



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 370**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06841794 .8**
96 Fecha de presentación : **01.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1970380**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **Inhibidor de la enzima uracilo ADN glicosilasa y usos del mismo.**

30 Prioridad: **23.12.2005 ES 200503240**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC)
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

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

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 360 370 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidor de la enzima uracilo adn glicosilasa y usos del mismo

Esta invención se refiere a una proteína que inhibe la enzima uracilo ADN glicosilasa (UDG) vírica, para su uso como un agente terapéutico, en particular como un agente antivírico.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las infecciones víricas en personas y en animales, en especial en personas, están ampliamente extendidas y plantean numerosos problemas para los trabajadores sanitarios. Los agentes farmacéuticos capaces de luchar de forma eficaz y específica contra los virus son muy limitados en número y, además, en general producen efectos secundarios indeseables. Las infecciones víricas no sólo destruyen las células del huésped, sino que también afectan al funcionamiento de diferentes proteínas y enzimas. La invasión vírica favorece la infección por otros agentes patógenos, tales como otros virus, bacterias, hongos, etc. Así por ejemplo, debido a la pérdida inmunitaria que produce, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) abre la puerta a otros virus (herpes simplex, citomegalovirus, virus de la hepatitis B) y otros agentes patógenos que invaden el cuerpo humano, creando situaciones peligrosas.

15 A pesar de los intensos esfuerzos, hasta ahora no ha sido posible encontrar agentes quimioterapéuticos que interfieran, con un éxito esencialmente reconocible, en la causa o en los síntomas, con los episodios patógenos causados por agentes víricos. Por lo tanto, el tratamiento de enfermedades víricas mediante agentes quimioterapéuticos todavía está incompleto.

20 Los conjugados de anticuerpos, formados por un anticuerpo monoclonal conjugado o híbrido y una toxina, se han usado para erradicar colonias específicas de células diana, dirigiéndolos contra las células diana "indeseadas" que llevan antígenos de superficie diana y destruyéndolas. Las diferentes toxinas que han usado diferentes investigadores se pueden clasificar ampliamente en dos grupos. El primer grupo consiste en toxinas intactas, tales como la ricina intacta. Estas toxinas no se pueden aplicar de forma segura in vivo debido a su toxicidad letal. Las toxinas del segundo grupo se llaman hemitoxinas. 25 Las hemitoxinas son proteínas inactivadoras de ribosomas de una sola cadena que actúan de forma catalítica en ribosomas de eucariotas e inactivan la subunidad 60S, conduciendo a una inhibición dependiente de la dosis de la síntesis de proteínas celulares a nivel de la elongación del péptido.

30 Una hemitoxina de interés es la proteína antivírica de la hierba carmín (PAP), que se aísla de *Phytolacca americana*. Durante muchos años, se ha reconocido que la PAP tiene actividad antivírica. Se ha demostrado que la PAP bloquea la transmisión de los virus que contienen ARN en plantas. También se ha descrito que la PAP inhibe la replicación de dos virus animales que contienen ARN: el poliovirus y el virus influenza, y que la PAP inhibe la multiplicación de los virus del herpes simple de tipo I y tipo II (patente de US 4.672.053). Aunque se ha descrito que los conjugados de anticuerpo monoclonal de PAP G3.7/CD7, F13/CD14 y B43/CD19 inhiben la replicación del VIH-1, estos conjugados han resultado ser 35 inconsistentes en su capacidad para inhibir la replicación de los virus.

En vista de lo anterior, sigue siendo necesario proporcionar nuevos compuestos o fármacos antivíricos. Ventajosamente, éstos nuevos agentes antivíricos deben presentar una eficacia que sea igual o mayor que los agentes antivíricos descritos en el estado de la técnica y no deben producir efectos secundarios indeseables.

40 La mayoría de las células procariotas y eucariotas codifican la enzima uracilo ADN glicosilasa (UDG). La función de esta enzima es eliminar los restos de uracilo que aparecen en el ADN debido a la desaminación de la citosina o a la incorporación incorrecta de dUMP durante el proceso de replicación. Por ejemplo, si se produce la desaminación de la citosina y no se repara, se producirá una mutación de transición de C a T en la cadena de ADN en la que se ha producido dicha desaminación y, por 45 consiguiente, tendrá lugar una mutación de transición de G a A en la cadena complementaria después del siguiente ciclo de replicación. Una vez que el uracilo es eliminado por la enzima UDG, se crea un sitio apurínico o apirimidínico (sitio AP). El mecanismo encargado de reparar estos sitios AP es la ruta de reparación de corte y empalme de bases.

50 En células humanas se han identificado hasta 5 enzimas diferentes con actividad de UDG. Curiosamente, una de estas enzimas, llamada UNG2, está presente en las partículas del virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). Además, algunos virus de ADN, tales como los herpesvirus y poxvirus, codifican su propia actividad de UDG. Como resultado de la capacidad de la enzima UDG para influir en la replicación vírica de diferentes herpesvirus, dicha enzima se ha asociado con el mecanismo de replicación vírica en la célula huésped. En los virus mencionados antes, se sabe que la enzima UDG 55 es esencial para el proceso infectivo. Se ha propuesto que la función de esta enzima en los procesos de replicación vírica está asociada con la capacidad de esos virus para replicarse en células que no se

dividen, en las que se considera que los niveles de la enzima UDG celular son bajos (Priest y col. (2005) *Mol. Cell* 17: 479-490) y, por consiguiente, su inhibición tiene interés terapéutico. Hasta ahora, se han diseñado algunos inhibidores de la enzima UDG codificada por el virus herpes simple de tipo 1 (SHV-1). Estos compuestos sintéticos no proteicos se han ensayado en sistemas in vitro. Por otra parte, se sabe que la proteína UGI codificada por el bacteriófago PBS2 inhibe la enzima UDG del virus SHV-1. Sin embargo, una desventaja de este inhibidor es que bloquea la actividad de la UDG de la enzima UNG2 humana.

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención se basa en el uso de una proteína que tiene la capacidad de inhibir la enzima UDG, como un agente terapéutico. Puesto que la actividad de la UDG de algunos virus es esencial para el proceso infeccioso, dicha proteína podría ser una herramienta útil para diseñar compuestos antiviricos.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma que tiene la capacidad de inhibir la enzima UDG, para usar como un agente terapéutico.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica dicha proteína.

En otro aspecto, la invención se refiere a una construcción génica que comprende dicho polinucleótido.

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

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

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para obtener dicha proteína, que comprende cultivar dicha célula en condiciones que permitan producir dicha proteína y, si se desea, recuperar dicha proteína del medio de cultivo.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende dicha proteína.

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

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de dicha proteína en la preparación de una composición farmacéutica antivirica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la actividad de UDG en extractos de *B. subtilis*. El sustrato ssDNA-U¹⁶ (S) radiactivamente marcado (0,55 ng) se incubó con la cantidad especificada de extracto en ausencia de Mg²⁺. Como control interno, el sustrato se incubó con la enzima UDG de *E. coli*. Las mezclas de reacción se trataron o no con NaOH. La formación del producto de corte y empalme (P) se analizó en geles de poliacrilamida-urea.

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

La **Figura 3** muestra la coelución de la UDG de *B. subtilis* con la proteína p56FLAG usando columnas anti-FLAG M2 (Sigma). La masa molecular (kDa) de los marcadores usados se indica a la derecha.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere en general a una proteína con capacidad para inhibir la enzima uracilo ADN glicosilasa (UDG), que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma, que mantiene dicha capacidad para inhibir la enzima UDG, para su uso como agente terapéutico, en particular, como un agente antivirico.

En un aspecto, la invención se refiere a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma, con capacidad para inhibir la

enzima uracilo ADN glicosilasa (UDG), para su uso como un agente terapéutico.

Por razones de simplicidad, la expresión “proteína de la invención” incluye esta proteína, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma con capacidad para inhibir la enzima UDG. El término “proteína”, como se usa en el presente documento, incluye todas formas de modificaciones postraduccionales; por ejemplo, glicosilación, fosforilación o acetilación.

En una realización particular, la proteína de la invención comprende, o está compuesta de, la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1 y presenta al menos la capacidad de unirse a dicha enzima UDG e inhibir su actividad, por cuya razón se puede usar como un agente antivírico. En una realización específica, la proteína de la invención es la llamada proteína p56 del bacteriófago phi29 (ϕ 29).

En el sentido usado en esta descripción, el término “variante” se refiere a un péptido que es sustancialmente homólogo y funcionalmente equivalente a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1. Como se usa en el presente documento, un péptido es “sustancialmente homólogo” a dicha proteína cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de dicha proteína de, al menos, 60%, ventajosamente de al menos 70%, preferiblemente de al menos 85%, y más preferiblemente de al menos 95%. Igualmente, la expresión “funcionalmente equivalente”, como se usa en el presente documento, significa que el péptido en cuestión mantiene la capacidad para inhibir la actividad de la enzima UDG. La capacidad para inhibir la actividad de la enzima UDG se puede determinar mediante el ensayo descrito en el ejemplo 1 (véase la sección 1.6 de Materiales y procedimientos); de igual forma, la capacidad de un péptido o proteína para unirse al enzima UDG se puede determinar por el ensayo descrito en el ejemplo 1 (véase la sección 1.6 de Materiales y procedimientos).

En una realización particular, dicha variante es una forma mutante de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 que mantiene la capacidad para inhibir la actividad de la enzima UDG. Esta forma mutante puede tener inserciones, eliminaciones o modificaciones de uno o más aminoácidos con respecto a la proteína que comprende el SEQ ID NO: 1, con la condición de que mantenga la capacidad de inhibir la actividad de la enzima UDG.

Los ejemplos ilustrativos y no limitantes de las variantes incluidas en el alcance de esta invención, incluyen la proteína identificada en esta descripción como proteína p56FLAG, obtenida por la modificación del gen 56 (que codifica la proteína p56 de ϕ 29) de modo que codifique una proteína p56 que contenga la secuencia de aminoácidos DYKDDDDK (péptido FLAG) [SEQ ID NO: 9] fusionada al extremo C-terminal, como se describe en el ejemplo 1 (véase la sección 1.3 de Materiales y procedimientos). Mediante cromatografía de afinidad se ha mostrado que dicha proteína p56FLAG interacciona con la enzima UDG (véase el ejemplo 1).

Igualmente, en el sentido usado en esta descripción, el término “fragmento” se refiere a un péptido que comprende una parte de dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, es decir, una secuencia de aminoácidos adyacentes comprendida dentro de dicho SEQ ID NO: 1; para usar en esta invención, y dicho fragmento debe tener la capacidad de inhibir la actividad de la enzima UDG.

La proteína de la invención se puede obtener de un organismo que la produzca, usando un procedimiento que consiste en cultivar dicho organismo en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína, y recuperarla. En una realización particular de esta invención, el organismo productor es el bacteriófago ϕ 29. El ejemplo 1 describe la producción, aislamiento y purificación de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, específicamente la proteína p56 de ϕ 29, así como una variante de la misma (p56FLAG) que tiene la capacidad de unirse a la enzima UDG e inhibir su actividad enzimática.

Adicionalmente, la proteína de la invención puede ser una parte de una proteína de fusión. En relación con esto, con propósito ilustrativo y no limitante, dicha proteína de fusión puede contener una región A compuesta de un primer péptido que comprende la proteína de la invención unida a una región B que comprende un segundo péptido. Dicho segundo péptido puede ser cualquier péptido adecuado; por ejemplo, un péptido con actividad antivírica. En una realización particular, dicho segundo péptido puede ser una proteína de la invención. Dicha región B puede estar unida a la región amino terminal de dicha región A, o alternativamente, dicha región B puede estar unida a la región carboxilo terminal de dicha región A. Ambas regiones, A y B, pueden unirse directamente o mediante un péptido espaciador (conector) entre dichas regiones A y B. La proteína de fusión se puede obtener por procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la materia; por ejemplo, por la expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en células huésped adecuadas.

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

5 Se puede usar prácticamente cualquier vehículo inerte, es decir, uno que no sea perjudicial para la proteína de la invención, en la preparación de dicha composición. En una realización particular, con propósitos ilustrativos y no limitantes, dicha composición comprende una proteína de la invención y un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 7 mM y glicerol al 50%, adecuado para guardar la proteína de la invención purificada a -70°C .

10 A partir de la información proporcionada por la proteína de la invención, se puede identificar y aislar la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia; por ejemplo, creando genotecas de ADN genómico (ADNg) o ADN copia (ADNc) de organismos que producen dicha proteína; diseñando oligonucleótidos adecuados para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una región del clon genómico de los organismos productores de dicha proteína, que se puede usar para obtener sondas diseñadas para examinar dichas genotecas; y analizando y seleccionando los clones positivos.

15 Por lo tanto, en otro aspecto la invención se refiere a un polinucleótido aislado, en lo sucesivo polinucleótido de la invención, que codifica dicha proteína de la invención.

20 En una realización particular, el polinucleótido de la invención comprende, o está compuesto de, la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 2. En una realización específica, el polinucleótido de la invención codifica la proteína p56 de $\phi 29$. Alternativamente, el polinucleótido de la invención puede presentar variaciones en su secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 2; por ejemplo, sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de uno o más nucleótidos, con la condición de que el polinucleótido resultante codifique una proteína de la invención. Por lo tanto, el alcance de esta invención incluye los polinucleótidos que son sustancialmente homólogos al polinucleótido de SEQ ID NO: 2 y codifican una proteína de la invención.

25 En el sentido usado en esta descripción, un polinucleótido es "sustancialmente homólogo" al polinucleótido del SEQ ID NO: 2 cuando su secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad con respecto a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 2, de al menos 60%, ventajosamente de al menos 70%, preferiblemente de al menos 85%, y más preferiblemente de al menos 95%. Típicamente, un polinucleótido que es sustancialmente homólogo al polinucleótido SEQ ID NO: 2 se puede aislar de un organismo que produce la proteína de la invención basándose en la información contenida en dicho SEQ ID NO: 2, o se construye basándose en la secuencia de ADN mostrada en el SEQ ID NO: 2, por ejemplo, introduciendo sustituciones conservativas o no conservativas. Otros ejemplos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la eliminación de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos o en el interior de la secuencia. Se ha descrito la secuencia de nucleótidos del extremo izquierdo del bacteriófago $\phi 29$ (Yoshikawa e Ito (1982) *Gene* 17: 323-35). En relación con el SEQ ID NO: 2 de la presente invención, se ha identificado el gen 5 pero no se ha determinado el producto de este gen porque actualmente no están disponibles sus mutantes.

30 40 En otro aspecto, la invención se refiere a una construcción génica, en lo sucesivo construcción génica de la invención, que comprende dicho polinucleótido de la invención.

45 La construcción génica de la invención puede incorporar una secuencia unida operativamente, que regula la expresión del polinucleótido de la invención, constituyendo así un casete de expresión. Como se usa en esta descripción, la expresión "unida operativamente" significa que la proteína de la invención codificada por el polinucleótido de la invención, es expresada dentro del marco de lectura correcto bajo el control de las secuencias reguladoras o de control de la expresión.

50 Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, si se aplica, la traducción de la proteína de la invención, e incluyen secuencias promotoras, secuencias que codifican reguladores de la transcripción, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias de terminación de la transcripción. En una realización particular, dicha secuencia de control de la expresión es funcional en células y organismos procariontes; por ejemplo, bacterias etc., mientras que en otra realización particular, dicha secuencia de control de la expresión es funcional en células y organismos eucariontes; por ejemplo, células de insectos, células vegetales, células de mamíferos, etc. Ventajosamente, la construcción de la invención comprende además un marcador o gen que codifica un patrón o un fenotipo que permite la selección de la célula huésped transformada por dicha construcción.

55 La construcción génica de la invención se puede obtener usando técnicas que son ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook y col., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2ª ed.,

Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y, 1989 Vol. 1-3).

5 La construcción génica de la invención se puede insertar en un vector adecuado. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un vector recombinante, en lo sucesivo vector de la invención, que comprende el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención. La elección del vector dependerá de la célula huésped en la que posteriormente se introducirá. En una realización particular, el vector de la invención es un vector de expresión.

10 Con propósitos ilustrativos, el vector en el que se introduce dicha secuencia de ácido nucleico puede ser un plásmido, que cuando se introduce en una célula huésped, se integra o no en el genoma de dicha célula. Los ejemplos ilustrativos y no limitantes de vectores en los que se puede insertar el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención, incluyen el plásmido pCR2.1-TOPO (vector de expresión de *E. coli*), comercializado por Invitrogen, o el plásmido pPR53 (vector de expresión de *Bacillus subtilis*) (Bravo y Salas (1997) *J. Mol. Biol.* 269: 102-112).

15 El vector de la invención se puede obtener por procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la materia (Sambrook y col., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y, 1989 Vol. 1-3). En una realización particular, dicho vector es un vector útil para transformar células animales.

20 El vector de la invención se puede usar para transformar, transfectar o infectar células que son susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Estas células pueden ser procariontas o eucariotas. El vector de la invención se puede usar para transformar células eucariotas, tales como células de levaduras, por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*, o células procariontas, tales como bacterias, por ejemplo, de *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*. Los ejemplos ilustrativos y no limitantes de células que son susceptibles de ser transformados, transfectadas o infectadas por el vector de la invención incluyen TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), BL21 de *E. coli* (DE3) (Studier y Moffatt (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113-130), 110NA de *B. subtilis* (Moreno y col. (1974) *Virology* 62: 1-16) y YB886 de *B. subtilis* (Yasbin y col. (1980) *Gene* 12: 155-159).

30 Por lo tanto, en otro aspecto la invención se refiere a una célula huésped, en lo sucesivo célula de la invención, que es transformada, transfectada o infectada con un vector proporcionado por esta invención. La célula de la invención comprende, por lo tanto, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un casete de expresión proporcionado por esta invención o un vector de la invención, y es capaz de expresar la proteína de la invención.

35 La célula de la invención puede ser una célula eucariota, tal como una célula de levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae*, o una célula procarionta, tal como una bacteria, por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*. Los ejemplos ilustrativos y no limitantes de células que se pueden usar para obtener células de la invención incluyen TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), BL21 de *E. coli* (DE3) (Studier y Moffatt (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113-130), 110NA de *B. subtilis* (Moreno y col. (1974) *Virology* 62: 1-16) y YB886 de *B. subtilis* (Yasbin y col. (1980) *Gene* 12: 155-159).

Las células de la invención se pueden obtener por procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la materia (Sambrook y col. 1989, citado antes).

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para obtener una proteína de la invención, que comprende cultivar una célula de la invención en condiciones que permitan producir dicha proteína, y si se desea, recuperar dicha proteína del medio de cultivo. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula dependerán de la célula usada. El procedimiento para producir la proteína de la invención incluye, opcionalmente, aislar y purificar dicha proteína de la invención.

45 Como se ha mencionado antes, la proteína de la invención tiene la capacidad de inhibir la enzima UDG, por cuya razón se puede usar como un agente terapéutico; en particular, como un agente antivírico.

Por lo tanto, en otro aspecto la invención se refiere a la proteína de la invención como un agente terapéutico. En una realización particular, la invención se refiere a la proteína de la invención como un agente antivírico.

50 En general, con el fin de administrarla a un sujeto, la proteína de la invención se formulará en una composición farmacéutica. Por lo tanto, en otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica, en lo sucesivo composición farmacéutica de la invención, que comprende una proteína de la invención junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

55 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero sin limitar, mascotas, primates y seres humanos; preferiblemente, el

sujeto es un ser humano, hombre o mujer, de cualquier edad o raza.

5 Más específicamente, con el fin de administrarla a un sujeto, la proteína de la invención se formulará en una forma farmacéutica adecuada para ser administrada a un sujeto por cualquier vía de administración. Para este fin, la composición farmacéutica de la invención incluirá los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para preparar la forma farmacéutica para la administración seleccionada.

10 La composición farmacéutica de la invención comprende al menos una proteína de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz. En el sentido usado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de la proteína de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, se determinará, entre otros factores, por las características de la proteína y el efecto terapéutico que se va a conseguir.

15 Con propósitos ilustrativos, la dosis de la proteína de la invención que se va a administrar a un sujeto será una cantidad terapéuticamente eficaz y puede variar en un amplio intervalo. La composición farmacéutica de la invención se puede administrar una o más veces al día con propósitos preventivos o terapéuticos. La dosis de la proteína de la invención que se va a administrar dependerá de numerosos factores, que incluyen las características de la proteína de la invención usada, tales como por ejemplo, su actividad y semivida biológica, la concentración de la proteína de la invención en la composición farmacéutica, el estado clínico del paciente, la gravedad de la infección o patología, la forma farmacéutica para la administración seleccionada, etc. Por esta razón, las dosis mencionadas en esta invención deben considerarse sólo guías para el experto en la materia, quien debe ajustar las dosis basándose en las variables mencionadas antes.

20

25 La composición farmacéutica de la invención se puede formular en una forma farmacéutica sólida, por ejemplo (comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, supositorios, etc.), o en forma líquida (disoluciones, suspensiones, emulsiones, etc.) para administrar por cualquier vía de administración adecuada. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se administra por vía oral, rectal, tópica o parenteral (p. ej., intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc.). En cada caso, se seleccionarán los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la forma farmacéutica y vía de administración elegidas.

30 En una realización particular, la proteína de la invención se formulará en una forma farmacéutica adecuada para la administración tópica. Los ejemplos ilustrativos y no limitantes de dichas formas farmacéuticas incluyen aerosoles, disoluciones, suspensiones, emulsiones, geles, pomadas, cremas, apósitos, parches, colutorios, etc. Para este fin, la composición farmacéutica de la invención incluirá los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para preparar la forma farmacéutica. Se puede encontrar información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas para administrar la proteína de la invención, en tratados de farmacia galénica. Se puede encontrar una revisión de las diferentes formas farmacéuticas de administrar fármacos, en general, y de los procedimientos para prepararlas, en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

35

40 En otra realización particular, la proteína de la invención se formulará en una forma farmacéutica adecuada para la administración oral. En una realización particular, dicha forma farmacéutica para la administración oral de la proteína de la invención puede ser sólida o líquida. Los ejemplos ilustrativos y no limitantes de formas farmacéuticas adecuadas para administrar la proteína de la invención por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, jarabes y disoluciones, y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el estado de la técnica, tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona, etc.; cargas, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol, glicina, etc.; lubricantes para preparar comprimidos, por ejemplo, estearato magnésico, etc.; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón, celulosa microcristalina, etc.; agentes humectantes farmacéuticamente aceptables, tales como laurilsulfato sódico, etc. Se puede encontrar información sobre dichos vehículos o excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas para administrar la proteína de la invención, en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, citado antes.

45

50

55 En otra realización particular, la proteína de la invención se formulará en una forma farmacéutica adecuada para la administración parenteral (p. ej., intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc.); por ejemplo, en forma de disoluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados, en una forma farmacéutica unitaria adecuada. Se pueden usar excipientes adecuados, tales como agentes de tamponamiento, tensioactivos, conservantes, etc. Se puede encontrar información sobre dichos vehículos o excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas para administrar la proteína de la invención, en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, citado antes.

5 La producción de dichas formas farmacéuticas para administrar la proteína de la invención por cualquiera de las vías seleccionadas, se puede realizar por procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la materia, tales como los procedimientos habituales descritos o mencionados en las farmacopeas española o estadounidense y en textos de referencia similares. Con propósitos ilustrativos, se puede encontrar información sobre los procedimientos para producir dichas formas farmacéuticas para administrar la proteína de la invención, en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, citado antes.

10 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se usa como un agente antivírico, es decir, en el tratamiento y/o prevención de infecciones víricas, tales como infecciones causadas por el herpesvirus y poxvirus.

15 La composición farmacéutica de la invención se puede usar con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden ser una parte de la misma composición o suministrarse como una composición farmacéutica separada para ser administrada al mismo tiempo (administración simultánea) que la composición farmacéutica de la invención, o en diferentes tiempos (administración secuencial). En una realización particular, dichos fármacos usados en la terapia de combinación incluyen agentes antivíricos.

20 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la proteína la invención en la preparación de una composición farmacéutica antivírica, es decir, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de infecciones víricas.

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

25 En una realización particular, dicha composición farmacéutica antivírica puede contener, además de una proteína de la invención, uno o más compuestos o fármacos antivíricos adicionales, de origen proteico o no, con el fin de aumentar la eficacia de la proteína de la invención como agente antivírico, generando así una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden ser una parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, se pueden suministrar en forma de una composición separada para administrar simultánea o sucesivamente (secuenciada en el tiempo) con respecto a la administración de la composición farmacéutica de la invención.

30 El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe considerarse que limite el alcance de la misma.

EJEMPLO 1

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

I. Materiales y Procedimientos

35 **1.1 Construcción del plásmido pCR2.1-TOPO.p56**

Se usó el sistema de clonación TOPO TA desarrollado por Invitrogen. Brevemente, se amplificó una región de ADN de ϕ 29 que contenía el gen 56, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los siguientes oligonucleótidos como cebadores:

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

40 5'-GCAGGGAATTCTGCAGTCAAAGGACTTTATC-3' [SEQ ID NO: 4]

45 En esta amplificación se usó la ADN polimerasa Taq, que tiene la particularidad de añadir un resto de desoxiadenosina en los extremos 3' del fragmento amplificado (267 pb), generando de esta forma extremos salientes. Como vector de expresión inducible se usó la forma lineal del plásmido pCR2.1-TOPO, comercializado por Invitrogen; sus extremos 3' salientes tienen un resto de desoxitimidina y están unidos covalentemente a la enzima ADN topoisomerasa I del virus *Vaccinia*. Usando este sistema de clonación no son necesarias la digestión con enzimas de restricción ni el uso de la ADN ligasa, puesto que la ADN topoisomerasa I es responsable de la reacción de ligación. Posteriormente, la mezcla de ligación se usó para transformar la cepa TOP10 de *E. coli* (Invitrogen). Se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina (50 μ g/ml) y el contenido del plásmido se analizó por digestión con enzimas de restricción. El plásmido recombinante se llamó pCR2.1-TOPO.p56. La integridad del gen 50 se confirmó mediante secuenciación.

1.2 Construcción del plásmido pPR53.p56

5 El fragmento *Pst*I de 272 pb del plásmido pCR2.1-TOPO.p56, que lleva el gen 56, se clonó en el sitio *Pst*I del vector de expresión pPR53 (Bravo y Salas (1997) *J. Mol. Biol.* 269: 102-112). Para la clonación, se usó la cepa YB886 de *B. subtilis* (Yasbin y col. (1980) *Gene* 12: 151-159). Se seleccionaron los transformantes resistentes a la fleomicina (0,8 µg/ml). El plásmido recombinante se llamó pPR53.p56. La cepa YB886[pPR53.p56] produce de forma constitutiva la proteína p56.

1.3 Construcción del plásmido pPR53.p56FLAG

10 La secuencia del gen 56 se modificó por mutagénesis dirigida de modo que codificara una proteína p56 que lleva el péptido DYKDDDDK fusionado al extremo C-terminal (proteína p56FLAG). La mutagénesis se llevó a cabo en dos etapas. Primero, se amplificó el gen 56 por la PCR usando el plásmido pPR53.p56 como molde y los siguientes oligonucleótidos como cebadores:

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

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

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

20 Los oligonucleótidos cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 llevan una secuencia de reconocimiento para la enzima *Pst*I. Posteriormente, el fragmento amplificado (322 pb) se digirió con la enzima *Pst*I, y el producto de digestión de 293 pb se clonó en el sitio *Pst*I del vector de expresión pPR53 (Bravo y Salas (1997) *J. Mol. Biol.* 269: 102-112). La mezcla de ligación se usó para transformar la cepa YB886 de *B. subtilis* (Yasbin y col. (1980) *Gene* 12: 151-159). Se seleccionaron los transformantes resistentes a la fleomicina (0,8 µg/ml). El plásmido recombinante se llamó pPR53.p56FLAG. La cepa YB886 [pPR53.p56FLAG] produce de forma constitutiva la proteína p56FLAG. Posteriormente, con el fin de realizar in vivo los estudios de interacción proteína-proteína, el plásmido pPR53.p56FLAG se introdujo en la cepa 110NA de *B. subtilis* (Moreno y col. (1974) *Virology* 62: 1-16).

1.4 Purificación de la proteína p56

30 Se introdujo el plásmido pCR2.1-TOPO.p56 en la cepa BL21 de *E. coli* (DE3) por técnicas de electroporación. La cepa BL21 (DE3) [pCR2.1-TOPO.p56] se cultivó en medio LB que contenía kanamicina (50 µg/ml) a 34°C. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,9 a 560 nm (DO560), se añadió IPTG hasta una concentración final 0,5 mM. Después de 30 minutos, se añadió rifampicina (120 µg/ml) y se continuó la incubación del cultivo durante 75 minutos. El sedimento celular se mantuvo a -70°C hasta que se usó. Con el fin de purificar p56, las células se lisaron con alúmina en el tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, ácido etilendiaminatetraacético 1 mM (EDTA), β-mercaptoetanol 7 mM, glicerol al 5%) que contenía NaCl 0,65 M. Después de eliminar la alúmina y los residuos celulares por centrifugación, el lisado se incubó con polietilenimina (0,3%) durante 20 minutos y posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm en el rotor Sorvall-GSA durante 10 minutos. El sedimento se lavó con tampón A que contenía NaCl 0,7 M. Después de la centrifugación (12.000 rpm en el rotor Sorvall-SS34 durante 20 minutos), se llevaron a cabo sucesivas etapas de precipitación con sulfato amónico (saturaciones al 65%, 45% y 30%, respectivamente). El líquido sobrenadante de la última precipitación se llevó hasta una saturación final de 50%. Después de la centrifugación, el sedimento se volvió a suspender en tampón A, siendo la concentración de sal 55 mM (calculada por conductividad). La preparación de proteína se cargó en una columna Mono Q equilibrada con el tampón A que contenía NaCl 55 mM. Se eluyó la proteína p56 de la columna con NaCl 0,3 M NaCl. Finalmente, la preparación de proteína se cargó en un gradiente de glicerol (de 15% a 30%) y se centrifugó a 62.000 rpm en un rotor Beckman-SW.65 durante 20 horas. Las fracciones que contenían la proteína p56 se recogieron y se hicieron precipitar con sulfato amónico al 70%. La proteína p56 se volvió a suspender en tampón A que contenía glicerol al 50% y se almacenó a -70°C.

1.5. Inhibición de la actividad de UDG mediada por la proteína p56

Detección de la actividad de UDG en extractos de *B. subtilis*

50 Con el fin de preparar los extractos celulares, se cultivó la cepa 110NA de *B. subtilis* (Moreno y col. (1974) *Virology* 62: 1-16) en medio LB a 30°C hasta una DO560 equivalente a 108 células viables por ml de cultivo. Después, el cultivo se concentró 10 veces en tampón U (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, β-mercaptoetanol 12 mM, EDTA 1 mM) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasa obtenidos de Roche Applied Science (un comprimido de "Complete, Mini, EDTA-free" para 10 ml). El

cultivo se lisó usando la prensa de French (20.000 psi) y, a continuación, se centrifugó el lisado a 7.000 r.p.m. y 4°C en el rotor Sorvall-SS.34 durante 10 minutos. El líquido sobrenadante (extracto celular) se guardó a 4°C durante un periodo máximo de dos semanas. La concentración total de proteína en el extracto (1,35 mg/ml) se calculó por el método de Lowry.

5 Las enzimas con actividad de UDG que pertenecen a la Familia-1 eliminan los restos de uracilo tanto de ADN de cadena sencilla como de ADN de cadena doble. La eliminación del resto de uracilo genera un sitio sin base (sitio AP) en el ADN, que en *B. subtilis* es reconocido y procesado por la proteína ExoA. En ausencia de una actividad de endonucleasa AP, se puede lograr el corte y empalme de la
 10 en el extracto celular, se usó un ADN de cadena sencilla (34 nucleótidos) que llevaba un resto de uracilo en la posición 16 (sustrato ssDNA-U¹⁶). La secuencia de nucleótidos del polinucleótido ssDNA-U¹⁶ es la siguiente: 5'- CTGCAGGTGATGCGCUGTACCGATCCCCGGGTAG-3' [SEQ ID NO: 8]. Este ADN se marcó radiactivamente en el extremo 5' usando [³²P] ATP (3.000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia). La mezcla de reacción (20 µl) contenía 0,55 ng del sustrato ssDNA-U¹⁶ y la cantidad especificada del
 15 extracto celular (de 0,05 µg a 3,2 µg) en tampón U. La mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se trató con NaOH (0,2 M) y se incubó a 90°C durante 30 minutos. La muestra se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida (20%) que contienen urea (8 M). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1A.

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

1.6 Interacción de la proteína p56 con la enzima UDG

25 Con el fin de analizar si la enzima UDG es una diana celular de la proteína p56, se realizaron ensayos por cromatografía de afinidad. Brevemente, se cultivó la cepa 110NA de *B. subtilis* [pPR53.p56FLAG] en medio LB con fleomicina (0,8 µg/ml) a 30°C hasta una DO₅₆₀ equivalente a 10⁸ células viables por ml. El cultivo se concentró 10 veces en tampón de TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) y se lisó utilizando la prensa de French (20.000 psi). El lisado se centrifugó a 7.000 r.p.m. y 4°C
 30 en el rotor Sorvall-SS.34 durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se cargó en una columna anti-FLAG M2 (Sigma). Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con el tampón de TBS que contenía el péptido FLAG (500 µg/ml) (Sigma). Las proteínas eluidas se hicieron precipitar con acetona, se volvieron a suspender en el tampón de carga (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5%, glicerol la 30%) y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/Tricina/SDS (Schagger y von Jagow (1987) *Anal. Biochem.* 166: 368-379). El gel se tiñó con SyproRuby (Molecular Probes). Como control negativo, se utilizó un extracto de la cepa 110NA[pPR53]. En un segundo experimento, la proteína p56 (2
 35 µg) se incubó con la enzima UDG de *E. coli* (0,2 µg, New England Biolabs). Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la reacción se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida nativa (16%). El gel se tiñó con SyproRuby.

40 II. Resultados

2.1 La proteína p56 interacciona con la enzima UDG

45 La incubación del sustrato (ssDNA-U¹⁶) con 0,2 µg del extracto celular de *B. subtilis* generó un producto de corte y empalme. Además, los resultados muestran (Figura 1A) que dicho sustrato se cortó y empalmó completamente cuando se usaron 1,6 µg del extracto celular. Se detectó el mismo producto de corte y empalme cuando se incubó el sustrato con la enzima UDG de *E. coli* (New England Biolabs). Por lo tanto, los resultados muestran que el extracto de *B. subtilis* era capaz de eliminar el resto de uracilo del sustrato generando un sitio AP, es decir, dicho extracto tiene actividad de UDG. Sin embargo, en las condiciones ensayadas (ausencia de Mg²⁺), el extracto de *B. subtilis* carecía de actividad de endonucleasa AP, ya que no se detectó corte y empalme del sustrato cuando las mezclas de reacción no
 50 se trataron con NaOH (Fig. 1A).

2.2 La proteína p56 inhibe la actividad de UDG

55 Con el fin de demostrar que la proteína p56 es un inhibidor de la actividad de UDG, se incubó el sustrato ssDNA-U¹⁶ (0,55 ng) con 1,6 µg del extracto celular (una cantidad suficiente para obtener el corte y empalme total del sustrato) y con cantidades diferentes de la proteína p56 (entre 0,5 ng y 16 ng). Como ya se ha descrito en el apartado 1.5 de Materiales y procedimientos, las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 10 minutos, se trataron con NaOH (0,2 M) y se incubaron a 90°C durante 30 minutos. La Figura 1B muestra los resultados obtenidos. En presencia de 2 ng de la proteína p56, se

detectó una disminución en la cantidad del producto de corte y empalme. Además, el sustrato permaneció intacto al añadir 8 ng de la proteína p56. Es decir, los resultados muestran que la proteína p56 inhibe la actividad de UDG.

- 5 Como se muestra en la Figura 2A, co-eluyeron 5 proteínas (A-E) con p56FLAG. Usando la huella peptídica y el programa MASCOT (Perkins y col. (1999) *Electrophoresis* 20: 3551-3567), la proteína D se identificó como la enzima UDG (26 kDa). Se detectó una banda que se movía más rápida que la UDG libre (Figura 2B). Usando transferencia Western y la huella peptídica, se confirmó que dicha banda contenía p56 y UDG.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> INHIBIDOR DE LA ENZIMA URACILO ADN GLICOSILASA Y APLICACIONES

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

- 15 <211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 1

```

Met Val Gln Asn Asp Phe Val Asp Ser Tyr Asp Val Thr Met Leu Leu
                    5                      10                      15

Gln Asp Asp Asp Gly Lys Gln Tyr Tyr Glu Tyr His Lys Gly Leu Ser
                    20                      25                      30

Leu Ser Asp Phe Glu Val Leu Tyr Gly Asn Thr Ala Asp Glu Ile Ile
                    35                      40                      45

Lys Leu Arg Leu Asp Lys Val Leu
                    50                      55
    
```

- 20 <210> 2

<211> 171

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<400> 2

```

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

- 25

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador oligonucleótido usado para la amplificación del gen de p56 del bacteriófago ϕ 29
- <400> 3
- 5 cgcattgtat gagctttcta ggatgg 26
- <210> 4
- <211> 31
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Oligonucleótido usado para la amplificación del gen de p56 del bacteriófago ϕ 29
- <900> 4
- gcaggaatt ctgcagtcaa aggactttat c 31
- <210> 5
- 15 <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido usado para la amplificación del gen 56 por PCR usando el plásmido pPR53.p56. como molde
- 20 <400> 5
- cctctagagt cgacctgcag 20
- <210> 6
- <211> 41
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido usado para la amplificación del gen 56 por PCR usando el plásmido pPR53.p56. como molde
- 30 <400> 6
- gtcatcgta tcctatagt caggacttta tccaacctta g 41
- <210> 7
- <211> 45
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>

<223> Oligonucleótido usado para la amplificación del gen 56 por PCR usando el fragmento de 298 pb del plásmido pPR53.56 como molde

<400> 7

ccctcagggc tgcagttatt actgtcatc gtcacacctta tagtc 45

5 <210> 8

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Substrato ssDNA-U¹⁶

<400> 8

ctgcaggtga tgcgcugtac cgatccccgg gtag 34

<210> 9

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido FLAG

<400> 9

20 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma, o una variante de dicha proteína, que tiene una identidad de al menos 60% con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, la cual tiene la capacidad de inhibir la enzima uracilo ADN glicosilasa (UDG), como un agente terapéutico.
2. Proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha variante tiene una identidad de al menos 70%.
3. Proteína de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha variante tiene una identidad de al menos 85%.
- 10 4. Proteína de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha variante tiene una identidad de al menos 95%.
5. Proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, para usar en el tratamiento y/o prevención de una infección vírica.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, y un vehículo inerte.
8. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 20

FIG. 1

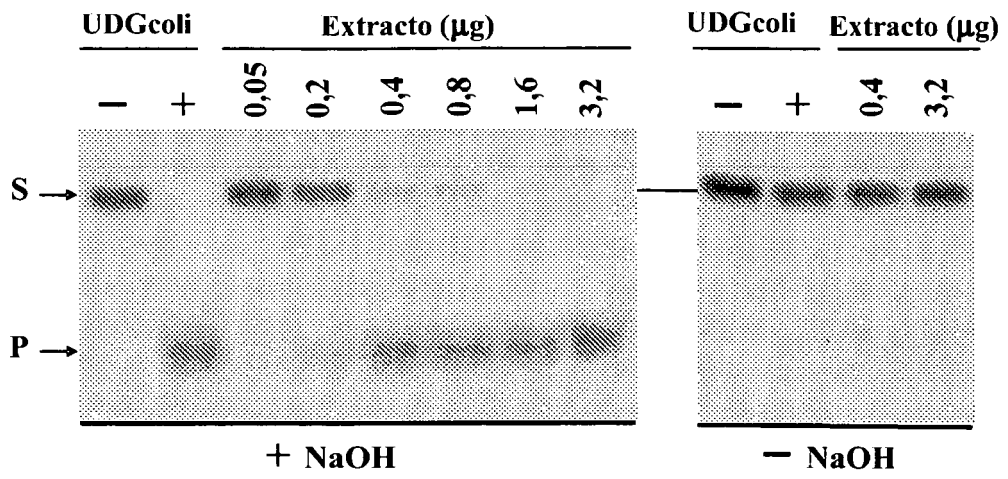


FIG. 2

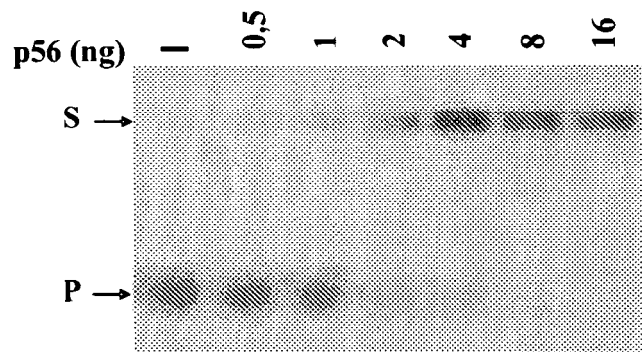


FIG. 3

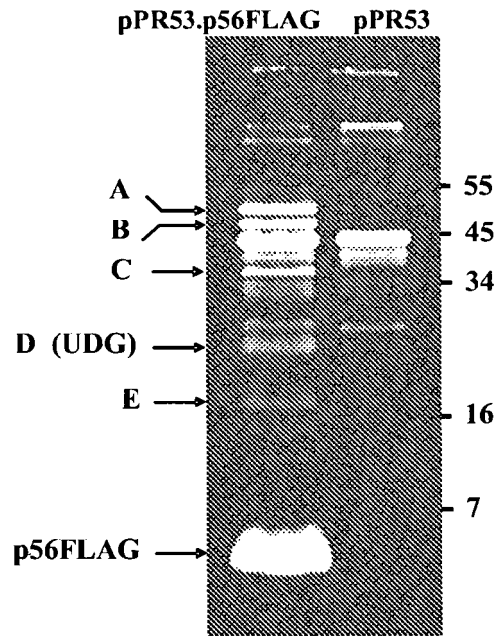


FIG. 4

