos procesos (síntesis y procesamiento) se pueden dar en estas condiciones y que la proteinasa era probablemente el producto del gen tardío VV. Con el fin de separar los sustratos de la expresión y de la proteólisis, las células infectadas por VV tratadas con AraC fueron transfectadas simultáneamente con las copias de plásmido siguientes: (i) factores de transcripción de genes tardíos A1L, A2L y G8R; (ii) sustrato ensayo; (iii) fuente potencial de proteinasa. Como sustrato ensayo, se utilizó el gen de fusión P25K:FLAG. La fuente inicial de proteinasa fue un conjunto de 6 clones de cósmidos solapados del genoma VV. Individualmente, los cósmidos 3 y 21 fueron capaces de rescatar el procesamiento de la proteína P25K:FLAG en el sitio AGS que se encuentra en las posiciones 17-19 en el N-terminal líder del precursor. Ya que los dos cósmidos se solapan en la región HindIII G, se ensayó una copia clonada del fragmento de la región HindIII G de VV y también se encontró que fragmenta directamente el sustrato (Figura 10).

Anteriormente, se han utilizado los análisis por ordenador para buscar las secuencias de aminoácidos previstas de todos los ORF en la secuencia genómica de VV (Copenhague) para estudiar la presencia de grupos que puedan sugerir una actividad proteinasa. El único "éxito" conseguido fue dentro del ORF G1L, que contenía el grupo secuencia HX-XEH, que es una inversión directa de la secuencia consenso del sitio activo presente en las metaloproteinasas como termolisina. A pesar de que el grupo presente estaba hacia atrás y no existen ejemplos conocidos de metaloproteinasas codificadas por enzimas, no obstante se clonó el ORF G1L, se expresó *in vitro* y se ensayó su capacidad para fragmentar precursores de la proteína del núcleo VV, sin éxito.

Una subclase de metaloproteinasas, tipificada como enzimas que degradan la insulina, contiene un grupo HXXEH invertido (Figura 11). Además, se pudo apreciar la naturaleza contextual de la reacción de procesamiento de la proteína del núcleo VV. De este modo, una vez se supo que el fragmento HindIII G de VV parecía que contenía el gen para la

proteínasa de la proteína del núcleo, se ensayó el gen G1L clonado en el ensayo de procesamiento *trans* controlado transcripcionalmente y se descubrió que codifica la proteínasa responsable. Los experimentos de genética molecular confirmaron que el precursor P25K:FLAG se había fragmentado en el grupo AGS y que los residuos conservados en el grupo HXXEH del ORF G1L eran necesarios para la actividad del enzima. Estos resultados apoyan la conclusión que la proteína G1L VV es un metaloproteínasa y la implican como responsable de la proteólisis morfológica de las proteínas del núcleo VV.

b) I7L- Aunque existen varias evidencias que implican la proteína G1L como el vCPP, recientemente se ha identificado una segunda proteínasa candidata, el producto del gen del marco de lectura abierto I7L. La proteína se identificó en base a la homología con la proteínasa similar a la ubiquitina en la levadura. Se preveía que era una proteínasa cisteína y eran evidentes dos sitios activos potenciales. Como G1L, I7L está altamente conservada entre los ortoox-virus. Se revela que I7L codifica una proteína de 47 KDa que se expresan en las etapas tardías post-infección. El uso del antisuero monoespecífico α -I7L demostró que la proteína está asociada con factorías de virus, partículas víricas inmaduras e IMV, en las que está localizada exclusivamente en el núcleo.

Se aisló un mutante letal condiciones en el gen I7L. A la temperatura no permisiva, se sintetizaron los precursores de las proteínas del núcleo P4a, P4b y P25K pero no se procesaron. Además, el ensamblaje viral se paró entre la formación de partículas virales inmaduras y la conversión en una partícula IMV infecciosa. A la temperatura no permisiva, no se produjo progenie infecciosa. Todas estas características son las previstas para vCPP, lo que proporciona más evidencias de la importancia del producto del gen I7L.

Tal como se ha presentado anteriormente, basado en la evidencia válida, de entre los 263 productos de genes codificados por VV, los dos candidatos líder para la VCPP son las proteínas codificadas por los genes G1L y I7L. Basado en la información de la secuencia, se prevé que G1L sea una metaloproteínasa con un grupo HXXEH invertido, mientras que se prevé que I7L sea una proteínasa cisteína. Un enfoque inicial para determinar si algunas de estas proteínas putativas puede ser la vCPP, resultaba interesante ensayar una colección de inhibidores de proteínasa específicos de clase para determinar su capacidad para inhibir la replicación VV en células en cultivo tisular.

Para este fin, las células de cultivo tisular BSC₄₀ se infectaron por VV en presencia de varias concentraciones de inhibidores de proteínasa. Se realizaron esfuerzos para utilizar unas concentraciones de fármacos que tuvieran unos efectos mínimos en las células del cultivo tisular, como se juzgó por el aspecto morfológico y la incorporación de timidita. Los inhibidores ensayados incluían: 1,10-fenantrolina, un inhibidor de la metaloproteínasa, y es un isómero no quelante, 1,7-fenantrolina, iodoacetamida, un inhibidor cisteína y una pepstatina A, un inhibidor proteínasa aspártico. Desafortunadamente, no se pudo identificar ningún inhibidor proteínasa serina, que no fuera sumamente tóxico para la célula huésped, quizás no se un resultado sorprendente dada la ubicuidad de este tipo de proteínasa en las células de mamíferos. De modo interesante, la replicación de VV se bloqueó completamente con iodoacetamida 10 μ M o 1,10-fenantrolina 1 μ M, mientras que la 1,7-fenantrolina o la pepstadina A no tuvo ningún efecto. Estos resultados son coherentes con que tanto la metaloproteínasa como la proteínasa cisteína desempeñan un papel esencial en el ciclo replicativo viral. De este modo tanto G1L como I7L siguen siendo unos candidatos viables para la vCPP.

Con el fin de determinar si la proteína G1L y/o la proteína I7L es la vCPP, se utilizaron dos enfoques complementarios: (1) análisis fenotípico de la replicación VV en presencia de inhibidores de la proteínasa; y (2) la construcción de unos mutantes letales condiciones específicos del gen.

Los análisis fenotípicos aprovechan la observación de que tanto la iodoacetamida como la 1,10-fenantrolina son inhibidores potentes de la replicación de VV (Figura 12), lo que sugiere el requerimiento obligatorio para una proteínasa cisteína y una metaloproteínasa, respectivamente, durante el ciclo vital del virus. La inhibición de dicha reacción se manifiesta por un fenotipo en el que la transcripción viral temprana y la síntesis de la proteína se dan normalmente, la síntesis del ADN vírico y la expresión del gen intermedio se dará, y se fabricarán las proteínas virales tardías (incluido los precursores de proteína del núcleo), seguido por el ensamblaje de las partículas víricas inmaduras, en ausencia de fragmentación, no se forman progenie infecciosa madura. Por consiguiente, las monocapas de las células BSC₄₀ infectadas por VV a una multiplicidad de 10 unidades formadoras de colonias por célula en presencia de iodoacetamida 10 μ M o 1,10-fenantrolina 1 μ M se someten a varios tipos de análisis:

- a) Etiquetado por radiomarcado con ³⁵S-metionina a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas post-infección. Los extractos celulares infectados (+/- tratamiento con fármaco) y los controles se preparan a los tiempos indicados y se analizan por SDS:PAGE y/o inmunoblot con un cóctel de antisuero anti-proteína del núcleo (4a, 4b, 25K). Los análisis de la expresión de proteínas revelan si se expresan las proteínas tempranas, si se expresan las proteínas tardías (y por influencia si se ha sintetizado el ADN vírico).
- b) La síntesis del ADN se mide directamente por radiomarcado con ³H timidina durante 10 minutos a intervalos de una hora post infección, en la situación control, la síntesis del ADN vírico se inicia a las ~1-5 horas, los picos están entre las 3-4 horas, y después decae. Cualquier desviación de la inducción, un pico o unas fases de desactivación de la curva indica una actividad inhibidora en una etapa anterior a la maduración de la proteína del núcleo.
- c) El radiomarcado se utiliza para observar directamente el procesamiento de la proteína del núcleo. Las células infectadas (+/- fármaco) se marcan durante 30 minutos con ³⁵S-metionina a las 4 horas post infección.

ES 2 298 523 T3

El medio marcado se elimina y se sustituye por un medio que contiene metionina fría 100X y se incuba durante 1, 2, 3 y 4 horas después del marcaje previo a la extracción. Los extractos celulares se preparan a los tiempos indicados y se analizan con SDS:PAGE y/o inmunoblot con un cóctel de antiseros anti-proteína del núcleo (4a, 4b, 25K) El análisis del patrón de expresión de la proteína del núcleo indica directamente la presencia o ausencia de actividad vCPP.

d) La producción de progenie infecciosa se monitoriza por un ensayo en placa. Ambos inhibidores evitan el crecimiento del virus.

Ya que los resultados de los análisis anteriores son coherentes con la inhibición de vCPP, se preparan las células infectadas (+/- fármaco) para microscopía electrónica de transmisión a las 8 horas post-infección. Se cortan en secciones finas, se tiñen, se visualizan por TEM y se fotografían. En ausencia de maduración de la proteína del núcleo, las partículas inmaduras se acumulan con poca o ninguna condensación de los núcleos víricos como en la Figura 13.

Los resultados de estos experimentos confirman que G1L e I7L son candidatos a vCPP, pero no identifican directamente ningún producto del gen como la proteinasa. Esto es porque una variedad de fármacos o mutaciones cuyas diana no es claramente vCPP manifiestan sus fenotipos de un modo similar al anterior. Por ejemplo α -amanitina y rifampicina, que inhiben los productos de gen N2L y D13 respectivamente, ambas presentan un fenotipo tardío abortivo. Este se debe probablemente a un requerimiento contextual de la proteólisis de las proteínas del núcleo. Cualquier cosa que interfiera con el ensamblaje correcto del virión inmaduro, es probable que inhiba la maduración de la proteína del núcleo.

Como enfoque más directo para dirigir si la proteína G1L o la proteína I7L son la vCPP, se pueden utilizar las técnicas de mutantes letales condicionales. Se construyen los plásmidos recombinantes que contienen individualmente las regiones de ADN VV (cepa VVR) que contiene el gen G1L o I7L, completo con su promotor nativo y suficientes regiones flanqueantes para catalizar la recombinación homóloga en el genoma vírico (>500 pb). Estos plásmidos contienen también un segundo casete del gen con xantina-guanina fosforibosiltransferasa (*gpt*) bajo el control de un elemento transcripcional VV independiente, el promotor 7,5K. Al utilizar los procedimientos de mutagénesis insercional mediada por PCR, el operador *lac* (*lacO*) se inserta entre los sitios de promotor/inicio transcripcional y los marcos de lectura abiertos de los genes G1L e I7L.

La autenticidad estructural de estos plásmidos de recombinación dual se verifica mediante análisis enzimático de restricción, amplificación por PCR y secuenciación de ADN de las regiones unidas. Los plásmidos de recombinación se transfieren entonces en las células BSC₄₀ que se han infectado previamente con *vLacI*, una cepa recombinante de VV que expresa constitutivamente el represor *lac*. El virus recombinante se selecciona utilizando ácido micofenólico (MPA, para bloquear la biosíntesis *de novo* de purinas), hipoxantina (para realizar la vía salvaje) e isopropiltiogalactopiranosido (IPTG, para inducir la expresión del gen diana). Los stock de virus se pasan varias veces en estas condiciones, y después muchas más veces en ausencia de MPA, pero en presencia de IPTG. Bajo estas condiciones el evento de recombinación inicial es un cruce único, pero en ausencia de la selección por MPA el casete *gpt* forma un bucle sobre sí mismo y el gen diana *lacO* (G1L o I7L) se integra establemente como un doble cruce recíproco, sustituyendo el gen nativo. Bajo estas condiciones, la expresión de G1L y/o I7L está bajo el control del operón *lac*. Entonces, la expresión del gen de interés se puede regular mediante la presencia o ausencia de IPTG en el medio de cultivo.

Este enfoque se ha utilizado anteriormente con éxito para elucidar la función de varios genes tardíos incluyendo F18R, D13L, G8R, L4R y A5L. En el laboratorio se ha utilizado este procedimiento para estudiar la función de L1R, una miristilproteína VV tardía, durante el ensamblaje y la morfogénesis del virión. En la mayoría de los casos, el fenotipo reprimido se puede revertir mediante la adición de IPTG a los tiempos post infección indicados. En gran medida, la prueba final de la función del gen codificado se puede proporcionar utilizando un rescate del marcador de la replicación del virus con una copia clonada del gen diana, en presencia de IPTG.

Estos enfoques han identificado G1L e I7L como candidatos para la vCPP. Sin embargo se debe destacar que la identificación de otras proteinasas VV esenciales no carece de mérito o importancia. Basado en los resultados con otros sistemas víricos es posible anticipar, dada la capacidad mutagénica de la mayoría de virus, un gran despliegue de los inhibidores de proteinasa específicos frente a vCPP podría eventualmente dar como resultado la aparición de mutantes resistentes a fármacos. Por consiguiente, disponer de dianas de proteinasa adicionales de las clases diferentes que participan en los diferentes puntos del ciclo vital del virus proporcionará en el futuro unas dianas de segundo nivel, si es necesario.

Ejemplo 8

Validación de vCPP como diana antiviral

La confirmación de que el gen VV identificado anteriormente es responsable directamente de la actividad vCPP y la validación de este producto del gen como una diana antiviral adecuada, se produce en dos etapas. La validación provisional se proporciona mediante el análisis fenotípico de los mutantes letales condicionales. La validación concluyente de las proteínas G1L o I7L como la vCPP requiere la expresión y purificación del producto del gen individual y

el desarrollo de un ensayo de fragmentación adecuado para demostrar *in vitro* la actividad enzimática esperada (ver a continuación).

La validación fenotípica de los genes G1L y I7L como las dianas para el desarrollo de un fármaco antiviral incluye los experimentos siguientes:

- a) Cinética de expresión de la proteína y la localización intracelular. Utilización de unos antisueros mono-específicos generados en esta memoria, se analizaron los extractos de células infectadas con VV a diferentes tiempos post-infección para determinar cuando se expresan las proteínas G1L y/o I7L. De forma similar, se emplean unos protocolos de radiomarcado-seguimiento para determinar si las proteínas son estables o hábiles. La localización intracelular se determina por inmunofluorescencia y microscopía inmunoelectrónica. La vCPP es una proteína viral tardía que se co-localiza con los precursores de la proteína del núcleo VV y se encuentra en los viriones inmaduros. La información acerca de la localización y la estabilidad relativa de vCPP tendrán gran valor en los esfuerzos posteriores para expresar y purificar el enzima.
- b) Defectos de replicación de *vlacO/G1L* y *vlacO/I7L*. Las células BSC₄₀ se infectaron con los recombinantes de *vlacO/G1L* y *vlacO/I7L* en presencia de IPTG. Las células infectadas se analizaron para la producción de virus infecciosos, la síntesis de la proteína viral, la síntesis de ADN viral, el estado del ensamblaje del virión y la fragmentación de la proteína del núcleo tal como se ha descrito anteriormente. El gen que codifica para vCPP conduce a un fenotipo abortivo tardío en ausencia de IPTG. Si el fenotipo defectivo se puede revertir a diferentes tiempos post-infección se puede evaluar mediante la adición de IPTG. Basado en la reversibilidad de la inhibición mediada por rifampicina en el ensamblaje viral y la maduración de la proteína del núcleo, esta proporciona un medio para la sincronización de los análisis *in vivo* de vCPP.
- c) Rescate del marcador de los recombinantes de *vlacO/G1L* y *vlacO/I7L*. Para probar directamente que los productos de los genes G1L o I7L son responsables del fenotipo observado, se analiza la capacidad de rescatar la replicación vírica con un gen de tipo salvaje. Las células BSC₄₀ se infectan con *vlacO/G1L* y *vlacO/I7L* en ausencia de IPTG, después se transfectan o bien con unos plásmidos control o bien con unos plásmidos que contienen los genes G1L o I7L colindantes a sus promotores nativos. Entonces se ensayan los extractos de las células transfectadas para los viriones maduros mediante el ensayo de placa infecciosa en presencia de IPTG.

Conjuntamente los resultados de estos experimentos revelan que los productos de los genes G1L y I7L presentan los atributos esperados de vCPP y que la ausencia de cualquier actividad proporciona el fenotipo abortivo tardío esperado.

Ejemplo 9

Caracterización del virus *Vaccinia* I7L proteinasa de las proteínas del núcleo

El producto del gen del marco de apertura abierto I7L se identificó originalmente como una proteinasa putativa debido a su homología con la proteinasa parecida a la ubiquitina y ha demostrado ser una de las proteínas responsables de la fragmentación de las proteínas del núcleo del virus *Vaccinia*. Mientras existe una cantidad relativamente grande de información sobre las secuencias y características de la fragmentación de las proteínas del núcleo, poco se sabe acerca del enzima que lleva a cabo dichas reacciones. El objetivo de este experimento es mostrar que I7L es capaz de fragmentar cada una de las proteínas y que la mutagénesis de ya sea la tríada catalítica putativa de I7L o los sitios Ala-Gly-Xaa en las proteínas precursoras suprime esta actividad.

Materiales y métodos

Células y virus- Las células BSC₄₀ se hicieron crecer en un medio mínimo esencial Eagle que contiene 5% de suero bovino fetal (FCS), glutamina 2 mM y gentamicina sulfato (15 g/ml). Se preparó el virus *Vaccinia* ts 16 purificado tal como se ha descrito anteriormente. Las cepas de *Escherichia coli* se hicieron crecer en caldo de cultivo Luria-Bertani o en medio Luria-Bertano que contiene 1,5% de agar y ampicilina a 50 (g/ml)

Plasmados y mutagénesis dirigida- Ver la Tabla 1 para la descripción de todos los plásmidos, oligos y cepas utilizados. Los genes del virus *Vaccinia* P4a y P4b se amplificaron de la reserva VWestern de cepas de ADN genómico con los cebadores CB40, CB41 y CB42, CB43 respectivamente y se clonaron en pRB21 con los flaqueadores NcoI y NheI y PstI y HindIII que conducen a pP4a y pP4b. La mutagénesis dirigida del gen P4a se llevó a cabo utilizando un kit de mutagénesis dirigida QuickChange® (Stratagene, Cedar Creek, TX) según las instrucciones del fabricante y utilizando los cebadores CB46, CB47, CB48 y CB49 para mutar los sitios AGS (aa#613-615) y AGT (aa#696-698) respectivamente a los residuos IDI utilizando p4a como molde. Se utilizó el mismo procedimiento para la mutagénesis dirigida del gen P4b utilizando los cebadores CB44 y CB45 para mutar AGA (aa# 60-62) IDI utilizando pP4b como molde. La mutagénesis dirigida del gen I7L se realizó utilizando el mismo kit con los mismos cebadores CB62 a CB73 y el plásmido pI7L como molde para mutar individualmente los residuos VV (aa#242), D (aa#248), D (aa#258), Q (aa#322), C (aa#328) y G (aa#329) a A.

TABLA 1

Plásmidos y oligos utilizados

	Plásmido u oligo	Descripción	Fuente
	<i>Plásmidos</i>		
	pCR2.1	Km ^r , Amp ^r	Invitrogen
	pRB21	puc derivado con flancos F13L, MCS hacia abajo del promotor sintético temprano/tardío	Blasco
10	pP4a	Plásmido pRB21 con P4a insertado entre los sitios NcoI y NheI	Este estudio
	P4aID613	pP4a con AGS (aa#613-615) modificado en IDI	Este estudio
	P4aID696	pP4a con AGT (aa#696-698) modificado en IDI	Este estudio
	pP4b	Plásmido pRB21 con P4b insertado entre los sitios PstI y HindIII	Este estudio
15	pP4bIDI	pP4b con AGA (aa#60- 62) modificado en IDI	Este estudio
	pP25K	Plásmido pRB21 con P25K con un epitopo FLAG en el C-terminal clonado en MCS	Byrd
	pP25K:IDI	Plásmido p25K con AGS (aa# 17- 19) mutado a IDI	Byrd
	pP25K:RPD	Plásmido p25K con AGA (aa# 31- 33) mutado en RDP	Byrd
20	pl7L	pRB21 plásmido con l7L de longitud total	Byrd
	pH241A	pl7L con H (aa# 241) mutado a alanina	Byrd
	pW242A	pl7L con VV (aa# 242) mutado a alanina	Este estudio
	pD248A	pl7L con D (aa# 248) mutado a alanina	Este estudio
	pD258A	pl7L con D (aa# 258) mutado a alanina	Este estudio
25	pQ322A	pl7L con Q (aa# 322) mutado a alanina	Este estudio
	pC328A	pl7L con C (aa# 328) mutado a alanina	Este estudio
	pG329A	pl7L con G (aa# 329) mutado a alanina	Este estudio
	pl7L-T	pl7L truncado en aa# 228 para eliminar la región N-terminal de la proteína	Este estudio
	<i>Oligonucleótidos</i>		
30	CB40	5'-CTAGCTAGCATGATGCCTATTAAGTCAATAGTTACTCTTG-3' 5'-CATGCCATGGCTACTTGTGTCGTCATCGTCTTTATAATCTTCAT	Este estudio
	CB41	CATCAAAAGAG-3'	Este estudio
	CB42	5'-AAACTGCAGATGGAAGCCGTGGTCAATAGCGATG-3' 5'-CCCAAGCTTCTACTTGTGTCGTCATCGTCTTTATAATCAAATAGT	Este estudio
	CB43	TCTGTAATATGTCTAGC-3'	Este estudio
35	CB44	5'-GATGACTTTTATATCCATAGACATCAGAAATCAACGTACC-3'	Este estudio
	CB45	5'-GGTACGTTGATTTCTGATGTCTATGGATATAAAGTCATC-3'	Este estudio
	CB46	5'-CCTAGATATTTCTATATAGACATTCCCGAAGGAGAGGAA-3'	Este estudio
	CB47	5'-TTCCTCTCCTTCGGGAATGTCTATATAGAAATATCTAGG-3'	Este estudio
40	CB48	5'-AGGATTATTACAATTATTGATATCTGTACCGTATCCATA-3'	Este estudio
	CB49	5'-TATGGATACGGTACAGATATCAATATTTGTAATAATCCT-3'	Este estudio
	CB39	5'-AAACTGCAGATGCATCATCATCATACCTCTAGATTT GTAATG-3'	Este estudio
45	CB52	5'-CCCAAGCTTCTACTTGTGTCGTCATCGTCTTTATAATCTTCATCG TCGTCTAC-3'	Este estudio
	CB62	5'-TGTTATTTGTCTCATGCGAAATGTGTAATTTAT-3'	Este estudio
	CB63	5'-ATAAATTACACATTTTCGCATGAGACAAATAACA-3'	Este estudio
	CB64	5'-GGAAATGTGTAATTTATGCCAAAAACAATGTTTAG-3'	Este estudio
	CB65	5'-CTAAACATTGTTTTTGGCATAAATTACACATTTCC-3'	Este estudio
50	CB66	5'- GTATCCTTTTATGCCTCCGGAGGCAAT-3'	Este estudio
	CB67	5'- ATTGCCTCCGGAGGCATAAAAGGATAC-3'	Este estudio
	CB68	5'- GTGGAAGTTAATGCGCTGTTGGAATCT-3'	Este estudio
	CB69	5'- AGATTCCAACAGCGCATTAACTTCCAC-3'	Este estudio
	CB70	5'- CTGTTGGAATCTGAAGCCGGGATGTTATTAGT-3'	Este estudio
55	CB71	5'- ACTAATAAACATCCCGGCTTCAGATTCCAACAG-3'	Este estudio
	CB72	5'- TTGGAATCTGAATGTGCAATGTTTATTAGTTTG-3'	Este estudio
	CB73	5'- CAAACTAATAAACATTGCACATTTCAGATTCCAA-3'	Este estudio
	<i>Línea celular</i>		
60	BSC ₄₀	Células de riñón de mono verde africano adaptadas el crecimiento a una temperatura de 40°C	
	<i>Virus</i>		
	VV WR	Cepa de VWestern reserve del virus <i>Vaccinia</i>	
	Ts 16	Virus <i>Vaccinia</i> sensible a la temperatura con una mutación en el orf I7L	
	<i>E. coli</i>		
65	INVαF'	F' endA1 recA1 hsdR17 (r _k , m _k ⁺) supE44 thi-1 gyrA96relA1O80 LacZAM15 A (LacZYA-argF)U169	

Experimentos de co-expresión. Las monocapas confluentes de las células BSC₄₀ en placas de 6 pocillos se infectaron con ts 16 VV a una multiplicidad de infección de 5 unidades formadoras de colonias por célula y se transfectaron con 10 µg del plásmido de ADN utilizando DMRIE-C (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Las células se extrajeron a las 24 h post-infección por pipeteado hacia arriba y abajo desde la superficie. El extracto

5 crudo se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos, se aspiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 80 µl de 1xPBS. Éste congeló-descongeló tres veces y después se centrifugó a 2.500 rpm durante 3 minutos hasta los residuos de sedimento celular. La fracción de sobrenadante se analizó por VWestern Blot.

Análisis por VWestern Blot - 10 µl de extracto celular completo obtenidos anteriormente se hicieron correr en

10 unos geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a membranas PVDF (Pall, AnnArbor, MI). Las membranas se incubaron con una dilución 1:1.000 antisueros anti-FLAG (Stratagene, Cedar Creek, TX) y después con una dilución 1:2.000 de anticuerpos AP cabra anti-ratón (Bio-Rad, Hercules, CA). Las proteínas se detectaron utilizando el sistema de desarrollo AP (Bio-Rad Hercules, CA) según las instrucciones del fabricante.

Experimentos de rescate de Ts 16 - Las monocapas confluentes de las células BSC₄₀ en placas de 100 mm se infectaron con ts 16 a una multiplicidad de infección de 3 y se transfectaron utilizando o bien pI7L, pH241A, pW242A, pD248A, pD258A, pQ322A, pC328A, pG329A o pI7L-T. Para los controles se disponen de células transfectadas con ts 16 sólo y células transfectadas con el virus *vaccinia* reserva VWestern. Se incuban a una temperatura de 40°C durante 24 horas. Las células se extrajeron, centrifugaron y los pellets se resuspendieron en 1 ml de PBS, se congelaron-descongelaron 3 veces y después se titularon para determinar el rescate de la replicación del virus.

20

Resultados

Actividad de procesamiento de la proteína del núcleo de I7L - Para determinar si I7L es responsable de la fragmentación de cada proteína del núcleo, como ya se utilizó en el ensayo de procesamiento *trans in vivo* en el que las células eran infectadas con ts 16 a una temperatura no permisiva y se co-transfectaron con un plásmido de sustrato y enzima. Ambas proteínas de sustrato y la proteasa I7L se expresan constitutivamente a partir del plásmido con un promotor temprano-tardío sintético. Cada proteína del núcleo está diseñada con un epítopo FLAG en el C-terminal para la detección por VWestern Blot. La Figura 16 es un mapa de las 3 proteínas del núcleo mayores P4a, P4b y P25

30 que son productos de los marcos de lectura abiertos A10L, A3L y L4R respectivamente, con los sitios de fragmentación determinados anteriormente indicados en ellos. Estos sitios de fragmentación se han mapeado todos para un grupo AGX. P4a es el precursor de proteína más grande con un peso molecular de 97 kDa y contiene tanto los sitios de fragmentación AGS como AGT en la región C-terminal de la proteína. P4b es una poliproteína de 67 kDa con un sitio AGA N-terminal, y P25K es una poliproteína de 28 kDa con ambos sitios de fragmentación AGS y AGA en la

35 región N-terminal de la proteína.

La fragmentación de P25K por I7L se había demostrado previamente, pero en este caso se demuestra que es capaz de dirigir la fragmentación de otros precursores de la proteína del núcleo. La Figura 17 indica que I7L fragmenta P4b de su forma precursora a la forma madura procesada (carril 3) pero que entonces el residuo histidina (un miembro de la tríada catalítica putativa) de I7L es mutada a una alanina, esta fragmentación no se observa más (carril 4). Los carriles 2 y 5 son controles que muestran P4b y P4bIDI expresados solos. El carril 1 muestra las células infectadas que indican que no existe reactividad cruzada. Cuando el sitio AGA de P4b es mutado a los residuos IDI, no se observa fragmentación por I7L (carril 6). El carril 7 es un control final que muestra que con el mutante P4b y el mutante I7L no se observan productos de fragmentación que indican que otras proteasas en el virus o las células no causan las

45 reacciones de fragmentación.

Este experimento se repitió con la poliproteína P4a tal como se muestra en la Figura 18. Cuando P4a se expresa sólo (carril 3) corre según su tamaño natural de 97 kDa pero cuando I7L se transfecta en P4a, se observan dos productos de fragmentación (carril 4) que indican que se está produciendo una fragmentación tanto en el sitio AGS como en el

50 AGT. La mutación de I7L anula esta fragmentación (carril 5). Cuando el sitio AGS de P4a es mutado a IDI y se co-transfecta con I7L, sólo se observa una banda de aproximadamente 21 kDa que indica que hay fragmentación sólo en el sitio AGT (carril 10). Un resultado similar se obtiene cuando el sitio AGT es mutado a IDI (carril 7) en el que se observa una banda débil de 30 kDa que indica que la fragmentación está bloqueada en el sitio IDI pero todavía se da en menor medida en el sitio AGS, que indica que la actividad catalítica de I7L es necesaria para que se de la fragmentación así como la presencia de los sitios de fragmentación auténticos.

55

Caracterización de I7L - La Figura 19 muestra una zona de hidrofobicidad prevista de la proteína I7L utilizando el programa Kyte-Doolittle. Las posiciones de los residuos de la tríada catalítica putativa están indicadas así como la mutación que se ha introducido para inactivar I7L. También se muestra la posición de la mutación ts 16 en la que se ha cambiado una prolina por una leucina. Los perfiles de hidrofobicidad que se muestran más abajo son los enzimas de la viruela, la viruela del camello y la viruela del mono con las posiciones de varianza desde VV I7L indicadas con barras que muestran que estos enzimas son altamente homólogos con VV I7L. Con el fin de determinar si el dominio N-terminal de la proteína es necesario para el procesamiento proteolítico, se creó una I7L trunca con el tamaño relativo indicado a la longitud total de I7L. Existe un dominio del núcleo catalítico conservado entre VV I7L, la proteasa ASFV, la proteasa adenovirus y la proteasa *Saccharomyces cerevisiae* con muchos aminoácidos altamente conservados. Esto se indica en la parte inferior de la Figura 19 con unas flechas que apuntan a los aminoácidos conservados.

65

Para determinar cuál de estos aminoácidos conservados es necesario para la actividad catalítica de I7L, se realizó una mutagénesis dirigida en cada uno para mutar el residuo de interés a alanina. Se realizaron unos ensayos de expresión transitoria para analizar la actividad de las proteínas mutantes en cada una de las posiciones de los precursores de la proteína del núcleo. Los western blot se realizaron utilizando unos sueros anti-I7L para probar la expresión del enzima así como los antisueros monoclonales FLAG para comprobar el procesamiento de las proteínas precursoras. Cada uno de los enzimas mutantes de I7L se expresó igual de bien. La Figura 20 indica que I7L de longitud total es capaz de fragmentar cada proteína precursora pero cuando uno de H#241, W#242, D#248, Q#322, C#328 o G#329 se muta a alanina, se pierde esta fragmentación. El único mutante de I7L que todavía era capaz de fragmentar era cuando D#258 se mutaba a una alanina que indica que puede que éste no sea un miembro de la tríada catalítica. La co-transfección con pD258A indicó que esta proteína todavía era capaz de fragmentar P25K y P4b, aunque la fragmentación de P4a no está indicada.

Rescate del marcador - Para demostrar que I7L es capaz de rescatar el crecimiento y la actividad de procesamiento proteolítico del virus ts 16, el virus crece sólo, en presencia de un I7L de longitud total transfectado, y en presencia de I7L mutante transfectado y I7L truncado a una temperatura no permisiva y después se titula para determinar el rescate. Como se muestra en la Figura 21, I7L longitud total fue capaz de rescatar el crecimiento de ts 16 lo que indica que I7L es de hecho el producto de gen que está mutado en ts 16. La mayoría de los enzimas de I7L mutante y el enzima truncado fueron incapaces de rescatar el crecimiento de ts 16, lo que muestra que la porción N-terminal del enzima es necesaria. Se recuperaron ambos mutantes aspártico, pero en menor grado que el virus de tipo salvaje.

Discusión

La identidad de la proteína responsable de la fragmentación de los precursores de la proteína del núcleo VV se ha identificado como el producto del gen del marco de lectura abierto I7L. En este ejemplo se han caracterizado más las propiedades de esta proteína. Los resultados presentados aquí que utilizan un ensayo de procesamiento *trans in vivo* con un sustrato marcado del epítipo y el enzima del plásmido terminal han indicado que I7L es capaz de conducir la reacción de fragmentación y además verificar que es la proteinasa de la proteína del núcleo viral. El análisis mutacional ha demostrado que para que se de esta reacción, se necesita la actividad catalítica de I7L y el sitio de fragmentación auténtico debe estar presente en el sustrato. Esto parece ser un efecto global en que I7L es capaz de cortar en los sitios AGA auténticos de P4b y P25K así como los sitios AGS y AGT en P4a, a pesar de que podría parecer que la fragmentación de P4a y P4b es menos eficiente que la del P25K.

La proteína I7L se caracteriza como una proteasa cisteína porque la mutación de los residuos histidina, cisteína y ácido aspártico elimina la actividad proteolítica. Además, los otros residuos altamente conservados en el dominio del núcleo catalítico (W#242, Q#322, C#328, G#329) son todos necesarios para que se de la proteólisis. El único residuo que se encontró que no era esencial para la proteólisis fue D#258.

Independientemente del tipo de maduración proteolítica utilizada por el virus durante la maduración, es esencial que la actividad de las proteinasas virales sea regulada para asegurar la producción eficiente de la progenie de viriones infecciosos. En general, en los sistemas biológicos, la regulación de las proteinasas se consigue de varios modos que incluyen la compartimentalización de los enzimas y sustrato, la presencia de unos inhibidores específicos y/o activadores y la activación proteolítica de los zimógenos. Los virus han adoptado unas estrategias similares. Por ejemplo en los retrovirus, se ha propuesto que entorno ácido extracelular desencadene la fragmentación morfogénica de las proteínas estructurales mediante el desplazamiento de una porción gag-pol de la poliproteína que evita que el sitio activo de la proteinasa interactúe con su sustrato mientras está dentro de la célula. En el caso de los adenovirus, parece que es el péptido unido a disulfuro producido a partir de la proteína estructural pVI durante las últimas etapas de replicación así como el ADN viral son necesarios para la activación de una proteinasa viral y la posterior maduración del virus.

REIVINDICACIONES

1. Ensayo de fragmentación de vCPP *in vitro* que comprende las etapas siguientes:

proporcionar un péptido, en el que el péptido contiene un grupo AG(X), se expresa en la etapa tardía de la infección por el virus *Vaccinia* y se destina a la incorporación en el núcleo del virión del virus *Vaccinia*:

aplicación del péptido en una placa de microtitulación;

incubación de la placa de microtitulación durante un periodo de tiempo;

aplicación de una solución de bloqueo para cubrir la superficie reactiva de la placa;

adición a la placa de un vCCP purificada de células de mamíferos infectadas;

monitorización de la extensión de la fragmentación en el tiempo;

repetición de las etapas anteriores en presencia de una sustancia adicional, y

comparación de la extensión de la fragmentación en presencia de la sustancia con la que se produce en ausencia de la sustancia, en el que una disminución de la fragmentación indica que la sustancia es un inhibidor de la fragmentación de vCPP.

2. Ensayo según la reivindicación 1, en el que dicho péptido comprende asimismo unos aminoácidos circundantes del sitio de fragmentación P4b.

3. Ensayo según la reivindicación 1, en el que dicho péptido está etiquetado.

4. Ensayo según la reivindicación 3, en el que la etiqueta es una etiqueta fluorescente.

5. Ensayo según la reivindicación 4, en el que la etiqueta fluorescente es IAEDANS o diadansil-L-cisteína.

6. Ensayo según la reivindicación 3, en el que la etiqueta está unida al amino terminal del péptido.

7. Ensayo según la reivindicación 1, en el que la placa de microtitulación está preactivada.

8. Ensayo según la reivindicación 1, en el que la placa de microtitulación se incuba toda la noche.

9. Ensayo según la reivindicación 1, en el que el vCPP es I7L o G1L.

10. Ensayo según la reivindicación 1, en el que la extensión de la fragmentación se mide mediante la liberación de fluorescencia.

11. Ensayo según la reivindicación 10, en el que la liberación de fluorescencia se monitoriza utilizando un micro-fluorímetro.

12. Ensayo según la reivindicación 1, en el que la extensión de la fragmentación se mide utilizando un formato ELISA estándar.

13. Ensayo según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo primario es un antisuero específico del sitio de fragmentación.

14. Ensayo de fragmentación de vCPP *in vitro* que comprende las etapas siguientes:

proporcionar un péptido, en el que el péptido contiene un grupo AG(X), se expresa en la etapa tardía durante la infección por el virus *Vaccinia* y se destina a la incorporación en el núcleo del virión del virus *Vaccinia*;

proporcionar un par de sondas de fluorescencia-apagado,

titulación del péptido en unos pocillos de placa de visión negra;

adición a la placa de proteasa vCPP purificada de células de mamíferos infectadas por VV;

monitorización de la extensión de la fragmentación en el tiempo;

repetición de las etapas anteriores en presencia de una sustancia adicional, y

ES 2 298 523 T3

comparación de la extensión de la fragmentación en presencia de la sustancia con la que se produce en ausencia de la sustancia, en el que una disminución de la fragmentación indica que la sustancia es un inhibidor de la fragmentación de vCPP.

15. Ensayo según la reivindicación 14, en el que dicho péptido comprende asimismo unos aminoácidos circundantes del sitio de fragmentación P4b.

16. Ensayo según la reivindicación 14, en el que dichas sondas se conjugan con los extremos NH₂ y COOH del péptido, de tal manera que con el grupo de apagado muy próximo al grupo fluorescente, la energía de fluorescencia es absorbida por el grupo de apagado en una señal relativamente baja o de referencia.

17. Ensayo según la reivindicación 16, en el que dicha sonda de apagado es un grupo dabciilo succinimidil éster (dabcil) y la sonda fluorescente es un grupo EDANS, ácido 5-(2-aminoetil)amino)naftaleno-1-sulfónico.

18. Ensayo según la reivindicación 16, en el que dicha sonda de apagado se conjuga con el NH₂ terminal del péptido y la sonda fluorescente se conjuga con el CCOH-terminal del péptido.

19. Ensayo según la reivindicación 14, en el que vCPP es I7L o G1L.

20. Ensayo según la reivindicación 14, en el que la fragmentación del péptido por la proteasa da como resultado la eliminación del grupo de apagado de la proximidad inmediata del grupo fluorescente, que causa la elevación de la fluorescencia de la sonda.

21. Ensayo de fragmentación de vCPP *in vitro* que comprende las etapas siguientes:

proporcionar un péptido, en el que el péptido contiene un grupo AG(X), se expresa en la etapa tardía durante la infección por el virus *Vaccinia* y se destina a la incorporación en el núcleo del virión del virus *Vaccinia*;

en el que un extremo terminal de péptido se biotinila, y el otro extremo terminal presenta una etiqueta polihistidina;

en el que el extremo terminal biotinildado se modifica con estraptavidina;

en el que el extremo terminal que presenta la etiqueta polihistidina se modifica con criptato de europio acoplado con un anticuerpo anti-His6;

adición de una alofococianina modificada (XL665);

excitación del péptido etiquetado a 337 nm, de tal manera que el criptato Eu, transfiere la energía a XL665, que, a su vez, emite luz a 665 nm y medición de la emisión de referencia;

adición de la proteasa vCPP purificada de las células de mamíferos infectadas con VV;

monitorización de la extensión de la fragmentación en el tiempo;

repetición de las etapas anteriores en presencia de una sustancia adicional, y

comparación de la extensión de la fragmentación en presencia de la sustancia con la que se produce en ausencia de la sustancia, en el que una disminución de la fragmentación indica que la sustancia es un inhibidor de la fragmentación de vCPP.

22. Ensayo según la reivindicación 21, en el que dicho péptido comprende asimismo unos aminoácidos circundantes del sitio de fragmentación P4b.

23. Ensayo según la reivindicación 21, en el que el amino terminal del péptido se biotinila y el carboxi terminal presenta una etiqueta polihistidina.

24. Ensayo según la reivindicación 21, en el que vCPP es I7L o G1L.

25. Ensayo según la reivindicación 21, en el que la fragmentación del péptido inhibe la transferencia de energía de resonancia del criptato Eu excitado al XL665, dando como resultado la reducción de la señal de emisión de 665 nm.

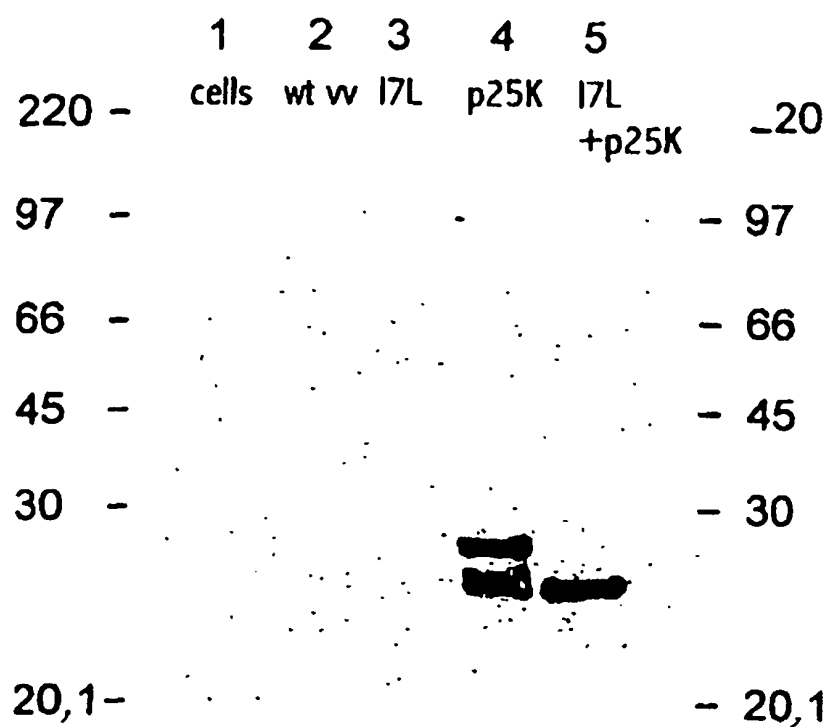


FIG. 1

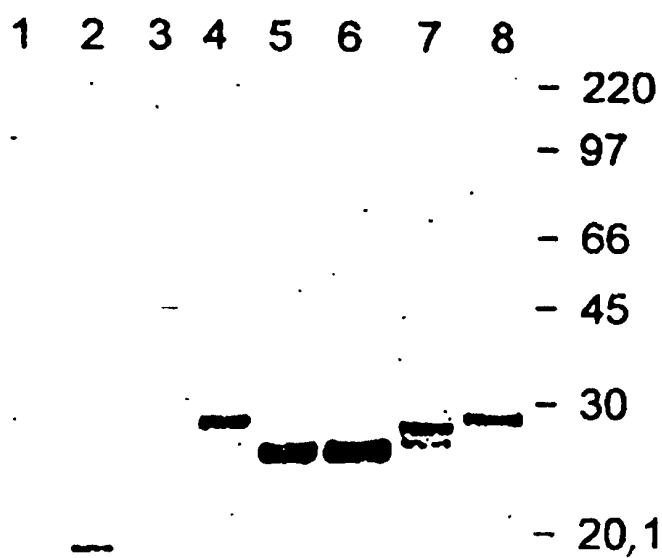


FIG. 2

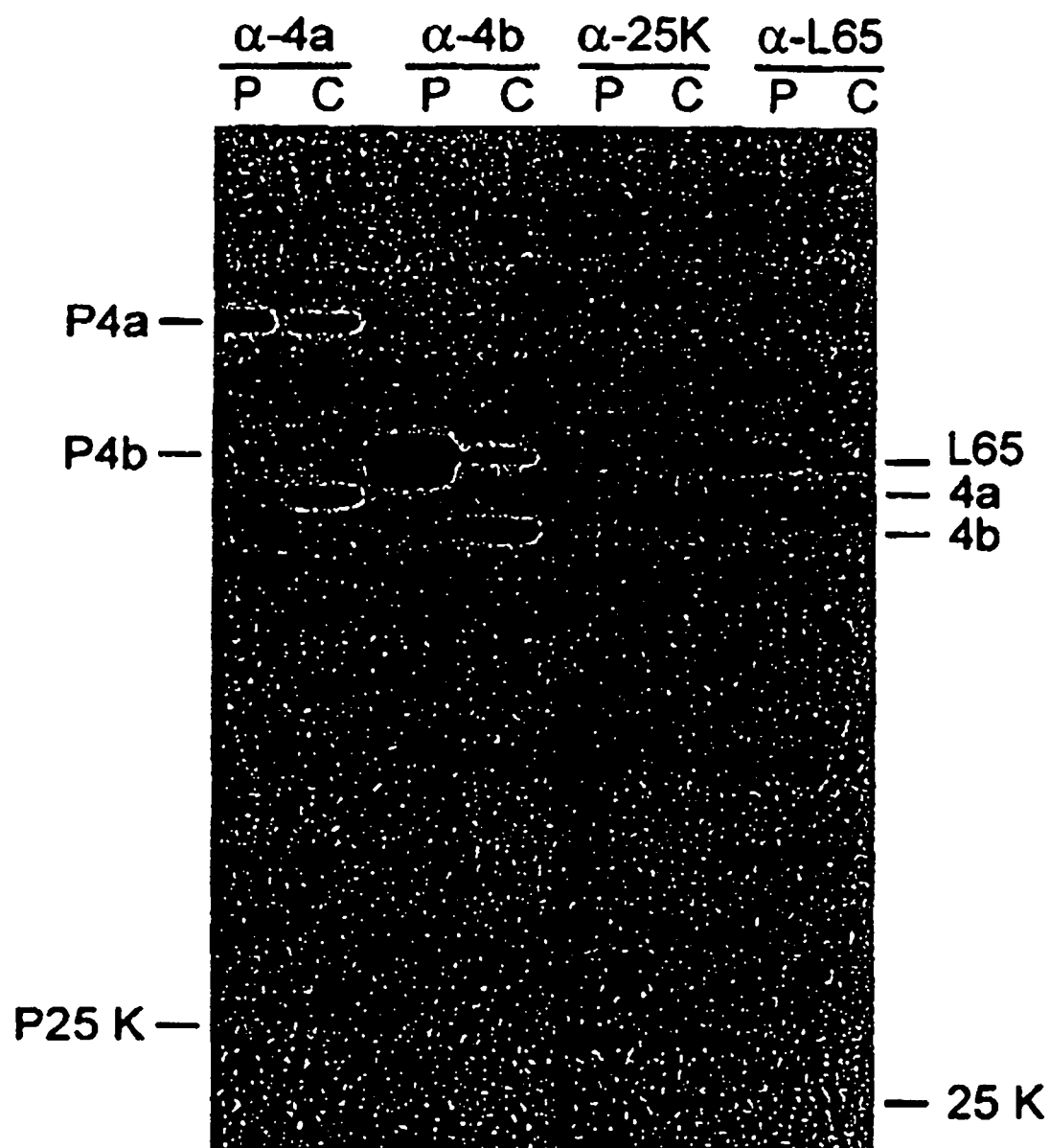


FIG. 3

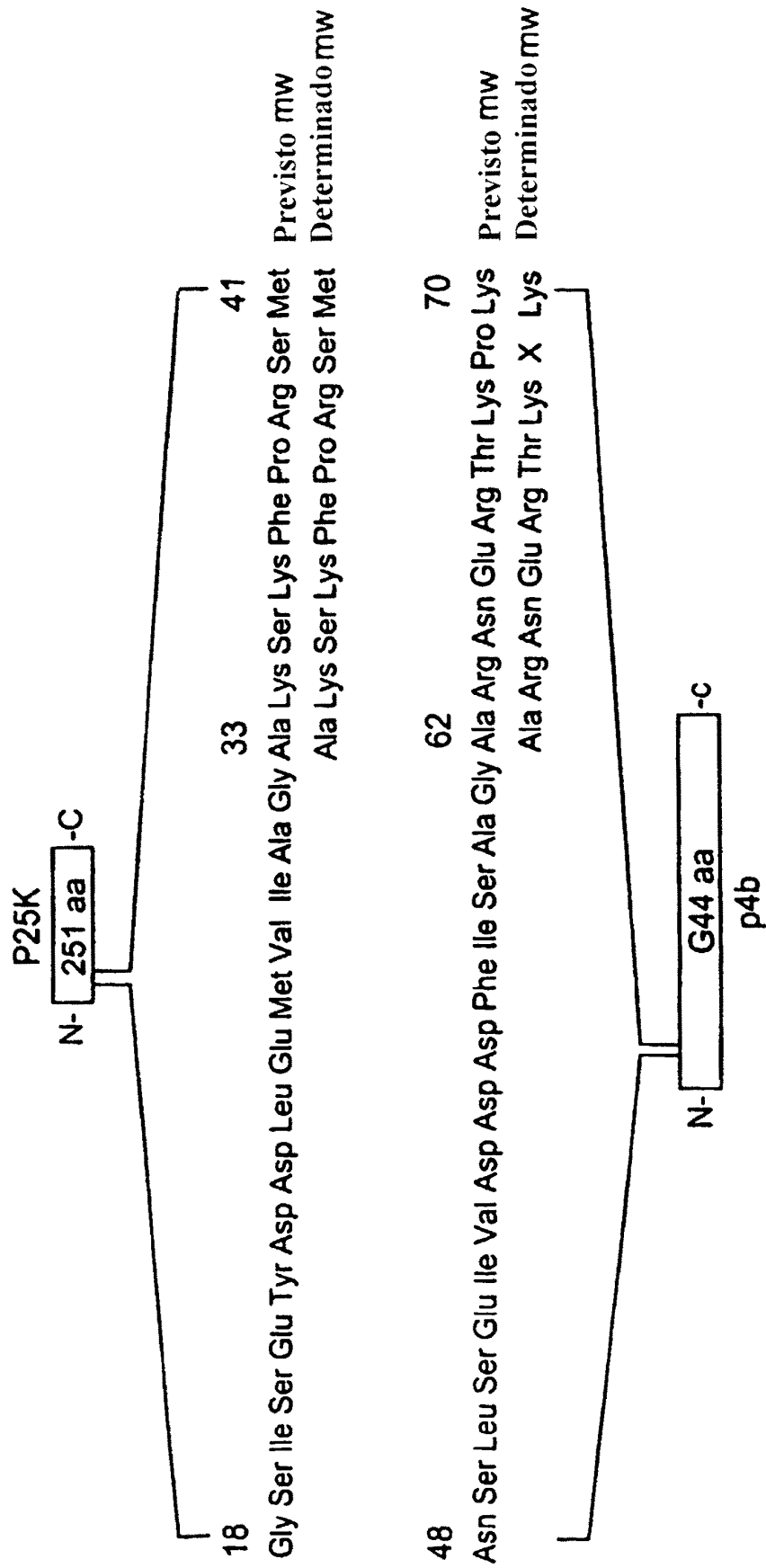


FIG. 4

Secuencia de aminoácidos											
	P20	P15	P10	P5	P1		P1*	P5*	P10*	P15*	P20*
VV/P25K	--DTIFFAGSISEYDDLQ				MIAG	*	AKSKF	PR	SMLSIF	NI	VPRTMS--
FP/FP5	--GEKALCAQVTRDQLLEI				IAAG	*	ARSKF	PK	SLLSMY	RV	TPRVMT--
VV/P4b	--LSCSVCNSLSQIVDDDF				ISAG	*	ARNQR	TK	PKRAGN	NQ	SQQPIK--
FP/FP4b	--NLCNVCDVLNKITEEDV				ISAG	*	AKQQR	PM	RLRSK	PK	PDICKGV--
VV/P17K	--GDAAVKGGNNNLNSQT				DTAG	*	ACDTK	SK	SSKCIT	CK	PKSKSS--
VV/P21K		MSYLRRYYNMLDDE			ESAG	*	AGVLD	KD	LFTEE	QQ	QSFM PKD--
VV/P4a	--GEDIFCAMPYNILDRI				ITNAG	*	TCTVS	IGD	MLDN	ITTQ	SDCNM--
VV/P4a	--FRDYQSYRQYRNYCPR				YFYAG	*	SPEGE	ETI	ICDSE	PISIL	DRI--

FIG. 5

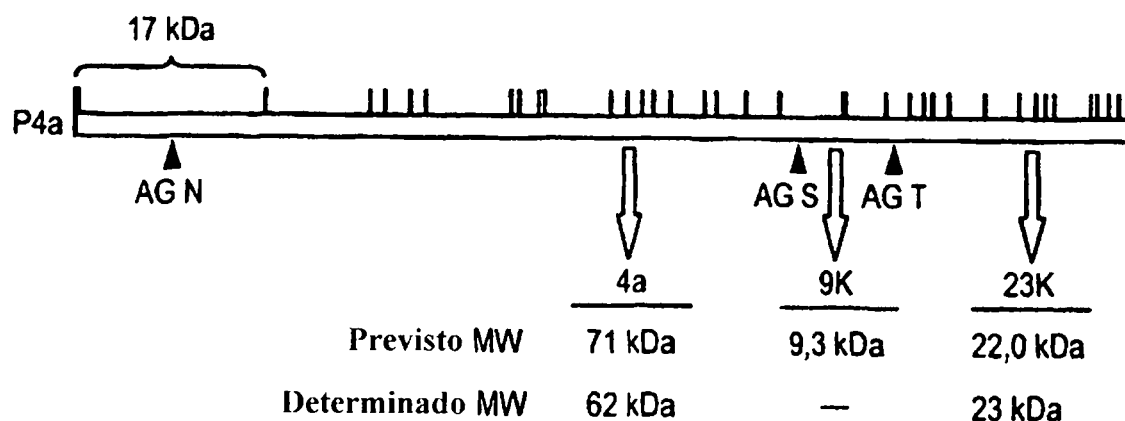


FIG. 6

ORF	Proteína	Clase temporal	Localización ^a	Segmentado
A10L	P4a	Tardía	Núcleo	+
L4R	P25K	Tardía	Núcleo	+
A3L	P4b	Tardía	Núcleo	+
A12L	P17K	Tardía	Núcleo	+
A17L	P21K	Tardía	Virión	+
F13L	P37K	Tardía	Envuelta	-
E9L	DNAP	Temprana	Virosoma	-
K1L	HR	Temprana immed. ^b	No estructural ^c	-

FIG. 7

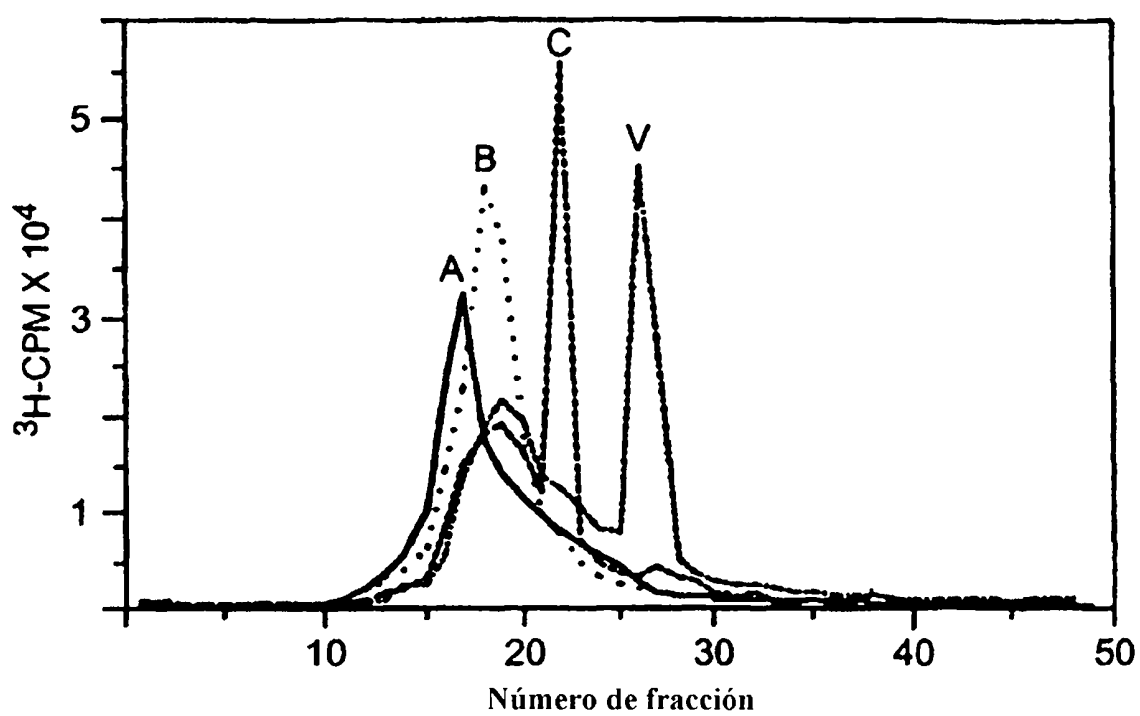


FIG. 8

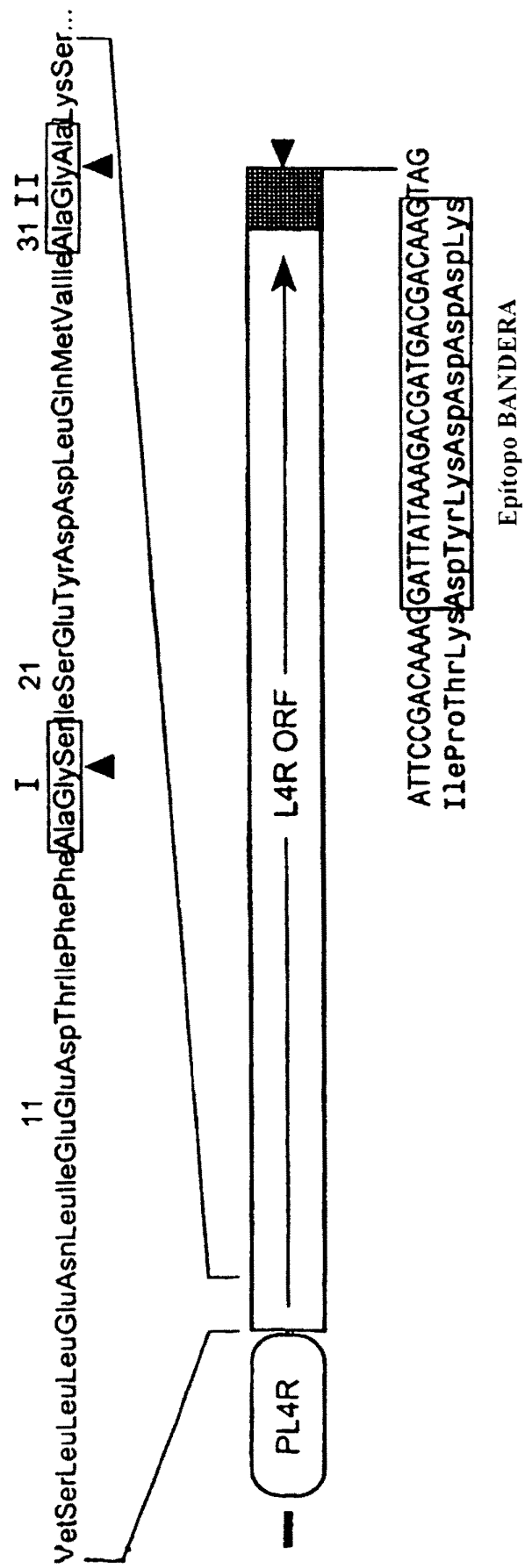


FIG. 9

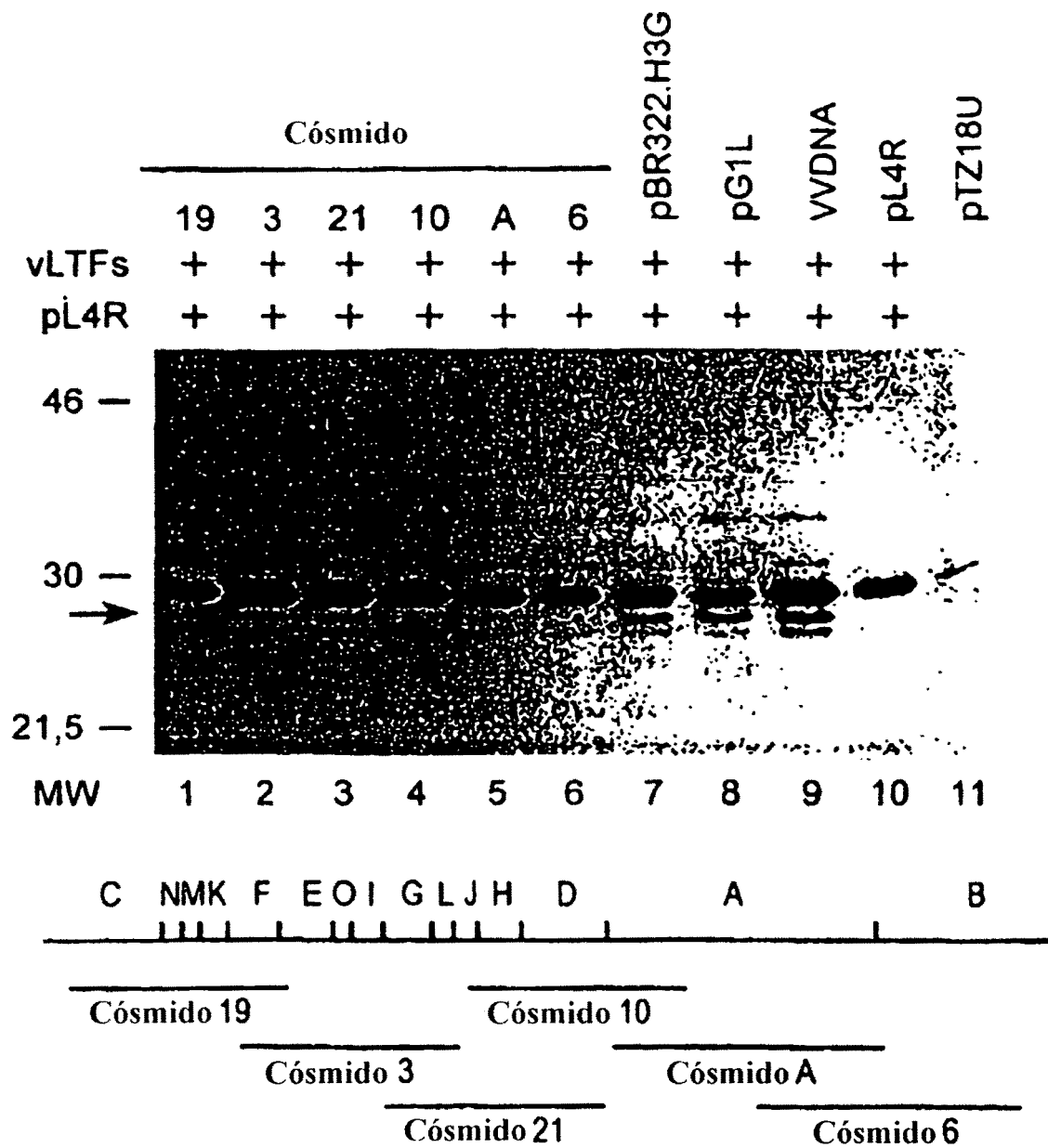


FIG. 10

Enzima	Secuencia ^a
G11 ^b	GIA <u>HLLEH</u> LLI-64- <u>ENE</u>
Proteasa III	GLA HYLEH MLF-38-END
dIDE	GLA HFCEH MLF-8-ENG
hIDE	GLS HFCEH MLF-8-ENE
Termolisina	VVA HELTH AVT-14-INE
Aminopeptidasa N	VIA HELAH QWF-13-LNE
Colagenasa ^c	VAA HELGH SLG

FIG. 11

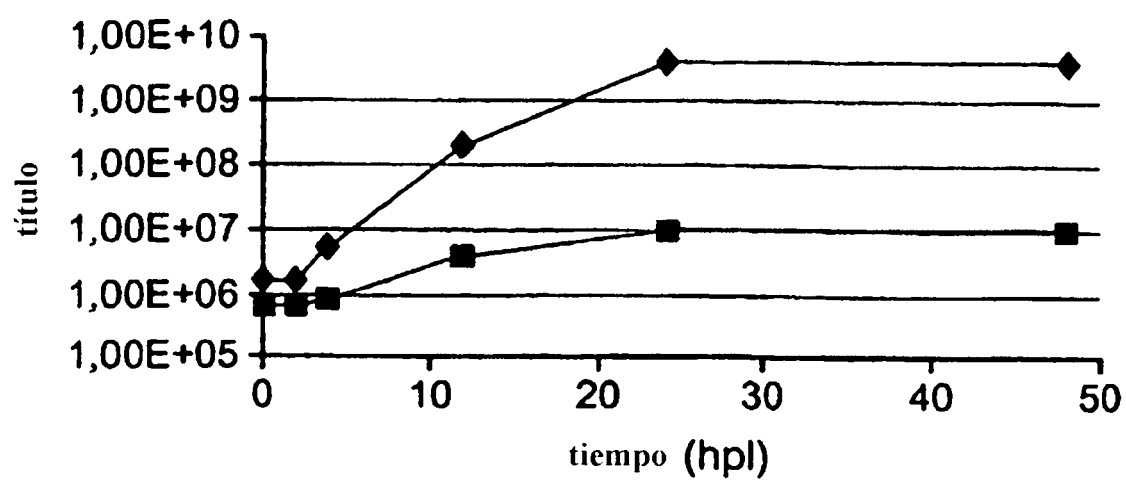


FIG. 12A

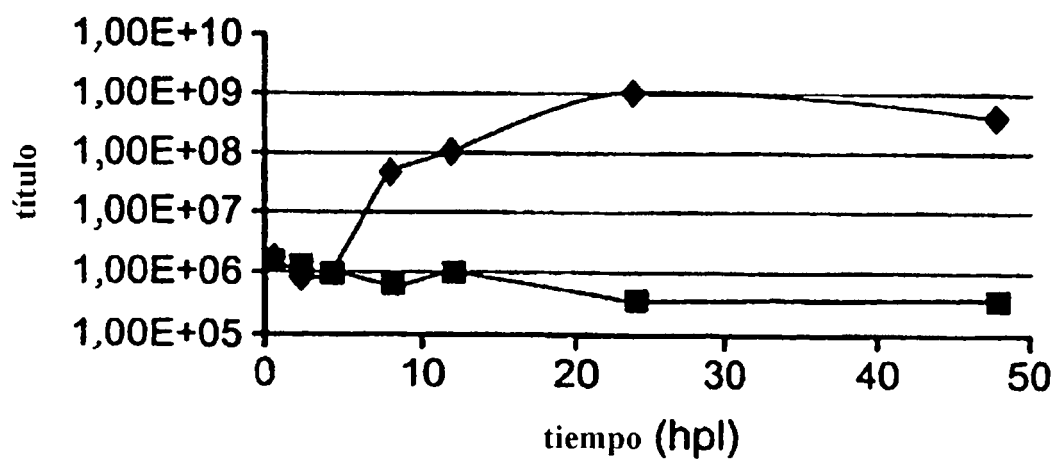


FIG. 12B



FIG. 13A



FIG. 13B

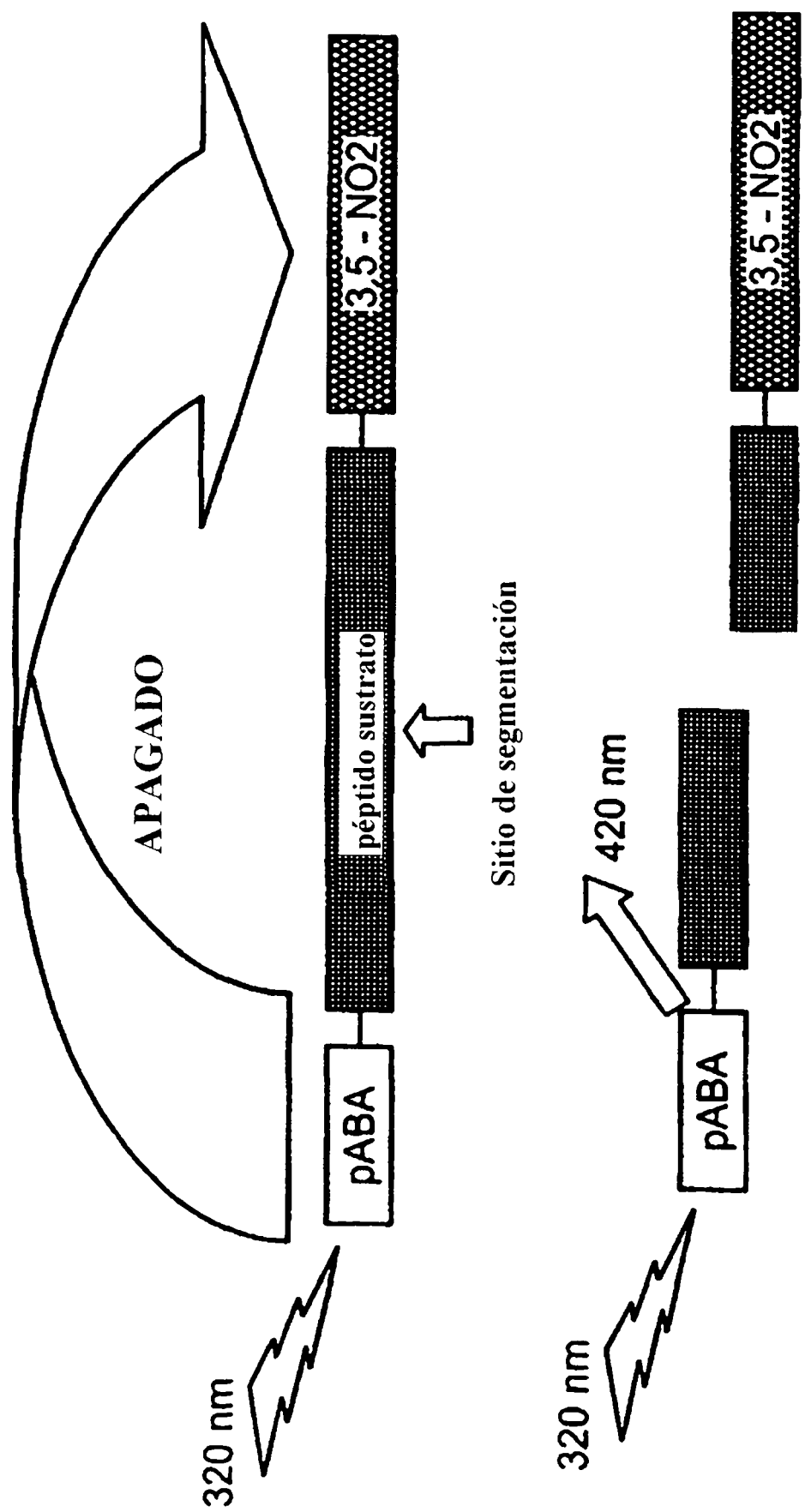


FIG. 14

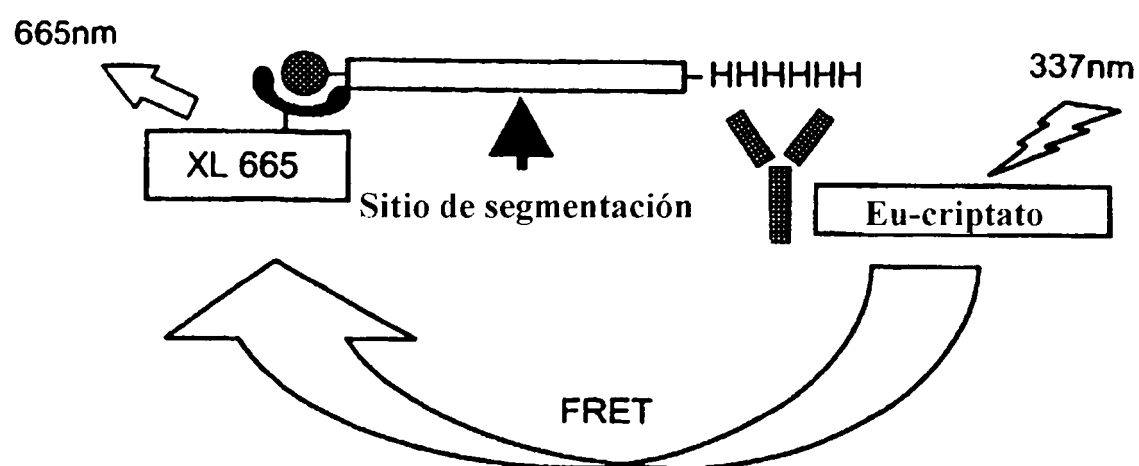
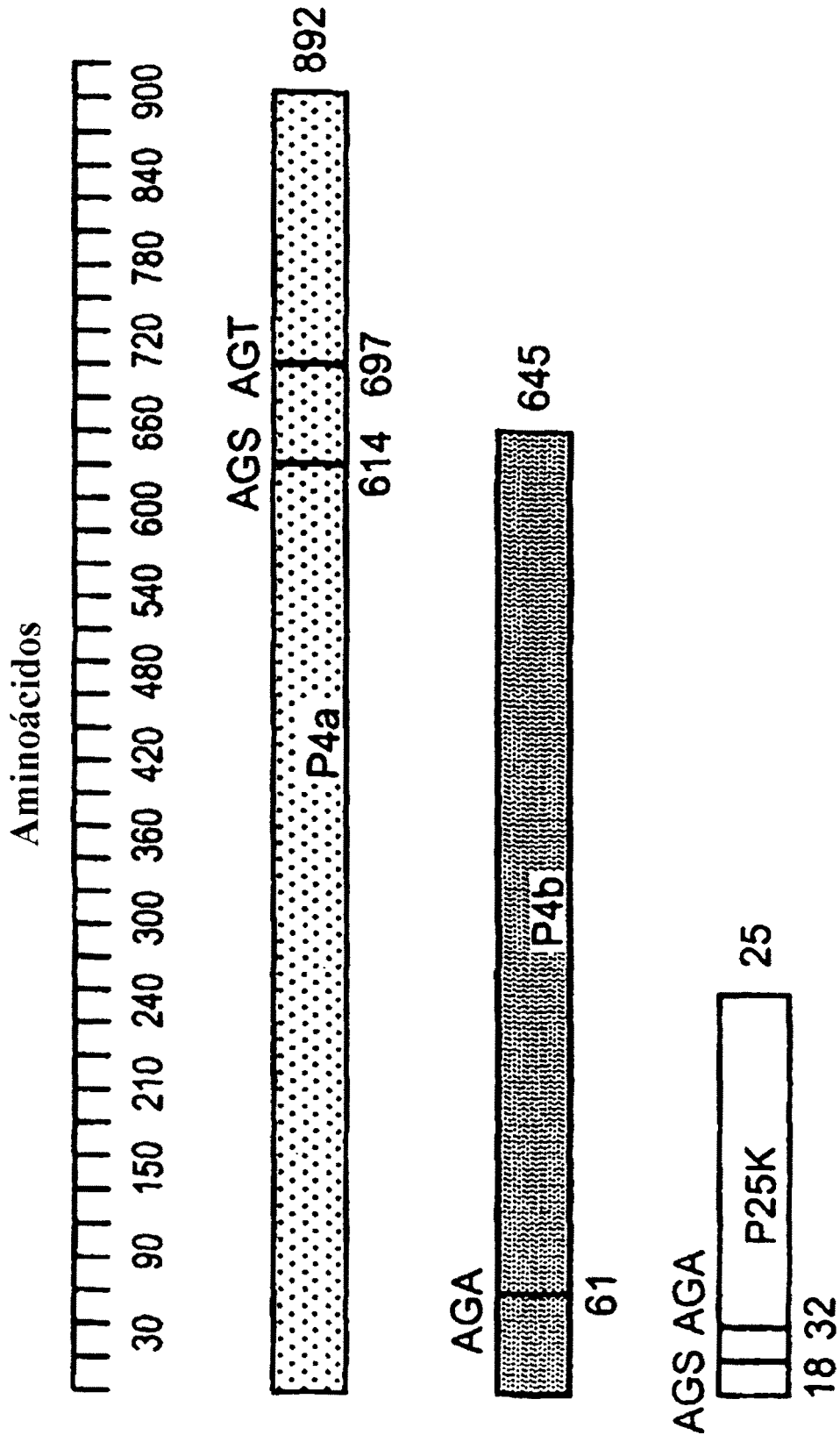


FIG. 15

FIG. 16



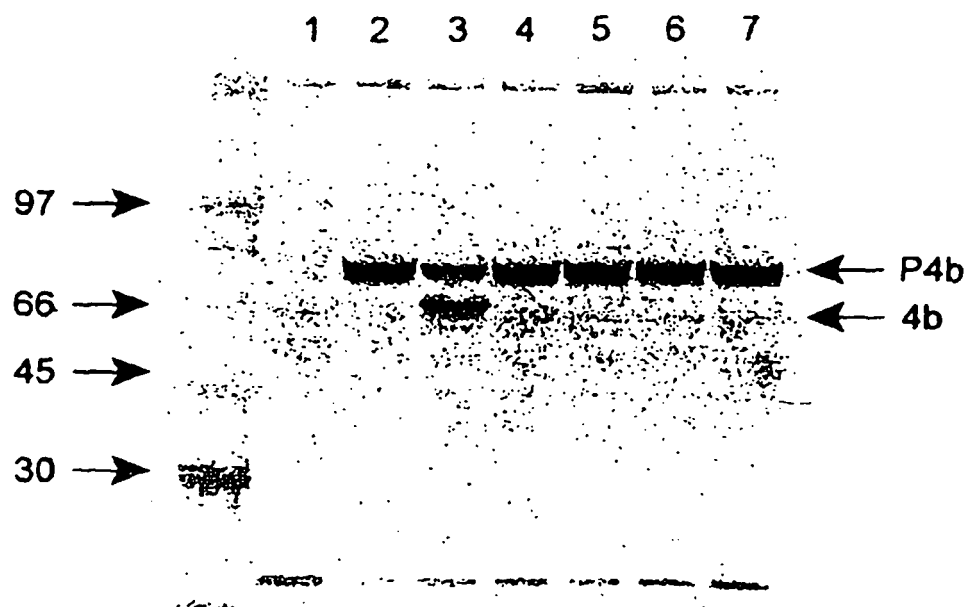


FIG. 17

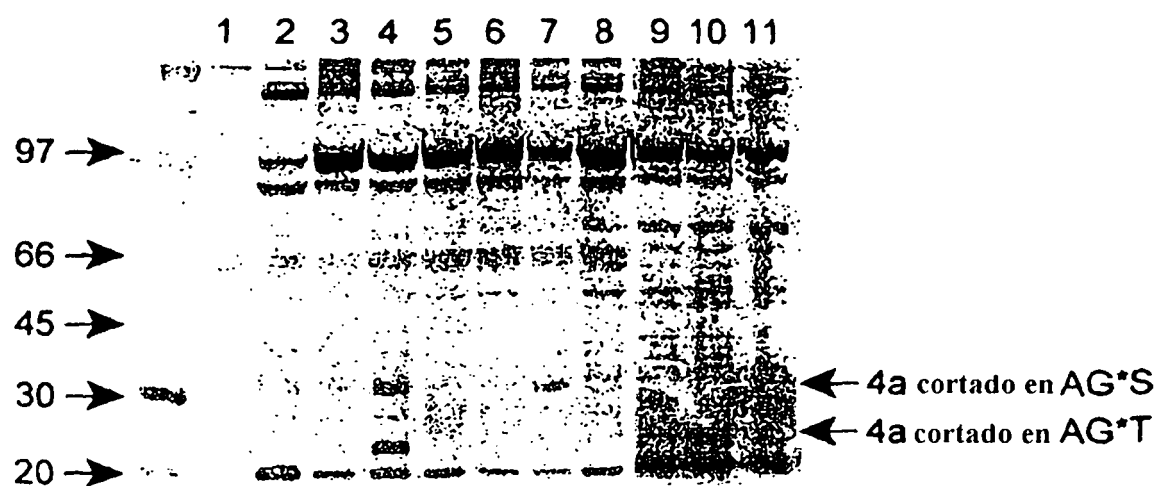
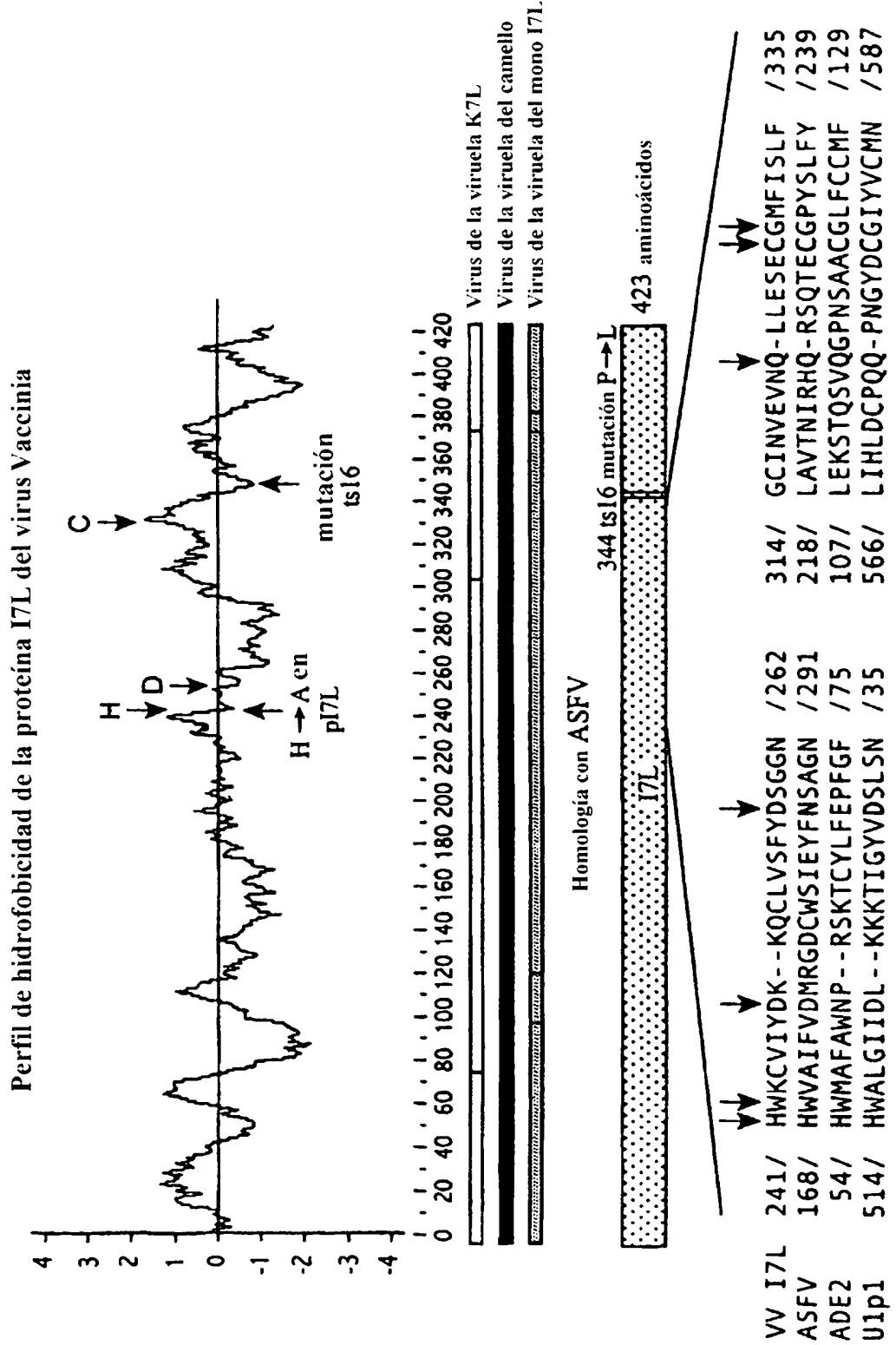


FIG. 18

FIG. 19



Plásmido de cotransfección	P4a(A10L)	P4b(A3L)	P25K(L4R)
pI7L	+	+	+
pH241A	-	-	-
pW242A	-	-	-
pD248A	-	-	-
pD258A	-	+	+
pQ322A	-	-	-
pC328A	-	-	-
pG329A	-	-	-

FIG. 20

Plásmidos utilizados para rescatar ts 16	Proporción de rescate
Ts16 VV solo	1
pI7L	7
pI7L-T	1
pH241A	1
pW242A	1
pD248A	2
pD258A	3
pQ322A	1
pC328A	1
pG329A	1

FIG. 21

ES 2 298 523 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> HRUBY, DENNIS E. BOLKEN, TOVE C. BYRD, CHELSEA	
	<120> Procedimiento de cribado para antivirales contra ortopoxvirus	
10	<130> 016921-220	
	<140> EP 03 730 996.2-2402	
	<141> 2003-01-08	
15	<150> PCT/US03/00347	
	<151> 2003-01-08	
20	<150> 60/345.646	
	<151> 2002-01-08	
	<160> 63	
25	<170> PatentIn Ver. 3.3	
	<210> 1	
30	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 1	
40	ctagctagca tgatgcctat taagtcaata gttactcttg	40
	<210> 2	
45	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 2	
55	catgcatgg ctactgtcg tcatcgtctt tataatcttc atcatcaaaa gag	53
	<210> 3	
60	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	

ES 2 298 523 T3

<400> 3

aaactgcaga tggaagccgt ggtcaatagc gatg

34

5

<210> 4

<211> 60

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15

<400> 4

cccaagcttc tactgtcgt catcgtcttt ataatacaat agttctgtaa tatgtctagc

60

20

<210> 5

<211> 39

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

30

<400> 5

gatgacttta tatccataga catcagaaat caacgtacc

39

35

<210> 6

<211> 39

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

45

<400> 6

ggtacgttga ttctgatgt ctatggatat aaagtcac

39

50

<210> 7

<211> 39

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60

<400> 7

cctagatatt tctatataga cattcccgaa ggagaggaa

39

65

<210> 8

<211> 39

ES 2 298 523 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
10	ttcctctcct tcgggaatgt ctatatagaa atatctagg	39
	<210> 9	
15	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 9	
25	aggattatta caattattga tatctgtacc gtatccata	39
	<210> 10	
30	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 10	
40	tatggatacg gtacagatat caatatttgt aataatcct	39
	<210> 11	
45	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 11	
55	aaactgcaga tgcacatca tcacatcat acctctagat ttgtaatg	48
	<210> 12	
60	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	

ES 2 298 523 T3

	<400> 12	
	cccaagcttc tactgtcgt catcgtcttt ataattctca tcgtcgtcta c	51
5	<210> 13	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
15	<400> 13	
	tggtattgt ctcattgcgaa atgtgtaatt tat	33
20	<210> 14	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
30	<400> 14	
	ataaattaca catttcgcat gagacaaata aca	33
35	<210> 15	
	<211> 36	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
45	<400> 15	
	ggaaatgtgt aatttatgcc aaaaaacaat gtttag	36
50	<210> 16	
	<211> 36	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
60	<400> 16	
	ctaaacattg tttttggca taaattacac atttcc	36
65	<210> 17	
	<211> 27	

ES 2 298 523 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
10	gtatcctttt atgcctccgg aggcaat	27
	<210> 18	
15	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 18	
25	attgcctccg gaggcataaa aggatac	27
	<210> 19	
30	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 19	
40	gtggaagtta atgcgctgtt ggaatct	27
	<210> 20	
45	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 20	
55	agattccaac agcgcattaa ctccac	27
	<210> 21	
60	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético	

ES 2 298 523 T3

<400> 21

ctgttggaat ctgaagccgg gatgttatta gt 32

5 <210> 22
<211> 33
<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 22

actaataaac atccccgctt cagattccaa cag 33

20 <210> 23
<211> 33
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

30 <400> 23

ttggaatctg aatgtgcaat gtttattagt ttg 33

35 <210> 24
<211> 33
<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

45 <400> 24

caaactaata aacattgcac attcagattc caa 33

50 <210> 25
<211> 24
<212> PRT

55 <213> Virus *Vaccinia*

<400> 25

60 **Gly Ser Ile Ser Glu Tyr Asp Asp Leu Glu Met Val Ile Ala Gly Ala**
1 5 10 15

Lys Ser Lys Phe Pro Arg Ser Met
20

65 <210> 26
<211> 9

ES 2 298 523 T3

<212> PRT
 <213> Virus *Vaccinia*
 5 <400> 26
 Ala Lys Ser Lys Phe Pro Arg Ser Met
 1 5
 10 <210> 27
 <211> 24
 <212> PRT
 15 <213> Virus *Vaccinia*
 <400> 27
 20 **Asn Ser Leu Ser Glu Ile Val Asp Asp Asp Phe Ile Ser Ala Gly Ala**
 1 5 10 15
 Arg Asn Glu Arg Thr Lys Pro Lys
 20
 25
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Virus *Vaccinia*
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (8)
 <223> aminoácido variable
 40 <400> 28
 Ala Arg Asn Glu Arg Thr Lys Xaa Lys
 1 5
 45
 <210> 29
 <211> 21
 <212> PRT
 50 <213> Virus *Vaccinia*
 <400> 29
 55 **Asp Thr Ile Phe Phe Ala Gly Ser Ile Ser Glu Tyr Asp Asp Leu Gln**
 1 5 10 15
 Met Val Ile Ala Gly
 20
 60
 <210> 30
 <211> 21
 <212> PRT
 65 <213> Virus *Vaccinia*

ES 2 298 523 T3

<400> 30

Ala Lys Ser Lys Phe Pro Arg Ser Met Leu Ser Ile Phe Asn Ile Val
1 5 10 15

5 Pro Arg Thr Met Ser
20

<210> 31

10 <211> 21

<212> PRT

<213> Viruela aviar

15 <400> 31

Gly Glu Lys Ala Leu Cys Ala Gln Val Thr Arg Asp Gln Leu Leu Glu
1 5 10 15

20 Ile Ile Ala Ala Gly
20

<210> 32

<211> 21

25 <212> PRT

<213> Viruela aviar

<400> 32

30 Ala Arg Ser Lys Phe Pro Lys Ser Leu Leu Ser Met Tyr Arg Val Thr
1 5 10 15

35 Pro Arg Val Met Thr
20

<210> 33

<211> 21

40 <212> PRT

<213> Virus *Vaccinia*

<400> 33

45 Leu Ser Cys Ser Val Cys Asn Ser Leu Ser Gln Ile Val Asp Asp Asp
1 5 10 15

Phe Ile Ser Ala Gly
20

50 <210> 34

<211> 21

<212> PRT

55 <213> Virus *Vaccinia*

<400> 34

60 Ala Arg Asn Gln Arg Thr Lys Pro Lys Arg Ala Gly Asn Asn Gln Ser
1 5 10 15

Gln Gln Pro Ile Lys
20

65 <210> 35

<211> 21

ES 2 298 523 T3

<212> PRT

<213> Viruela aviar

5 <400> 35

Asn Leu Cys Asn Val Cys Asp Val Leu Asn Lys Ile Thr Glu Glu Asp
1 5 10 15

10 Val Ile Ser Ala Gly
20

<210> 36

 $\langle 211 \rangle$ 21

15 <212> PRT

<213> Viruela aviar

<400> 36

20 Ala Lys Gln Gln Arg Pro Met Arg Leu Arg Ser Lys Pro Lys Pro Asp
1 5 10 15

Ile Cys Lys Gly Val
20

<210> 37

 $\langle 211 \rangle$ 21

<212> PRT

30 <213> Virus *Vaccinia*

<400> 37

35 Gly Asp Ala Ala Val Lys Gly Gly Asn Asn Asn Leu Asn Ser Gln Thr
1 5 10 15

Asp Val Thr Ala Gly
20

40 $\langle 210 \rangle$ 38

 $\langle 211 \rangle$ 21

<212> PRT

<213> Virus *Vaccinia*

<400> 38

Ala Cys Asp Thr Lys Ser Lys Ser Ser Lys Cys Ile Thr Cys Lys Pro
1 5 10 15

Lys Ser Lys Ser Ser
20

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Virus *Vaccinia*

60
 <400> 39

Met Ser Tyr Leu Arg Arg Tyr Tyr Asn Met Leu Asp Asp Glu Ser Ala
1 5 10 15

Gly

ES 2 298 523 T3

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Virus *Vaccinia*

<400> 40

```

10      Ala Gly Val Leu Asp Lys Asp Leu Phe Thr Glu Glu Gln Gln Gln Ser
        1             5             10             15

      Phe Met Pro Lys Asp
                20

```

15

<210> 41

<211> 21

<212> PRT

20 <213> Virus *Vaccinia*

<400> 41

```

25      Gly Glu Asp Ile Phe Cys Ala Met Pro Tyr Asn Ile Leu Asp Arg Ile
        1             5             10             15

      Ile Thr Asn Ala Gly
                20

```

30

<210> 42

<211> 21

<212> PRT

35 <213> Virus *Vaccinia*

<400> 42

```

40      Thr Cys Thr Val Ser Ile Gly Asp Met Leu Asp Asn Ile Thr Thr Gln
        1             5             10             15

      Ser Asp Cys Asn Met
                20

```

45

<210> 43

<211> 21

<212> PRT

50 <213> Virus *Vaccinia*

<400> 43

```

55      Phe Arg Asp Tyr Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Arg Asn Tyr Cys Pro Arg
        1             5             10             15

      Tyr Phe Tyr Ala Gly
                20

```

60

<210> 44

<211> 21

<212> PRT

65 <213> Virus *Vaccinia*

ES 2 298 523 T3

<400> 44

Ser Pro Glu Gly Glu Glu Thr Ile Ile Cys Asp Ser Glu Pro Ile Ser
1 5 10 15

5

Ile Leu Asp Arg Ile
20

<210> 45

10 <211> 35

<212> PRT

<213> Virus *Vaccinia*

15 <400> 45

Met Ser Leu Leu Leu Glu Asn Leu Ile Glu Glu Asp Thr Ile Phe Phe
1 5 10 15

20

Ala Gly Ser Ile Ser Glu Tyr Asp Asp Leu Gln Met Val Ile Ala Gly
20 25 30

Ala Lys Ser
35

25 <210> 46

<211> 39

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: constructo de nucleótidos sintético

35

<220>

<221> CDS

<222> (1) (36)

40

<400> 46

att ccg aca aag gat tat aaa gac gat gac gac aag tag **39**
Ile Pro Thr Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5 10

45

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: constructo de péptidos sintético

55

<400> 47

Ile Pro Thr Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5 10

60

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

65

<213> Virus *Vaccinia*

ES 2 298 523 T3

<400> 48

Gly Ile Ala His Leu Leu Glu His Leu Leu Ile
1 5 10

5

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

10

<213> *Escherichia coli*

<400> 49

15

Gly Leu Ala His Tyr Leu Glu His Met Leu Phe
1 5 10

<210> 50

20

<211> 11

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

25

<400> 50

Gly Leu Ser His Phe Cys Glu His Met Leu Phe
1 5 10

30

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

35

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

40

Gly Leu Ser His Phe Cys Glu His Met Leu Phe
1 5 10

<210> 52

45

<211> 11

<212> PRT

<213> *Bacillus thermoproteolyticus*

50

<400> 52

Val Val Ala His Glu Leu Thr His Ala Val Thr
1 5 10

55

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

60

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

65

Val Ile Ala His Glu Leu Ala His Gln Trp Phe
1 5 10

ES 2 298 523 T3

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54
 10 Val Ala Ala His Glu Leu Gly His Ser Leu Gly
 1 5 10
 <210> 55
 15 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Virus Vaccinia*
 20 <400> 55
 His Trp Lys Cys Val Ile Tyr Asp Lys Lys Gln Cys Leu Val Ser Phe
 1 5 10 15
 Tyr Asp Ser Gly Gly Asn
 20
 <210> 56
 <211> 22
 30 <212> PRT
 <213> *Virus Vaccinia*
 <400> 56
 35 Gly Cys Ile Asn Val Glu Val Asn Gln Leu Leu Glu Ser Glu Cys Gly
 1 5 10 15
 Met Phe Ile Ser Leu Phe
 20
 40 <210> 57
 <211> 24
 <212> PRT
 45 <213> *Virus de la fièvre porcine africaine*
 <400> 57
 His Trp Val Ala Ile Phe Val Asp Met Arg Gly Asp Cys Trp Ser Ile
 1 5 10 15
 Glu Tyr Phe Asn Ser Ala Gly Asn
 20
 55 <210> 58
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Virus de la fièvre porcine africaine*
 60 <400> 58
 Leu Ala Val Thr Asn Ile Arg His Gln Arg Ser Gln Thr Glu Cys Gly
 1 5 10 15
 65 Pro Tyr Ser Leu Phe Tyr
 20

ES 2 298 523 T3

<210> 59

<211> 22

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

[illegible]

Phe Glu Pro Phe Gly Phe
20

15

<210> 60

<211> 23

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

25
Leu Glu Lys Ser Thr Gln Ser Val Gln Gly Pro Asn Ser Ala Ala Cys
1 5 10 15

Gly Leu Phe Cys Cys Met Phe
20

30

<210> 61

 $\langle 211 \rangle$ 22

35 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 61

40 <400> 61

His Trp Ala Leu Gly Ile Ile Asp Leu Lys Lys Lys Thr Ile Gly Tyr
1 5 10 15

Val Asp Ser Leu Ser Asn
20

45

<210> 62

<211> 22

50 $\langle 211 \rangle$ ZZ
 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 62

55 <400> 62

Leu Ile His Leu Asp Cys Pro Gln Gln Pro Asn Gly Tyr Asp Cys Gly
1 5 10 15

Ile Tyr Val Cys Met Asn
20

60

<210> 63

<211> 6

65 $\langle 211 \rangle$ 0
 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 298 523 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: etiqueta 6xHis sintética

5 <400> 63
 His His His His His His
 1 5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65