

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 362 231**

21 Número de solicitud: 200931195

51 Int. Cl.:
C07K 14/045 (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **17.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
30.06.2011

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Solà Villarrubias, María;**
Coll Capella, Miquel y
Nadal Rovira, Marta

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Secuencia expresable soluble y estructura cristalográfica del dominio nucleasa de la subunidad terminasa UL89 del citomegalovirus humano.**

57 Resumen:

Secuencia expresable soluble y estructura cristalográfica del dominio nucleasa de la subunidad terminasa UL89 del citomegalovirus humano.

La invención se refiere al péptido correspondiente a la proteína UL89-C, a la forma cristalina de dicho péptido, y al uso de los mismos para el *screening* y/o diseño de drogas antivirales para el tratamiento de infecciones causadas por herpesvirus. En la presente invención se muestra la generación de un péptido soluble que comprende la región C-terminal de la proteína UL89 (UL89-C) del citomegalovirus humano. Este péptido mantiene la actividad nucleasa de la proteína UL89 completa, presentando una elevada solubilidad, lo que permite realizar con mayor facilidad estudios de actividad, presentando así una gran aplicabilidad a la hora de buscar fármacos útiles para el tratamiento frente a infecciones producidas por herpesvirus.

ES 2 362 231 A1

DESCRIPCIÓN

Secuencia expresable soluble y estructura cristalográfica del dominio nucleasa de la subunidad terminasa UL89 del citomegalovirus humano.

La presente invención se refiere al péptido correspondiente a la proteína UL89-C, a la forma cristalina de dicho péptido, y al uso de los mismos para el *screening* y/o diseño de drogas antivirales para el tratamiento de infecciones causadas por herpesvirus.

Estado de la técnica anterior

Las infecciones víricas son uno de los mayores problemas que se presentan en los individuos inmunodeficientes, como son por ejemplo los pacientes de SIDA o los neonatos. Dentro de estas infecciones, una de las de mayor relevancia a nivel mundial es la infección por citomegalovirus.

El citomegalovirus humano (HCMV ó HHV5) es un virus perteneciente a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Betaherpesviridae* que da lugar a la infección congénita de mayor incidencia en los países industrializados. La familia de los herpesvirus incluye, además del citomegalovirus, gran variedad de virus patógenos humanos como por ejemplo, herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 o HHV-1 y HSV-2 o HHV-2), varicella zóster (VZV o HHV-3), Epstein-Barr (EBV o HHV-4), roseolovirus (HHV-6 y HHV-7) o herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV o HHV-8). Todos los herpesvirus presentan unas características comunes como por ejemplo, presentar como material genético ADN bicatenario o tener la capacidad de mantenerse en estado latente en su hospedador natural.

En la actualidad el tratamiento se realiza fundamentalmente mediante inhibidores de ADN polimerasas, aunque este método de tratamiento ha de ser mejorado ya que los fármacos implicados presentan una elevada inespecificidad, y al ser de administración sistémica, provocan efectos secundarios. Los fármacos utilizados en este sentido son, por ejemplo, ganciclovir, valaciclovir, cidofovir o foscarnet (Griffiths 2002. *J Antimicrob Chemother*, 49:243-253). Sin embargo, la mayoría de estos compuestos no ofrecen una buena biodisponibilidad, haciendo necesaria la administración de gran cantidad de ellos. Esto provoca su acumulación en diversos órganos del individuo, lo que potencia los efectos adversos de los compuestos sobre dichos tejidos. Además, al ser tratamientos crónicos, se acaba produciendo la selección de cepas del virus resistentes a los mismos (Scott *et al.* 2005. *J Gen Virol.*, 86: 2141-2151). Esto hace necesaria la búsqueda de nuevos fármacos y dianas que sean útiles para el control y eliminación de infecciones producidas por citomegalovirus. Un ejemplo de nueva diana identificada para tratar de minimizar los efectos nocivos del virus es la proteína-quinasa UL97, necesaria para el desarrollo de la infección viral (Andrei *et al.* 2009. *Infect Disord Drug Targets*; 9:201-222).

En estos organismos la replicación del ADN se lleva a cabo en el núcleo de las células hospedadoras. La replicación da lugar a una única molécula de ADN la cual presenta múltiples copias del material genético del virus. Es necesario escindir los concatémeros formados para dar lugar a múltiples moléculas individualizadas, cada una de las cuales representa una única copia completa del material genético. Estas moléculas independientes son las que acaban siendo encapsidadas dando lugar al organismo maduro. Este mecanismo de replicación y encapsidación se encuentra bastante conservado en la evolución de los virus, por lo que las proteínas implicadas en este proceso presentan homologías entre los distintos miembros de la familia de los herpesvirus.

Una de las enzimas más importantes implicadas en este proceso es el complejo terminasa. Este complejo, en el citomegalovirus humano, se encuentra formado por, al menos, 2 subunidades (UL56 y UL89) las cuales presentan diferentes funcionalidades. La función del complejo dentro del proceso de encapsidación, es la de realizar la separación de los concatémeros de la molécula de ADN formada por la replicación continua del ADN del virus. Para este proceso, resulta fundamental la participación de la subunidad UL89, ya que presenta actividad tanto nucleasa como ATPasa, y puede, de forma independiente, unirse y digerir ADN en fragmentos más pequeños.

La proteína UL89 se encuentra codificada por el gen *ul89*, formado por 2 exones y un intrón, y da lugar a una proteína de 674 aminoácidos. Esta proteína UL89 presenta subunidades homologas en el complejo terminasa de otros herpesvirus como puede ser, por ejemplo, en el complejo terminasa del virus herpes simplex 1 (HSV-1). También conserva una alta homología con la subunidad mayor del complejo terminasa de algunos bacteriófagos como por ejemplo el bacteriófago T4. Esto se debe a la alta conservación del mecanismo de encapsidación que presentan estos organismos.

Al ser una subunidad proteica tan conservada en la evolución de los virus, y encontrarse elementos homólogos en todos los herpesvirus, se convierte en un candidato ideal para ser una diana sobre la que desarrollar fármacos que permitan el tratamiento de infecciones por estos organismos. Además, presenta la ventaja de que se encuentra únicamente en células infectadas donde se da la replicación del virus, y en ningún caso en células eucarióticas no infectadas, lo que reduce los posibles efectos nocivos de los compuestos dirigidos a su inactivación en los tejidos de los individuos tratados. De esta forma, mediante tratamientos dirigidos a esta proteína, se podría evitar la producción de nuevos viriones por el bloqueo del complejo de terminación, evitando daños secundarios en las células eucarióticas del organismo hospedador.

La dificultad, en la actualidad, se encuentra en el manejo de los complejos terminasa o de la proteína UL89 de forma independiente, ya que no se expresan de forma soluble y por ello resulta complicada la experimentación sobre las mismas. La falta de solubilidad de estas moléculas hace más difícil, el estudio en sí de las mismas, así como la realización de ensayos de interacción de las terminasas con diversos compuestos químicos para estudios de actividad enzimática.

Para una correcta caracterización de las terminasas, y un completo estudio de su potencial como dianas, se hace necesario el conocimiento de su estructura tridimensional. Para esta caracterización estructural se han tratado de desarrollar diversas aproximaciones como el estudio tanto de la estructura primaria como de la secundaria de la proteína, además de su comparación con estructuras conocidas para poder obtener una idea de la conformación estructural de la misma en su forma nativa (Champier *et al.* 2007 *Antivir Ther.*, 12:217-232). Sin embargo, para llevar a cabo una caracterización correcta y precisa, a alta resolución, de la estructura tridimensional de la proteína, es necesario su estudio por cristalografía de rayos X o por resonancia magnética nuclear (RMN).

Para llevar a cabo la cristalización o el análisis por RMN, es necesario tener una cantidad mínima de proteína en forma soluble. A veces no resulta posible el aislamiento de suficiente cantidad de proteína de forma soluble debido, por ejemplo, a la baja cantidad presente en el organismo, la inestabilidad de la misma durante su purificación o su baja solubilidad. Una forma de tratar de solucionar estos problemas es la clonación del gen en organismos procariontes, u otros sistemas, para tratar de aumentar su expresión. Aun así, a veces no se aumenta de forma significativa la expresión, se producen proteínas con defectos en el plegamiento o se da agregación proteica. Para tratar de solventar estos problemas, se intentan co-expresar chaperonas con las proteínas de interés. También se usan sistemas eucariotes que permitan un procesamiento post-traduccional. Sin embargo, mediante todos estos sistemas no se ha conseguido obtener suficiente cantidad de proteína UL89 para su cristalización o análisis por RMN y su uso en ensayos de interacción y actividad. Por ello son necesarias nuevas aproximaciones para la solución de este problema.

Por otro lado, para tratar de estudiar las proteínas que presentan una baja solubilidad, se está implementando la creación de bibliotecas de fragmentos del gen que codifique para la proteína de interés, la expresión de dichos fragmentos y su análisis para obtener fragmentos de la proteína que tengan mejorada la solubilidad y permitan el estudio global de la proteína. Una de estas técnicas, es la técnica de ESPRIT (*Expression of Soluble Protein-domains by Random Incremental Truncation*) (Fogg *et al.* 2008. *Biochem Soc Trans*; 36:771-775). Mediante esta técnica se obtiene información sobre fragmentos que se pueden expresar de forma soluble y, por tanto, son susceptibles de ser cristalizados o analizados por RMN, lo que finalmente permitirá conocer la estructura de las proteínas mediante RMN y/o cristalografía de rayos X.

Por todo lo descrito, es necesario buscar tratamientos que resulten más efectivos frente a la infección por citomegalovirus para disminuir su incidencia, y reducir la gravedad de la misma en neonatos o pacientes inmunodeprimidos. Para ello es necesaria la identificación de nuevas dianas terapéuticas que permitan la inhibición de la replicación del virus. Estas dianas, además de ser útiles para el bloqueo del virus, han de ser de fácil manejo en el laboratorio para la identificación de compuestos de utilidad que actúen frente a las mismas, para permitir la realización de ensayos tanto de interacción como de actividad tras la administración de dichos compuestos. Algunas de las posibles dianas ya han sido identificadas, pero su utilización es compleja debido a su baja solubilidad, por lo que también se hace necesaria la búsqueda de un método que permita un mejor manejo de las mismas para su estudio.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al péptido correspondiente a la proteína UL89-C, a la forma cristalina de dicho péptido, y al uso de los mismos para el *screening* y/o diseño de drogas antivirales.

A pesar de ser un candidato ideal para su uso como diana para los tratamientos frente a citomegalovirus, y por lo tanto para la búsqueda de fármacos útiles frente a este organismo, la subunidad proteica UL89 presenta como gran inconveniente su baja solubilidad. Esto limita en gran medida su uso como diana ya que no permite obtener una alta expresión de la misma a través de los sistemas de expresión convencionales, y por lo tanto reduce la capacidad de realización de estudios funcionales, de determinación de la estructura o de realización de ensayos bioquímicos o de *High-Throughput Screening* (HTS) sobre la proteína en cuestión.

En la presente invención se muestra la generación de un péptido soluble que comprende la región C-terminal de la proteína UL89 (UL89-C) del citomegalovirus humano. Este péptido mantiene la actividad nucleasa de la proteína UL89 completa, presentando una mayor solubilidad, lo que permite realizar con mayor facilidad estudios de actividad, presentando así una mayor aplicabilidad a la hora de buscar fármacos útiles para el tratamiento frente a infecciones producidas por herpesvirus. Además, este aumento de la solubilidad, hace posible su análisis por RMN, su cristalización y su caracterización estructural. Pequeñas variaciones en la composición de aminoácidos en cualquiera de los extremos de esta secuencia proteica no producen alteraciones en cuanto a la actividad o a la solubilidad de dicho péptido.

Por todo ello un primer aspecto de la invención se refiere a un péptido aislado y purificado (a partir de ahora, "péptido de la invención") que consiste en una región de la proteína UL-89, empezando en uno de los aminoácidos 415 a 421 y terminando en uno de los aminoácidos 669 a 674 de la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Este péptido corresponde a la región C-terminal de la proteína UL89 del complejo terminasa del citomegalovirus humano,

y mantiene la actividad nucleasa que presenta la subunidad UL89 completa. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido de la invención empieza en el aminoácido 418 y termina en el aminoácido 674 de dicha proteína siendo la secuencia proteica de este péptido SEQ ID NO: 2. Esta secuencia SEQ ID NO: 2 corresponde a la proteína UL89-C.

La alta solubilidad del péptido de la invención hace posible una elevada producción y disponibilidad del mismo. Esto permite a su vez que se pueda producir en cantidades suficientes, mediante sistemas de expresión convencionales en procariotas, para llevar a cabo su posterior caracterización estructural por cualquiera de los métodos de la lista que comprende, sin limitarnos: resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular, microscopía electrónica o difracción de rayos X de la forma cristalina del péptido de la invención.

La cristalización del péptido de la invención, preferiblemente del péptido SEQ ID NO: 2, se podría llevar a cabo, por ejemplo pero sin limitarnos, mediante las técnicas de: gota colgante, gota sentada, microbatch, botones de diálisis, microsiembra, macrosiembra, libre difusión en interfase, contradifusión, difusión microfluídica o inducción de nucleación local. La visualización de la estructura tridimensional del cristal así obtenido podría realizarse, por ejemplo pero sin limitarnos, mediante difracción de rayos-X. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido de la invención, preferiblemente del péptido SEQ ID NO: 2, se encuentra en forma cristalina.

Se entiende por “forma cristalina” o “cristal” en la presente invención, la forma sólida en la que la estructura interna se encuentra ordenada espacialmente siguiendo una malla o red en las tres direcciones del espacio. Los átomos se posicionan de una forma tridimensional concreta, la cual se encuentra repetida múltiples veces para dar lugar a una estructura periódica mayor. La estructura básica de esta red o malla tridimensional es una estructura paralelepípeda denominada celda unidad.

Se entiende por “celda unidad” en la presente invención el agrupamiento más pequeño de átomos que conserva la geometría de la estructura cristalina, y que al apilarse dan lugar a una red cristalina o cristal con dicha estructura.

En los ejemplos de la presente invención se proporcionan las características de los cristales formados por la proteína UL89-C o péptido SEQ ID NO: 2. Estos cristales presentan en todos los casos igual estructura y funcionalidad, pero debido a variaciones en las condiciones de experimentación, inherentes a los propios experimentos, existen diferencias en el tamaño de la celda unidad en cada experimento de cristalización. Todos los cristales obtenidos en la presente invención pertenecen al sistema cristalino ortorrómbico. Por ello en una realización más preferida, el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al sistema ortorrómbico. En la presente invención, todos los cristales del sistema cristalino ortorrómbico son de celda primitiva. Por ello, en una realización aun más preferida, el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al sistema ortorrómbico donde el sistema ortorrómbico es de celda primitiva. Por otro lado, todos los cristales de la presente invención son pertenecientes al grupo espacial $P2_12_12_1$, es decir, los ángulos de la celda unidad α , β , y γ son iguales y de 90° ($\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$). Por ello, en otra realización preferida el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al sistema ortorrómbico de celda primitiva donde la celda primitiva pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$. En otra realización preferida de este aspecto de la invención el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al sistema ortorrómbico de celda primitiva donde la celda primitiva pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$, y cuyas dimensiones de celda unidad se encuentran en un rango de: a entre 80 y 85 Å, b entre 85 y 90 Å, c entre 180 y 200 Å. En una realización aún más preferida, el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$ y sus dimensiones de celda unidad son: a=82,6 Å, b=87,9 Å, c=189,4 Å. En otra realización preferida, el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$ y sus dimensiones de celda unidad son: a=82,9 Å, b=88,0 Å, c=188,3 Å. En otra realización preferida, el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$ y sus dimensiones de celda unidad son: a=83,7 Å, b=88,1 Å, c=190,7 Å. En otra realización preferida, el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al grupo espacial $P212121$ y sus dimensiones de celda unidad son: a=83,1 Å, b=87,7 Å, c=198,4 Å. En otra realización preferida, el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$ y sus dimensiones de celda unidad son: a=82,8 Å, b=87,8 Å, c=198,3 Å. En otra realización preferida, el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$ y sus dimensiones de celda unidad son: a=81,8 Å, b=87,7 Å, c=185,4 Å.

La capacidad de crear de cristales a partir de los péptidos es fundamental para el estudio de la estructura proteica y acaba derivando en el uso de estas estructuras para el diseño racional de fármacos que puedan interactuar con la proteína sin presentar impedimentos estéricos y que puedan alcanzar el centro activo para poder potenciar o bloquear su actividad. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, para la formación de cristales.

Por tanto, la solubilidad de los péptidos es una característica que les confiere una gran utilidad en el estudio de fármacos que actúen frente a los mismos, ya que mejora su manejabilidad y facilita los estudios de interacción y actividad de los mismos. Por ello, la solubilidad del péptido UL89-C, así como la posibilidad de estudiar su estructura gracias a la capacidad de formar cristales, y la presencia de la actividad nucleasa igual a la de la proteína UL89 completa de citomegalovirus, convierten a este péptido en una herramienta de gran utilidad para la búsqueda de fármacos que puedan llevar al bloqueo de esta actividad inhibiendo el ciclo del virus y por lo tanto evitando la progresión de la

infección por este patógeno. Además, la presencia de proteínas homologas a UL89 -con alta identidad de secuencia entre ellas, en particular en los aminoácidos que conforman el centro activo- en el resto de miembros de la familia de los herpesvirus, como se muestra en la figura 3 de la presente invención, supone que los fármacos que actúan frente a este péptido tengan también actividad frente a las nucleasas de los complejos terminasa de otros herpesvirus. Por todo ello, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, y/o del péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina para el *screening* y/o diseño de compuestos inhibidores de la terminasa de los herpesvirus. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el herpesvirus se selecciona de la lista que comprende: virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, varicella zóster, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, roseolovirus o virus asociado al sarcoma de Kaposi. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el herpesvirus que genera la infección es el citomegalovirus humano. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, y/o del péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina para el *screening* y/o diseño de compuestos útiles en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de infecciones provocadas por herpesvirus. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el herpesvirus se selecciona de la lista que comprende: virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, varicella zóster, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, roseolovirus o virus asociado al sarcoma de Kaposi. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el herpesvirus que genera la infección es el citomegalovirus humano.

Se entiende por “citomegalovirus humano (HCMV ó HHV5)” el virus perteneciente a la subfamilia *Betaherpesviridae* de la familia *Herpesviridae* que ataca a las glándulas salivares y otros órganos, pudiendo provocar una enfermedad grave o fatal para los individuos inmunocomprometidos. Se encuentra en muchos mamíferos, aunque preferiblemente, el citomegalovirus de la presente invención es humano. Su genoma consiste en una doble hebra de ADN de 230 Kb que contiene más de 200 marcos abiertos de lectura. Posee un diámetro de aproximadamente 200 nm y un núcleo de 64 nm rodeado por una cápside icosaédrica. Otros herpesvirus de la familia *Herpesviridae* que poseen proteínas homologas a UL89-C son el herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 o HHV-1 y HSV-2 o HHV-2), varicela zóster (VZV o HHV-3), Epstein-Barr (EBV o HHV-4), roseolovirus (HHV-6 y HHV-7) o herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV o HHV-8).

En la presente invención se entiende por “compuestos útiles en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de infecciones provocadas por herpesvirus” todos aquellos fármacos, drogas o inhibidores capaces de ejercer algún efecto negativo sobre la progresión del ciclo viral de los herpesvirus, preferiblemente del citomegalovirus. Más preferiblemente son aquellos fármacos, drogas o inhibidores capaces de interactuar con el péptido UL89-C o con su forma cristalina, alterando, reduciendo o inhibiendo por completo su actividad biológica.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta descripción, hace referencia a cualquier sustancia usada para la prevención, el diagnóstico, el alivio, el tratamiento o la curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a una preparación que comprenda, al menos, un compuesto (fármaco, droga o inhibidor) capaz de interactuar con el péptido UL89-C o con su forma cristalina alterando, reduciendo o inhibiendo por completo su actividad biológica. El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, supone combatir los efectos causados como consecuencia de una infección por herpesvirus para estabilizar el estado de los individuos o prevenir daños posteriores.

El *screening* de fármacos, drogas o inhibidores, sobre el péptido de la invención, preferiblemente sobre el péptido SEQ ID NO: 2, o sobre el péptido de la invención en forma cristalina, preferiblemente sobre el péptido SEQ ID NO: 2 en forma cristalina, se podría llevar a cabo mediante por ejemplo, aunque sin limitarnos, el primer método de la invención que se explicará más adelante en la presente descripción. Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “*screening*” se refiere a la estrategia utilizada para identificar compuestos que presenten actividad concreta sobre ciertos elementos, y que por ello permitan su uso para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades.

Por otro lado, el *screening* de drogas, inhibidores o fármacos de interés, se puede llevar a cabo, aunque sin limitarnos, mediante ensayos *in vitro* basados en la adición de diferentes concentraciones del agente inhibidor a estudiar al péptido de la invención, preferiblemente al péptido SEQ ID NO: 2, y la posterior determinación de su actividad enzimática en presencia de dichas concentraciones y en ausencia del agente inhibidor. Cualquier disminución (total o parcial) de la actividad nucleasa del péptido UL89C provocada por dicho agente por debajo de la actividad nucleasa que presenta el péptido UL89C en ausencia de agentes inhibidores, se podría considerar inhibición, y por tanto, el agente inhibidor empleado, podría ser útil para el tratamiento de infecciones provocadas por herpesvirus.

En la presente descripción se entiende por “fármaco” cualquier compuesto o composición farmacéutica purificada utilizada en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado.

Se entiende por “droga” en la presente invención toda materia prima de origen biológico que directa o indirectamente sirve para la elaboración de un medicamento. La droga puede ser todo vegetal o animal entero, órgano o parte del mismo, o producto obtenido de ellos por diversos métodos, que poseen una composición química o sustancias químicas que proporcionan una acción farmacológica útil en terapia.

ES 2 362 231 A1

Se entiende por “inhibidor” en la presente invención todo compuesto que permite reducir, bloquear o eliminar la actividad de algún elemento de interés.

Así, otro aspecto de la invención se refiere a un método de *screening* de compuestos inhibidores de la actividad de UL89-C del citomegalovirus, de ahora en adelante “primer método de la invención”, que comprende:

- a) poner en contacto el compuesto a analizar con el péptido de la invención, preferiblemente con el péptido SEQ ID NO: 2,
- b) determinar la actividad del péptido del paso (a), y
- c) comparar la actividad obtenida en el paso (b) con la actividad del péptido de la invención, preferiblemente del péptido SEQ ID NO: 2, en ausencia del compuesto a analizar.

La determinación, en el paso (b), de la actividad del péptido se puede llevar a cabo, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante métodos bioquímicos de medida de la actividad enzimática (como por ejemplo, pero sin limitarnos, por espectrofotometría o por espectrometría de masas). Aquellos compuestos capaces de producir una pérdida de función o una completa inhibición de la actividad del péptido se considerarán inhibidores y por tanto, serán compuestos útiles en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de infecciones provocadas por herpesvirus, preferiblemente, por citomegalovirus.

El diseño de drogas, inhibidores o fármacos para la inhibición de la actividad de UL89C podría realizarse, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante simulaciones tridimensionales de unión del agente inhibidor a analizar con el péptido SEQ ID NO: 2 o el polinucleótido que lo codifica, lo cual podría llevarse a cabo con un software adecuado para tal fin, y el posterior análisis de su unión al centro activo del polipéptido o a una región nucleotídica relevante para la correcta funcionalidad del péptido que codifica.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diseño de fármacos o inhibidores de la actividad de UL89-C del citomegalovirus, de ahora en adelante “segundo método de la invención”, que comprende:

- a) poner en contacto el compuesto a analizar con el péptido de la invención, preferiblemente con el péptido SEQ ID NO: 2,
- b) analizar las uniones del compuesto a analizar del paso (a) con el péptido de la invención, preferiblemente con el péptido SEQ ID NO: 2, y
- c) realizar modificaciones sobre el compuesto a analizar del paso (a) mediante la adición o eliminación de átomos o ligandos.

El análisis de las uniones del compuesto a analizar con el péptido en el paso (b) del segundo método de la invención se podría realizar, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante resonancia magnética nuclear, fluorescencia o calorimetría. Las modificaciones sobre el compuesto a analizar en el paso (c) podrían realizarse, aunque sin limitarnos, mediante técnicas químicas de adición o eliminación de átomos o ligandos que modifiquen ciertas características de interés en el compuesto de manera que lo hagan más adecuado para su uso como fármaco o inhibidor de la actividad de UL89-C del citomegalovirus.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diseño de fármacos o inhibidores de la actividad de UL89-C del citomegalovirus, de ahora en adelante “tercer método de la invención”, que comprende:

- a) difundir un compuesto a analizar dentro del péptido de la invención, preferiblemente del péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina o cristal de UL89-C,
- b) obtener la estructura tridimensional, preferiblemente por difracción de rayos X, del péptido de la invención, preferiblemente del péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina o cristal de UL89-C tras la difusión del compuesto según el paso (a),
- c) analizar las interacciones entre el péptido de la invención preferiblemente con el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina o cristal de UL89-C y el compuesto difundido en el paso (a) en base a la estructura tridimensional obtenida en el paso (b), y
- d) diseñar fármacos o inhibidores modificando el compuesto difundido en el paso (a) o diseñando otros que mimeticen las interacciones analizadas en el paso (c) entre dicho compuesto y el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, en forma cristalina o cristal de UL89-C.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diseño de fármacos o inhibidores de la actividad de UL89-C del citomegalovirus, de ahora en adelante “cuarto método de la invención”, que comprende:

- 5 a) co-cristalizar el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, con un compuesto a analizar obteniéndose así un co-cristal con ambas moléculas,
- b) obtener la estructura tridimensional, preferiblemente por difracción de rayos X, de los co-cristales obtenido en el paso (a),
- 10 c) analizar las interacciones entre el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2, y el compuesto a analizar del paso (a) en base a la estructura tridimensional obtenida en el paso (b), y
- 15 d) diseñar fármacos o inhibidores modificando el compuesto a analizar del paso (a) o diseñando otros que mimeticen las interacciones analizadas en el paso (c) entre dicho compuesto y el péptido de la invención, preferiblemente el péptido SEQ ID NO: 2.

La co-cristalización del compuesto con el péptido en el paso (a) del cuarto método de la invención, se podría llevar a cabo mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, gota colgante, gota sentada, microbatch, botones de diálisis, microsiembra, macrosiembra, libre difusión en interfase, contradifusión, difusión microfluídica o inducción de nucleación local.

El análisis de las uniones entre el compuesto y el péptido en el paso (c) del tercer y cuarto método de la invención se podría realizar, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante el software apropiado para la visualización de la estructura tridimensional del compuesto unido al péptido, tras su análisis preferiblemente por rayos X.

El diseño de fármacos o inhibidores del péptido en el paso (d) del tercer y cuarto método de la invención se podría llevar a cabo mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, técnicas informáticas encaminadas a obtener, mediante la información tridimensional proporcionada por la estructura tridimensional obtenida el paso (b) en el del tercer y cuarto método de la invención y otra información disponible obtenida por otras técnicas (por ejemplo, RMN, fluorescencia, calorimetría o resonancia de plasmón de superficie), compuestos con mejores características enzimáticas y/o de biodisponibilidad o mayor actividad frente al péptido UL89-C.

El compuesto a analizar en todos los métodos de la invención podría ser, aunque sin limitarnos, una droga, un inhibidor o un fármaco completo o bien fragmentos de los mismos. Estos fragmentos se analizan para diseccionar la funcionalidad de cada uno de los elementos que componen las moléculas completas y/o permitir un *screening* de compuestos de bajo peso molecular. Esta última técnica se denomina “*screening* de fragmentos”.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

45 Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra la identificación del dominio soluble de UL89. (A) Representación de los exones de los constructos de UL89 y UL89C. (B) Blot de expresión proteica de 18.432 deleciones aleatorias de constructos de *ul89*. Los clones se seleccionaron de experimentos de expresión basados en la eficiencia de biotinización de un péptido aceptor de biotina unido al extremo C-terminal. La detección se realiza mediante un conjugado fluorescente de estreptavidina.

Fig. 2. Representa la estructura de UL89C. (A) Estructura de UL89C mediante representación en cintas (izquierda). Los iones metálicos en el sitio activo se indican por esferas. Los elementos de dimerización son $\alpha 1$, $\beta 1$, y $\eta 1$ y la hélice ($\alpha 4$) es la de interacción con UL56. Arriba a la derecha, enmarcado, se observa en detalle el centro activo. Un ión metálico se muestra coordinado con los residuos Asp463 y Glu534. Un segundo ión metálico se muestra coordinado con los residuos Asp463 y Glu651. (B) Representación en cintas de un dímero de UL89C (izquierda) y detalle de la superficie de dimerización (enmarcado a la derecha). Los puentes de hidrógeno se muestran con líneas discontinuas. Los iones metálicos se muestran como esferas y el agua de la interfase se muestra como una molécula más oscura.

Fig. 3. Representa la superficie de UL89C y los alineamientos de secuencias de este péptido con proteínas homólogas en otros herpesvirus. (A) Conservación de la superficie de UL89C basada en un cálculo de matriz de Risler. Las regiones más oscuras corresponden a las regiones más conservadas. Las flechas blancas señalan esferas que representan iones metálicos. (B) Potencial electrostático de la superficie en la misma vista que en A. (C) Alineamiento de secuencias homólogas de UL89C y estructura secundaria de UL89C. Ocho homólogos de UL89 de herpesvirus (HHV5 UL89, HHV1 UL15, HHV2 UL15, VZV 45/42, HHV4 BGRF1-BDRF1, HHV6 U66, HHV8 ORF29 y HHV7 U60) se alinearon usando CLUSTALW (algoritmo de Blosum). Los residuos conservados se incluyen en los rectángulos. Las flechas indican residuos de sitios activos implicados en la coordinación con Mn^{2+} . Los triángulos claros indican los

ES 2 362 231 A1

residuos de la hélice $\alpha 4$ implicados en la interacción con UL56. Los triángulos oscuros indican los residuos implicados en la dimerización proteica. Las líneas muestran residuos desordenados.

Fig. 4. Muestra el detalle del sitio activo de UL89 de HCMV, RNasa H1 de humanos (Código de la base de datos de proteínas, PDB o *Protein Data Bank*, 2QKB), integrasa de HIV (código 1BL3), RuvC de *E. coli* (1HJR), gp17 de RB49 (3c6a) y la transposasa de Tn5 (1MM8). Los iones metálicos se muestran como esferas sólidas. La hélice $\alpha 6$, a pesar de ocupar una posición equivalente, se encuentra orientada de forma contraria en UL89, en gp17 y en RuvC con respecto a las otras tres enzimas (flechas pequeñas).

Fig. 5. Muestra la actividad nucleasa *In vitro* de UL89C. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: plásmido pUC18 superenrollado (sc). Carril 3: plásmido pUC18 lineal (li) tras digestión con la enzima de restricción HindIII. Carriles 4-6: La incubación de pUC18 con diversas concentraciones de UL89C purificada (3 μ M, 13 μ M y 26 μ M) produce el corte del plásmido a su conformación abierta (ni-oc), a la conformación lineal o la completa degradación del mismo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Expresión, solubilización y purificación de la proteína UL-89

El gen *ul89* de HHV5 cepa *towne* comprende dos exones (figura 1A). Estos fueron amplificados y clonados por separado y seguidamente ligados en un único constructo de ADN. Inicialmente se probó la expresión de UL89 en diferentes cepas de *E. coli*. Algunas de estas cepas estaban diseñadas para mejorar el plegamiento de la proteína recombinante mediante la co-expresión de chaperonas. Con otras cepas se pretendía mejorar la traducción del constructo, ya que presentaban codones poco frecuentes en *E. coli*. También se trató de incrementar la solubilización expresando UL89 a baja temperatura. No se obtuvo expresión de proteína soluble con ninguna de las estrategias mencionadas. Los resultados fueron similares cuando se intentó expresar UL89 en células de insecto o de mamífero. Por otro lado también se probaron diversos protocolos de replegamiento a partir de muestras de UL89 insoluble sin éxito.

La siguiente aproximación que se llevó a cabo fue expresar los diferentes dominios de UL89 separadamente. Se utilizaron diversos programas de predicción de dominios de proteínas para diseñar construcciones para cada uno de ellos. Posteriormente se llevó a cabo la expresión de estas construcciones en *E. coli* pero ninguna de ellas dio lugar a proteína soluble en cantidad suficiente para poder realizar las pruebas de cristalización.

Finalmente, para encontrar dominios solubles se utilizó un nuevo sistema de generación de bibliotecas (ESPRIT; Hart *et al.* 2006. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 62:19-26). Este sistema genera bibliotecas de deleciones del extremo 5' o del extremo 3' del gen de interés. Ambas bibliotecas (delección del extremo 5' y delección del extremo 3') fueron sintetizadas para el gen *ul89*, al cual previamente se le había eliminado el intrón que presenta en su secuencia, para dejar una secuencia que presenta únicamente los 2 exones unidos (SEQ ID NO: 3). Brevemente, para generar la biblioteca de truncamientos del extremo 5' de la secuencia, el gen fue clonado en un vector derivado del plásmido pET9a, el plásmido modificado pHAR con un sitio de corte para la proteasa TEV, una cola que incluye seis histidinas en la región amino terminal, SEQ ID NO: 4 y un péptido aceptor de biotina en el extremo carboxi-terminal SEQ ID NO: 5. La presencia de sitios de corte AatII y AscI permitieron el truncamiento unidireccional del extremo 5' del gen usando la exonucleasa III y la nucleasa *mung bean*. La recircularización del plásmido se llevó a cabo con la ligasa T4. Seguidamente, se realizó una transformación de la biblioteca de fragmentos en una cepa de clonaje de *E. coli* (Omnimax T1, Invitrogen) para la amplificación de los mismos. Para expresar los nuevos constructos, se transformó la cepa BL21-CodonPlus-RIL (Stratagene) con la biblioteca obtenida. Los constructos solubles fueron identificados con ayuda de robots tal y como esta descrito en Tarendeau *et al.* 2007. *Nat Struct Mol Biol*; 14: 229-233. Posteriormente, se analizó la expresión de proteína soluble de estas bibliotecas. Para ello 18.432 colonias (9.216 correspondientes a la biblioteca de deleciones del 5' y otras 9.216 correspondientes a la biblioteca de deleciones del 3') fueron picadas robóticamente en placas de 384 pocillos con medio TB (terrific broth) y crecidas toda la noche. Posteriormente, estos cultivos fueron usados para inocular una membrana de nitrocelulosa la cual se colocaba sobre una placa con medio LB (Luria-Bertani), biotina e IPTG. Este paso también fue realizado robóticamente. Las colonias fueron lisadas *in situ* e hibridadas con streptavidin Alexa Fluor[®]488 conjugate (Invitrogen). La detección de construcciones solubles de UL89 fue realizada utilizando medidas de biotinización del péptido aceptor de biotina que se adicionó al extremo C-terminal del gen de la UL89 (Tarendeau *et al.* 2007. *Nat Struct Mol Biol*; 14: 229-233). Mediante un escáner (fluorimager) se identificaron las colonias capaces de expresar dichas proteínas biotinizadas. Los 96 clones positivos con señal más intensa de cada biblioteca fueron seleccionados y crecidos en cultivos de 4 ml. Un número relativamente alto de clones de la biblioteca de deleciones del 3' exhibían señal positiva. Pruebas posteriores de expresión demostraron que todos ellos tenían un tamaño menor a 20 kDa. Por el contrario, la biblioteca de deleciones del extremo 5' dio diversos clones solubles de aproximadamente 37 kDa. Posteriormente, se llevaron a cabo purificaciones basadas en afinidad por níquel las cuales se realizaron robóticamente. Las muestras obtenidas fueron evaluadas por SDS-PAGE (figura

1B). De los clones de la biblioteca de deleciones del extremo 5', el más soluble de ellos, fue el denominado 48k22, y fue seleccionado para pasar a las etapas siguientes. La secuenciación de ADN reveló que se trataba del fragmento comprendido entre los residuos 418 y 674, SEQ ID NO: 2, de la proteína UL89, SEQ ID NO: 1. A partir de este momento el clon 48k22 pasó a llamarse UL89-C.

5

Ejemplo 2

Cristalización de la proteína UL-89C

10 La proteína UL89-C fue cristalizada mezclando 2 μ l de solución de proteína (10mg/ml UL89-C en 30 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl y 5 mM EDTA) con 2 μ l de solución de cristalización (10% P/V polietilenglicol 8000, 150 mM acetato de calcio y 100 mM Mes pH 6) usando el método de difusión de vapor en gota sentada. Los cristales fueron congelados en nitrógeno líquido con un 10% de polietilenglicol 400 como crioprotector. Para preparar cristales derivados con átomos pesados, los cristales de proteína nativa fueron incubados en una solución de cristalización enriquecida con 0,5 mM timerosal (etil (2-mercaptobenzoato-(2-)-O,S) mercurato(1-) de sodio, C₉H₉HgNaO₂S) durante 24 horas.

15

Un conjunto de datos de difracción de los cristales nativos fueron recogidos en la línea ID14-2 del ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) a una resolución de 2,15 ángstroms. Los cristales pertenecen al grupo espacial P2₁2₁2₁, por lo que todos los ángulos son iguales a 90° ($\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$). A pesar de que todos presentan la misma estructura y funcionalidad, pequeñas variaciones en las condiciones de cristalización, inherentes a este tipo de experimentación provocan variaciones en el tamaño de la celda unidad. Los tamaños de las celdas unidad vienen reflejados en la tabla 1.

25

TABLA 1

Dimensiones de cada eje de la celda unidad (en ángstroms) de diversos cristales de la invención

30

	a	b	c
Cristal 1	82,6	87,9	189,4
Cristal 2	82,9	88,0	188,3
Cristal 3	83,7	88,1	190,7
Cristal 4	83,1	87,7	198,4
Cristal 5	82,8	87,8	198,3
Cristal 6	81,8	87,7	185,4

45

Otro conjunto de datos de difracción del cristal derivado de mercurio fue colectado en la línea BM16 del mismo sincrotrón, a una longitud de onda de 1,00726 Å, (energía correspondiente a la absorción del mercurio determinada experimentalmente por fluorescencia). Los datos nativos y derivados de difracción fueron analizados con XDS y XSCALE (Kabsch, 1988. *J. Appl. Cryst.* 21:67-72). Las fases fueron obtenidas mediante SIRAS (*Single Isomorphous replacement Anomalous Scattering*). El programa SHARP (Vonrhein *et al.* 2007. *Methods Mol Biol* 364, 215-230) fue usado para determinar las posiciones de catorce átomos de mercurio usando datos a 3,5 ángstroms. Posteriormente las fases fueron extendidas hasta 2,15 ángstroms. El mapa resultante fue de calidad insuficiente para el trazado automático y la mayor parte de la cadena polipeptídica tuvo que construirse manualmente usando COOT (Emsley *et al.* 2004. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60: 2126-2130). Los cristales contenían cuatro moléculas de UL89-C por unidad asimétrica. Las posiciones atómicas y su B-factor asociados fueron refinados utilizando Refmac5 (Murshudov *et al.* 1997. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 53: 240-255). El modelo fue mejorado alternando ciclos de refinamiento automático y de construcción interactiva del modelo. La calidad de la estereoquímica fue evaluada con Procheck (Laskowski *et al.* 1993; *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291). En el monómero B (el más completo de los cuatro) los segmentos Leu498 - Leu501 y Arg630 - Asn647 quedaron sin trazar. Todos los datos obtenidos para el cristal 1 se muestran en la tabla 2.

65

ES 2 362 231 A1

TABLA 2

Estadística de la toma de datos cristalográficos y del refinamiento del cristal 1

	Nativo	Remojado (soaked) en Mn	Derivado de Hg
Datos			
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones celda unidad a, b, c (Å)	82,6; 87,9; 189,3	82,6; 87,9; 189,3	83,8; 88,5; 191,7
α=β=γ (°)	90	90	90
Longitud de onda	1,0000	1,0000	1,0073
Resolución (Å)	20-2,15	20-2,80	20-3,00
Nº de reflexiones medidas	439.006	104.454	209.601
Nº de reflexiones únicas	72.855	17.192	54.337
R _{meas} (%) ^{a,b}	8,0 (73,4)	11,4 (22,8)	6,5 (11,5)
R _{mrgd-F} ^c	9,6 (59,7)	14,39 (7,6)	6,5 (11,5)
I/σ ^a	11,5 (2,6)	12,5 (28,2)	17,3 (11,2)
Complejitud (%) ^a	96,3 (91,1)	49,4 (21,9)	98,5 (98,2)
Redundancia ^a	6,0 (4,1)	6,07 (5,5)	3,9 (3,9)
Refinamiento			
Resolución (Å)	20-2,15	20-2,8	
Nº reflexiones	70.771	17.823	
R _{trabajo} ^d /R _{libre} ^e	23,8/29,4	26,9/34,2	
Nº átomos	7.198	7.206	
Proteína	7.090	7.090	
Ligando/ión	7	11	
Agua	107	105	
Factor B			
Proteína	52,7	51,6	
Ligando/ión	73,2	68,445	
Agua	54,7	36,1	
Desviaciones R.M.S			
Longitudes de enlaces (Å)	0,016	0,0114	
Ángulos de enlace (°)	1,781	1,498	

(a) los datos entre paréntesis son los datos de la capa de mayor resolución. (b) $R_{meas} = [\sum_h (n_h/[n_h-1])^{1/2} \sum_i | \hat{I}_h - I_{h,i} |] / \sum_h \sum_i I_{h,i}$, donde $\hat{I}_h = (1/n_h) \sum_i I_{h,i}$ y n_h es el número de veces que se mide cada reflexión. (c) $R_{mrgd-F} = [\sum |A_{I_{h,P}} - A_{I_{h,Q}}|] / [0.5 * \sum A_{I_{h,P}} + A_{I_{h,Q}}]$ donde $I_{h,P} = (1/n_{h,P}) \sum_{i \in P} I_{h,i}$, $I_{h,Q} = (1/n_{h,Q}) \sum_{i \in Q} I_{h,i}$ y $A_I = \{ \sqrt{|I|} \text{ si } I \geq 0, -\sqrt{|I|} \text{ si } I < 0 \}$. (d) $R_{trabajo} = \sum_{hkl} | |F_{obs}| - k |F_{calc}| | / \sum_{hkl} |F_{obs}|$. (e) $R_{libre} = \sum_{hkl \in T} | |F_{obs}| - k |F_{calc}| | / \sum_{hkl \in T} |F_{obs}|$ donde T representa un conjunto de datos que comprende aproximadamente el 5% de todas las reflexiones no utilizadas durante el refinamiento.

Ejemplo 3

Estructura global de la proteína UL-89C

5 En la figura 2A se muestra la estructura cristalina de UL89-C. UL89-C exhibe una estructura globular de dimensiones aproximadas de $40 \times 35 \times 46$ ángstroms. Consta de una hoja β compuesta por ocho hebras (paralelas y antiparalelas) flanqueada por hélices α en los dos extremos. En un lado de la hoja β , interacciones hidrofóbicas empaquetan las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ con la hoja β . En el otro lado, las hélices $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$ forman un fajo que interactúa con la hoja β por interacciones hidrofóbicas por un lado de las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ y por contactos hidrofílicos hechos por la $\alpha 1$ y la $\alpha 4$ por los extremos. Dos hélices $\eta 1$ y $\eta 2$, conectan la hebra $\beta 1$ con la hebra $\beta 2$ y la hélice $\alpha 6$ con la hebra $\beta 10$ respectivamente. El orden de las hebras en la hoja β central es 1, 9, 4, 3, 2, 5, 6, 10 con topología $\downarrow\uparrow\uparrow\downarrow\uparrow\uparrow\downarrow$. En los bordes laterales de la hoja β , hay dos hebras, la $\beta 1$ y la $\beta 10$, de solo tres aminoácidos cada una. A un extremo de la hoja β , largos lazos rodean una hendidura que típicamente alberga el centro activo de las proteínas que comparten este plegamiento. Uno de estos lazos contiene una horquilla β formada por las hebras $\beta 7$ y $\beta 8$. La región entre los residuos 15 639-647 contiene un posible localizador nuclear *nls*. Los elementos de dimerización son $\alpha 1$, $\beta 1$, y $\eta 1$ y la hélice ($\alpha 4$) es la de interacción con UL56 (figura 2B).

Centro activo

20 La superposición de UL89-C con sus proteínas estructuralmente semejantes permitió identificar que el centro activo estaba ubicado en un extremo central de la hoja β , en una hendidura formada por residuos conservados, cuatro de ellos acídicos (figura 4). Una densidad electrónica residual fue observada cerca de las cadenas laterales del Asp463 y Glu534 la cual fue asignada como un catión. El residuo Asp463 está ubicado en el C-terminal de la $\beta 2$ mientras que el Glu534 está al final de la $\beta 5$. Estas dos hebras corren paralelas y se separan al final de la hoja β , donde tienen el sitio de unión al ADN. Estos dos aminoácidos acídicos se encuentran totalmente conservados. Otros dos residuos conservados, Asp650 y Asp651, están localizados en la hendidura del centro activo y probablemente coordinan un segundo metal. Estos dos residuos pertenecen a la hélice $\alpha 6$, la última hélice de la estructura, la cual está ubicada diagonalmente sobre una de las caras de la hoja β central. La posición del centro activo es equivalente al de otros miembros de la superfamilia de la RNasa-H.

30

Ejemplo 4

Ensayo nucleasa in vitro

35 Muestras de proteína UL89-C (concentración final de $2 \mu\text{M}$) fueron incubadas con 200 ng de plásmido pUC18 circular o lineal (digerido con HindIII) en una reacción con concentraciones 30 mM de tampón Tris HCl pH 8 y 50 mM de NaCl durante una hora a una temperatura de 37°C (figura 5). El ensayo *in vitro* demostró que UL89-C es capaz de degradar ADN lineal y circular. En presencia de UL89-C, el ADN circular superenrollado (se) fue convertido primero en ADN cortado en una sola cadena (ni-oc o conformación abierta), posteriormente en ADN lineal 40 (li) y finalmente fue totalmente degradado. El comportamiento observado fue similar al descrito anteriormente para la proteína UL89 entera.

45

50

55

60

65

ES 2 362 231 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido aislado y purificado que consiste en una región de la proteína UL-89, empezando en uno de los aminoácidos 415 a 421 y terminando en uno de los aminoácidos 669 a 674 de la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
2. Péptido según la reivindicación 1 que empieza en el aminoácido 418 y termina en el aminoácido 674 de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.
- 10 3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en forma cristalina.
4. Péptido según la reivindicación 3 perteneciendo al sistema ortorrómbico.
- 15 5. Péptido según la reivindicación 4 donde el sistema ortorrómbico es de celda primitiva.
6. Péptido según la reivindicación 5 donde la celda primitiva pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$.
7. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 cuyas dimensiones de celda unidad se encuentran en un
20 rango de: a entre 80 y 85 Å, b entre 85 y 90 Å, c entre 180 y 200 Å.
8. Péptido según la reivindicación 7 donde las dimensiones de celda unidad son: a=82,6 Å, b=87,9 Å, c=189,4 Å.
- 25 9. Péptido según la reivindicación 7 donde las dimensiones de celda unidad son: a=82,9 Å, b=88,0 Å, c=188,3 Å.
10. Péptido según la reivindicación 7 donde las dimensiones de celda unidad son: a=83,7 Å, b=88,1 Å, c=190,7 Å.
- 30 11. Péptido según la reivindicación 7 donde las dimensiones de celda unidad son: a=83,1 Å, b=87,7 Å, c=198,4 Å.
12. Péptido según la reivindicación 7 donde las dimensiones de celda unidad son: a=82,8 Å, b=87,8 Å, c=198,3 Å.
- 35 13. Péptido según la reivindicación 7 donde las dimensiones de celda unidad son: a=81,8 Å, b=87,7 Å, c=185,4 Å.
14. Uso del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el *screening* y/o diseño de compuestos inhibidores de la terminasa de los herpesvirus.
- 40 15. Uso del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el *screening* y/o diseño de compuestos útiles en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de infecciones provocadas por herpesvirus.
16. Uso del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 donde el herpesvirus se selecciona de la lista que comprende: virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, varicella zóster, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, roseolovirus, o virus asociado al sarcoma de Kaposi.
- 45 17. Uso del péptido según la reivindicación 16 donde el herpesvirus es el citomegalovirus humano.
18. Método de *screening* de compuestos inhibidores de la actividad de UL89-C del citomegalovirus que comprende:
50 a) poner en contacto el compuesto a analizar con un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2,
b) determinar la actividad del péptido del paso (a), y
55 c) comparar la actividad obtenida en el paso (b) con la actividad de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en ausencia del compuesto a analizar.
19. Método de diseño de fármacos o inhibidores de la actividad de UL89-C del citomegalovirus que comprende:
60 a) poner en contacto el compuesto a analizar con un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2,
b) analizar las uniones del compuesto a analizar del paso (a) con el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, y
65 c) realizar modificaciones sobre el compuesto a analizar del paso (a) mediante la adición o eliminación de átomos o ligandos.

ES 2 362 231 A1

20. Método de diseño de fármacos o inhibidores de la actividad de UL89-C del citomegalovirus que comprende:

- a) difundir un compuesto a analizar dentro de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13,
- b) obtener la estructura tridimensional del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13 tras la difusión del compuesto según el paso (a),
- c) analizar las interacciones entre el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13 y el compuesto difundido en el paso (a) en base a la estructura tridimensional obtenida en el paso (b), y
- d) diseñar fármacos o inhibidores modificando el compuesto difundido en el paso (a) o diseñando otros que mimeticen las interacciones analizadas en el paso (c) entre dicho compuesto y el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13.

21. Método de diseño de fármacos o inhibidores de la actividad de UL89-C del citomegalovirus que comprende:

- a) co-cristalizar el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 con un compuesto a analizar,
- b) obtener la estructura tridimensional de los co-cristales obtenidos en el paso (a),
- c) analizar las interacciones entre el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y el compuesto a analizar del paso (a) en base a la estructura tridimensional obtenida en el paso (b), y
- d) diseñar fármacos o inhibidores modificando el compuesto a analizar del paso (a) o diseñando otros que mimeticen las interacciones analizadas en el paso (c) entre dicho compuesto y el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

FIG. 1

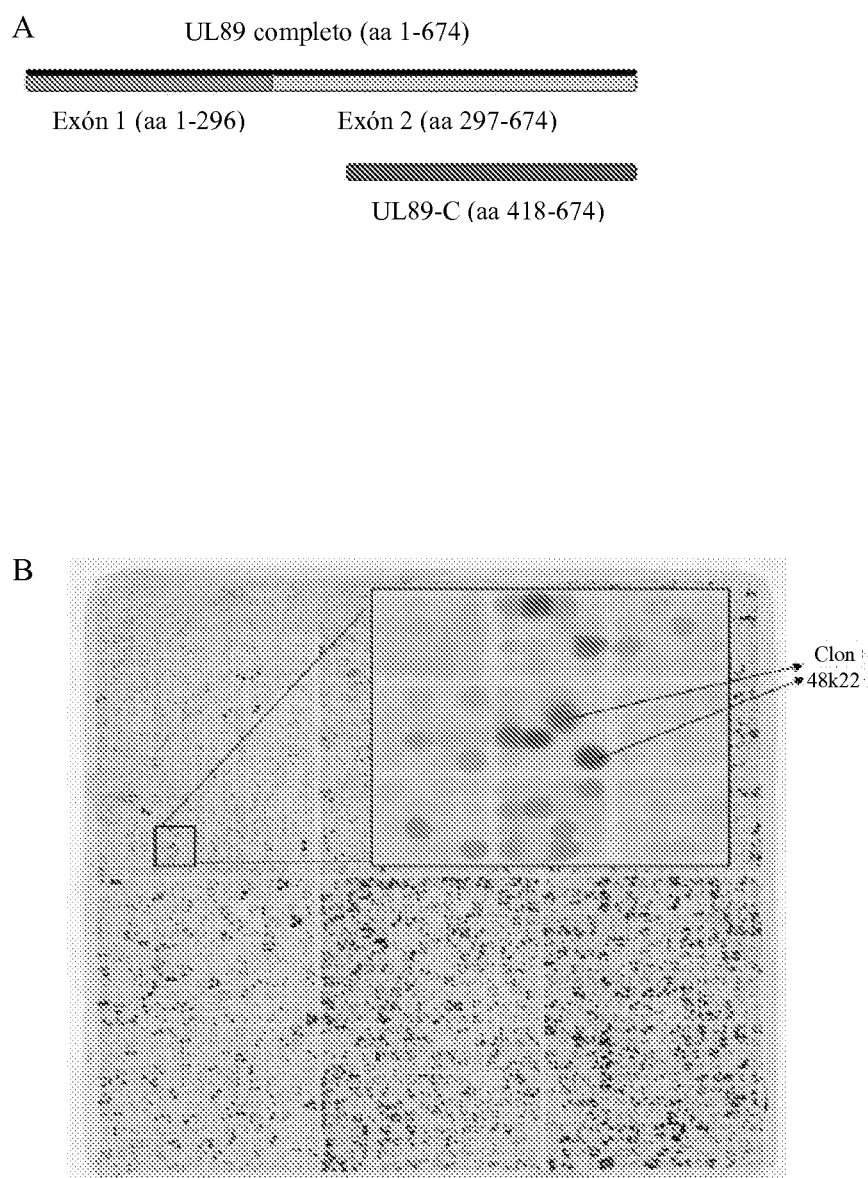


FIG. 2

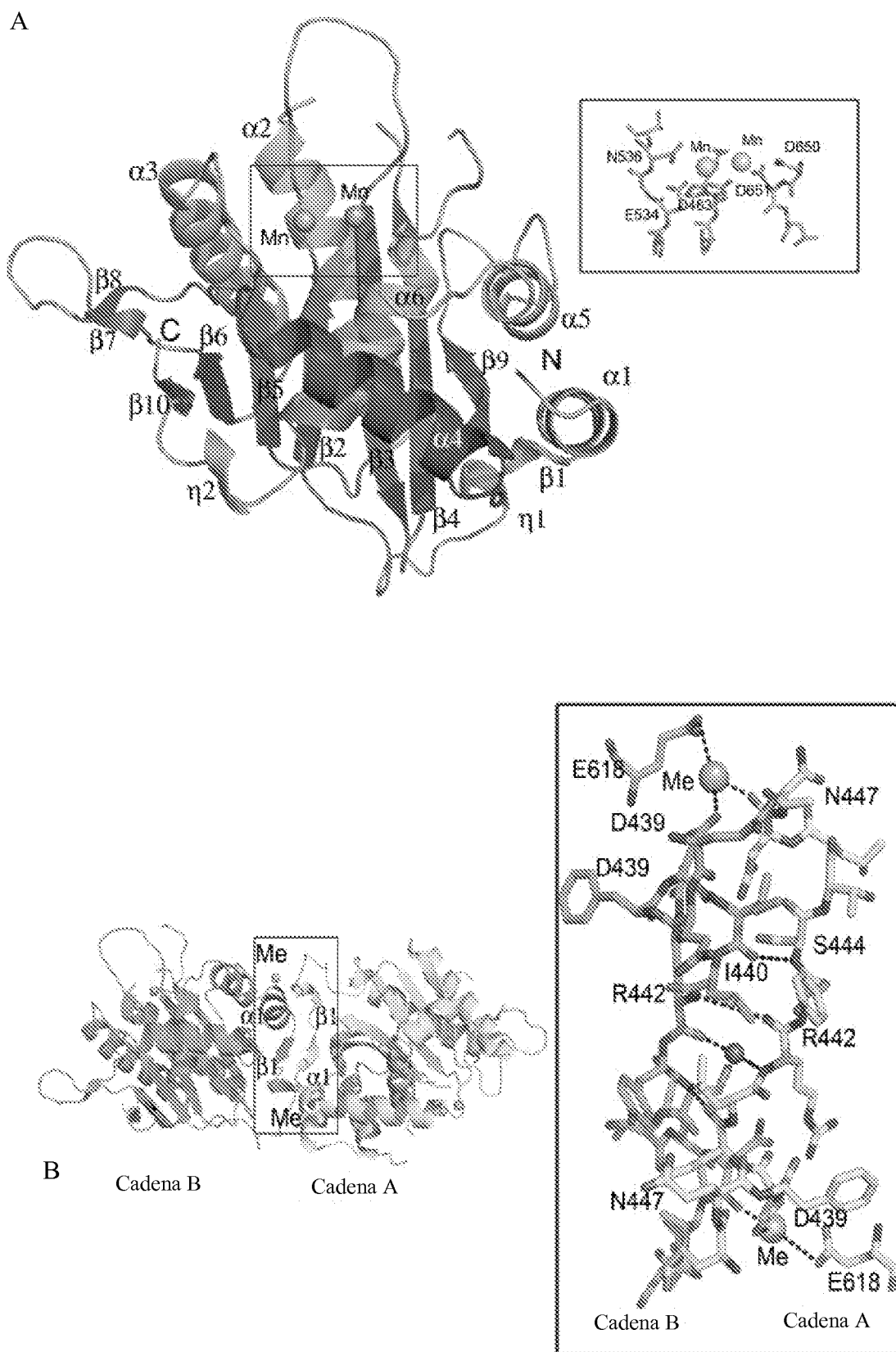
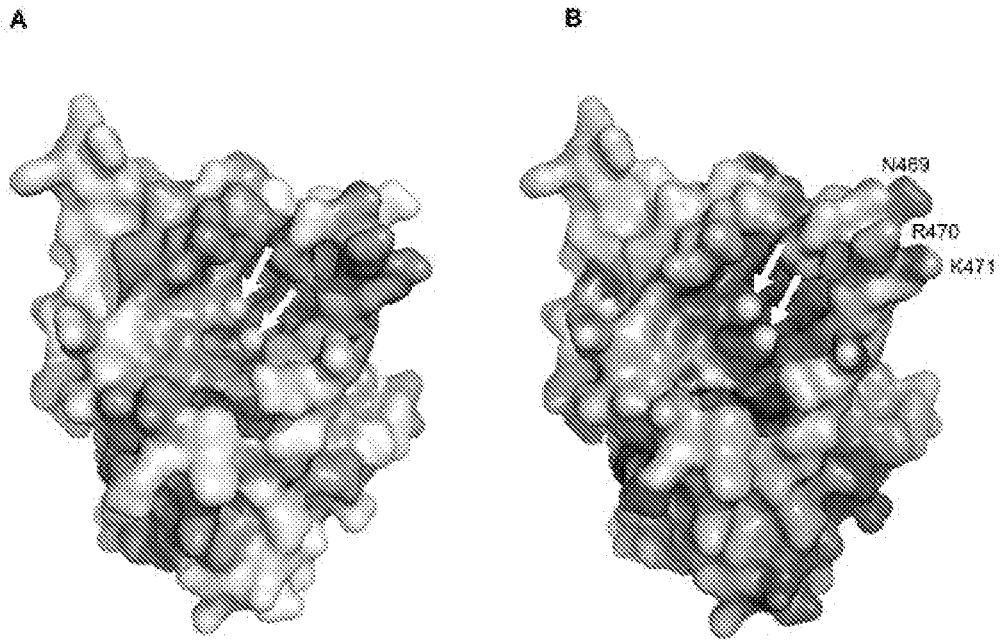


FIG. 3



C

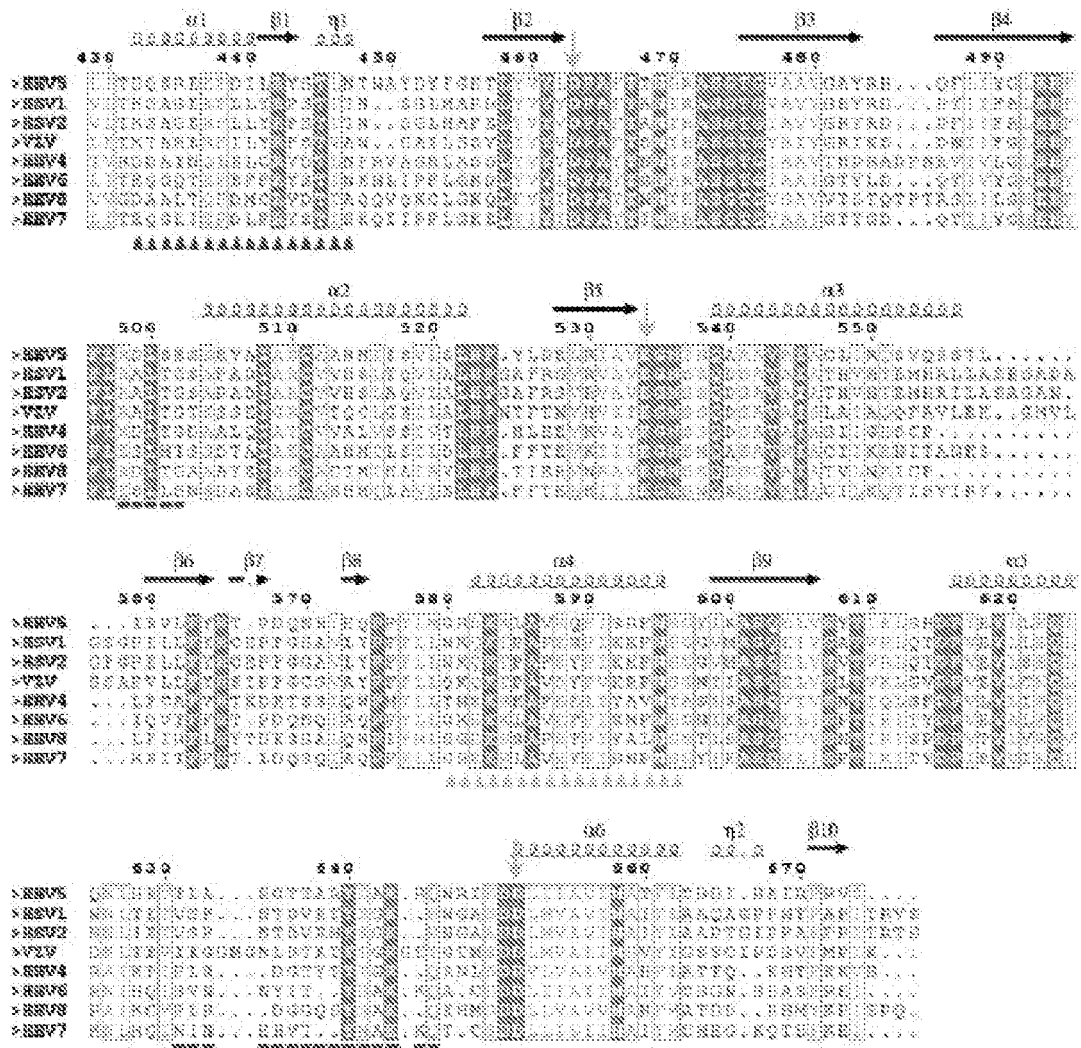


FIG. 4

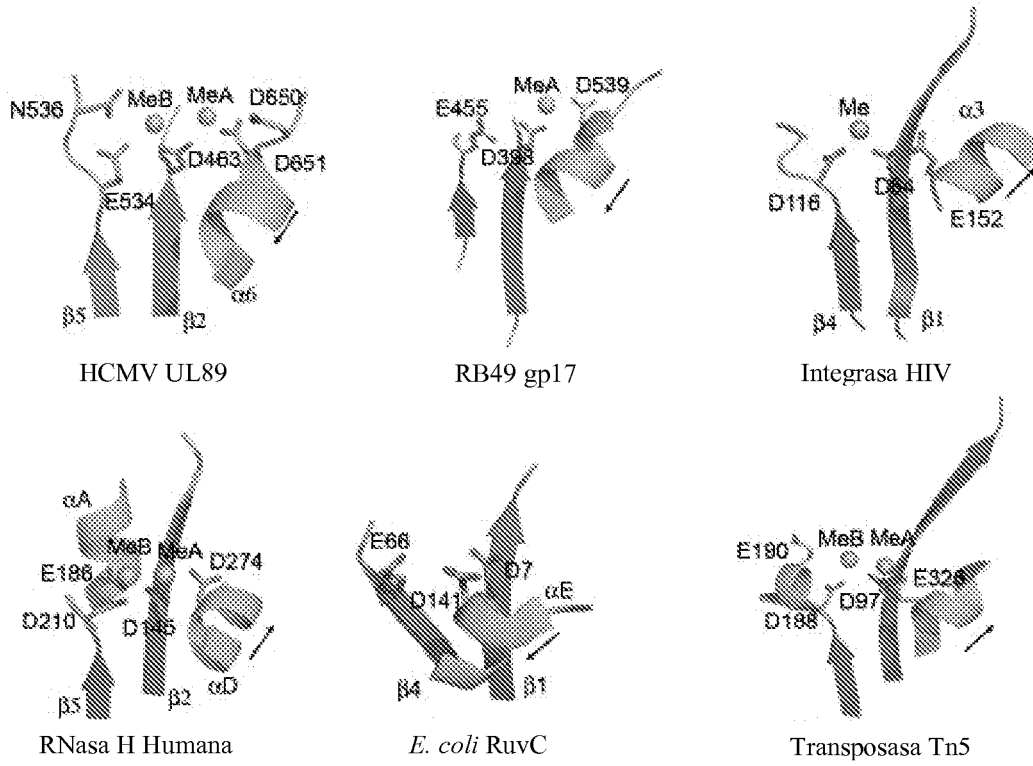
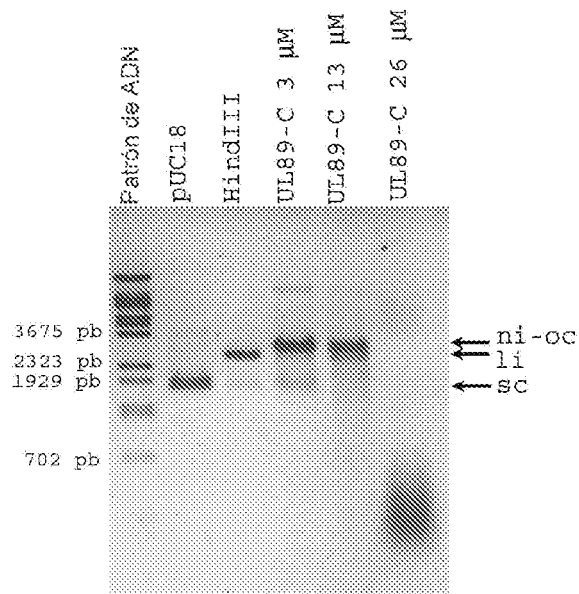


FIG. 5



ES 2 362 231 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Secuencia expresable soluble y estructura cristalografía del dominio nucleasa de la subunidad terminasa UL89 del citomegalovirus humano

<130> IP1641.484

10

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 674

<212> PRT

20

<213> *Human cytomegalovirus*

<400> 1

25 Met Leu Arg Gly Asp Ser Ala Ala Lys Ile Gln Glu Arg Tyr Ala Glu
1 5 10 15

Leu Gln Lys Arg Lys Ser His Pro Thr Ser Cys Ile Ser Thr Ala Phe
20 25 30

30

Thr Asn Val Ala Thr Leu Cys Arg Lys Arg Tyr Gln Met Met His Pro
35 40 45

35

Glu Leu Gly Leu Ala His Ser Cys Asn Glu Ala Phe Leu Pro Leu Met
50 55 60

40

Ala Phe Cys Gly Arg His Arg Asp Tyr Asn Ser Pro Glu Glu Ser Gln
65 70 75 80

Arg Glu Leu Leu Phe His Glu Arg Leu Lys Ser Ala Leu Asp Lys Leu
85 90 95

45

Thr Phe Arg Pro Cys Ser Glu Glu Gln Arg Ala Ser Tyr Gln Lys Leu
100 105 110

50

Asp Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Arg Asp Pro Gln Phe Gln Gln Ile Asn
115 120 125

55

Asn Phe Met Thr Asp Phe Lys Lys Trp Leu Asp Gly Gly Phe Ser Thr
130 135 140

Ala Val Glu Gly Asp Ala Lys Ala Ile Arg Leu Glu Pro Phe Gln Lys
145 150 155 160

60

Asn Leu Leu Ile His Val Ile Phe Phe Ile Ala Val Thr Lys Ile Pro
165 170 175

65

Val Leu Ala Asn Arg Val Leu Gln Tyr Leu Ile His Ala Phe Gln Ile
180 185 190

ES 2 362 231 A1

	Asp	Phe	Leu 195	Ser	Gln	Thr	Ser	Ile 200	Asp	Ile	Phe	Lys	Gln 205	Lys	Ala	Thr
5	Val	Phe 210	Leu	Val	Pro	Arg	Arg 215	His	Gly	Lys	Thr	Trp 220	Phe	Ile	Ile	Pro
10	Ile 225	Ile	Ser	Phe	Leu	Leu 230	Lys	His	Met	Ile	Gly 235	Ile	Ser	Ile	Gly	Tyr 240
15	Val	Ala	His	Gln	Lys 245	His	Val	Ser	Gln	Phe 250	Val	Leu	Lys	Glu	Val 255	Glu
20	Phe	Arg	Cys	Arg 260	His	Thr	Phe	Ala	Arg 265	Asp	Tyr	Val	Val	Glu 270	Asn	Lys
25	Asp	Asn	Val 275	Ile	Ser	Ile	Asp	His 280	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser 285	Thr	Ala	Leu
30	Phe	Ala 290	Ser	Cys	Tyr	Asn	Thr 295	Asn	Ser	Ile	Arg	Gly 300	Gln	Asn	Phe	His
35	Leu 305	Leu	Leu	Val	Asp	Glu 310	Ala	His	Phe	Ile	Lys 315	Lys	Glu	Ala	Phe	Asn 320
40	Thr	Ile	Leu	Gly	Phe 325	Leu	Ala	Gln	Asn	Thr 330	Thr	Lys	Ile	Ile	Phe 335	Ile
45	Ser	Ser	Thr	Asn 340	Thr	Thr	Ser	Asp	Ser 345	Thr	Cys	Phe	Leu	Thr 350	Arg	Leu
50	Asn	Asn	Ala 355	Pro	Phe	Asp	Met	Leu 360	Asn	Val	Val	Ser	Tyr 365	Val	Cys	Glu
55	Glu	His 370	Leu	His	Ser	Phe	Thr 375	Glu	Lys	Gly	Asp	Ala 380	Thr	Ala	Cys	Pro
60	Cys 385	Tyr	Arg	Leu	His	Lys 390	Pro	Thr	Phe	Ile	Ser 395	Leu	Asn	Ser	Gln	Val 400
65	Arg	Lys	Thr	Ala	Asn 405	Met	Phe	Met	Pro	Gly 410	Ala	Phe	Met	Asp	Glu 415	Ile
70	Ile	Gly	Gly	Thr 420	Asn	Lys	Ile	Ser	Gln 425	Asn	Thr	Val	Leu	Ile 430	Thr	Asp
75	Gln	Ser	Arg 435	Glu	Glu	Phe	Asp	Ile 440	Leu	Arg	Tyr	Ser	Thr 445	Leu	Asn	Thr
80	Asn	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Gly	Lys	Thr	Leu	Tyr	Val	Tyr	Leu	Asp	Pro

ES 2 362 231 A1

	1	5	10	15
5	Ser Arg Glu	Glu ₂₀ Phe Asp Ile Leu	Arg ₂₅ Tyr Ser Thr Leu	Asn ₃₀ Thr Asn
10	Ala Tyr Asp	Tyr Phe Gly Lys Thr	Leu Tyr Val Tyr	Leu ₄₅ Asp Pro Ala
15	Phe Thr Thr	Asn Arg Lys Ala ₅₅ Ser Gly Thr	Gly Val ₆₀ Ala Ala Val Gly	
20	Ala Tyr Arg	His Gln Phe ₇₀ Leu Ile Tyr	Gly ₇₅ Leu Glu His Phe Phe	Leu ₈₀
25	Arg Asp Leu	Ser Glu Ser Ser Glu Val	Ala ₉₀ Ile Ala Glu Cys Ala ₉₅ Ala	
30	His Met Ile	Ile ₁₀₀ Ser Val Leu Ser	Leu ₁₀₅ His Pro Tyr Leu	Asp ₁₁₀ Glu Leu
35	Arg Ile Ala	Val Glu Gly Asn Thr ₁₂₀ Asn Gln Ala Ala	Ala ₁₂₅ Val Arg Ile	
40	Ala Cys Leu	Ile Arg Gln Ser ₁₃₅ Val Gln Ser Ser Thr	Leu ₁₄₀ Ile Arg Val	
45	Leu Phe Tyr	His Thr Pro ₁₅₀ Asp Gln Asn His	Ile ₁₅₅ Glu Gln Pro Phe Tyr	Leu ₁₆₀
50	Leu Met Gly	Arg Asp ₁₆₅ Lys Ala Leu Ala Val	Glu ₁₇₀ Gln Phe Ile Ser	Arg ₁₇₅
55	Phe Asn Ser	Gly ₁₈₀ Tyr Ile Lys Ala Ser ₁₈₅ Gln Glu Leu Val	Ser ₁₉₀ Tyr Thr	
60	Ile Lys Leu	Ser His Asp Pro Ile ₂₀₀ Glu Tyr Leu Leu	Glu ₂₀₅ Gln Ile Gln	
65	Asn Leu His	Arg Val Thr Leu ₂₁₅ Ala Glu Gly Thr	Thr ₂₂₀ Ala Arg Tyr Ser	
70	Ala Lys Arg	Gln Asn Arg ₂₃₀ Ile Ser Asp Asp	Leu ₂₃₅ Ile Ile Ala Val Ile	Leu ₂₄₀
75	Met Ala Thr	Tyr Leu ₂₄₅ Cys Asp Asp Ile	His ₂₅₀ Ala Ile Arg Phe Arg	Val ₂₅₅
80	Ser			

65 <210> 3
 <211> 2025
 <212> DNA

ES 2 362 231 A1

<213> *Human cytomegalovirus*

<400> 3

5 atgttgcgcg gagactcggc cgccaagatc caggagcgct acgcgagct gcagaagcgc
60
aagagccacc ccacctcctg catctccacg gccttcacca atgtggcggc gctgtgccgc
120
10 aagcgctacc agatgatgca ccccgaactc gggctggccc actcgtgcaa cgaggccttc
180
ctgccgctca tggccttctg cggccgccac cgcgactaca actcggcccga ggaaagccag
240
15 cgcgagctgc tgtttcacga ggcctcaag agcgcgctcg atgaactgac gtttcgcccg
300
tgctccgagg agcagcgcgc ctctaccag aagctggacg cgttgaccga gctctaccgc
360
gatccgcagt ttcagcagat caacaacttc atgaccgact ttaaaaagtg gctcgcggc
420
25 ggcttcagta ccgccgtcga gggcgacgca aaagccatcc gactcgaacc gtttcaaaag
480
aatttattga tacacgtcat cttttttata gccgtgacca agatccccgt gctggccaat
540
30 cgcgtgctgc agtacctcat ccacgccttc cagatcgact tcctctcgca gacctccatc
600
gacatcttta agcagaaagc caccgtgttc ctggtgccgc gacgtcacgg caagacttgg
660
35 ttcacatcc ccattatctc gtttctgctt aagcacatga tcggcatcag catcggctac
720
gtggcgcacc aaaagcacgt gtcgcagttt gtgctcaaag aggtcgagtt ccgctgccgc
780
cacaccttcg cgcgcgacta cgtggctcag aacaaggaca acgtgatcag catcgaccac
840
45 cgcggcgcca agagcacggc gctttttgcc agttgctaca acaccaacag catccgagga
900
caaaaacttcc acttgctgct ggtggacgag gcgcacttca tcaagaaaga ggccttcaac
960
50 accattctgg ggttcctggc acagaatacc accaagatca tcttcatatc gtccaccaac
1020
actaccagtg acgccacgtg tttcttgacg cgcctcaaca atgcgccctt tgacatgctc
1080
aacgtggtct cttacgtgtg cgaagagcac ctgcacagct tcacggagaa gggcgacgcc
1140
60 acggcctgtc cttgctaccg actgcacaag cccaccttca tcagcctcaa ctgcaggtg
1200
cgcaagacgg ccaacatggt tatgccgggc gccttcatgg acgagatcat cggcgggtacc
65

ES 2 362 231 A1

1260

aataagatct cgaaaacac cgtgctcatc acgaccaga gccgcaaga gttcgatatt
1320

5

ttgcgttaca gcacgctcaa caccaacgcc tacgattatt tcggcaagac gctctacgta
1380

10

tatctggacc cggccttcac caccaaccgc aaggcctcgg gcacgggctg ggcggccgta
1440

gggccttacc gacaccagtt tctcatttac ggcctagagc atttcttttt gcgcgacctc
1500

15

tccgagagtt ctgaggtagc catcgccgag tgcgcggcgc acatgatcat ctcggtgctg
1560

agcctgcacc cttacctgga cgaactgcgt atcgccgtgg agggcaacac taaccaggcg
1620

20

gcggccgtgc gcatcgctg cctcatccga cagagcgtgc agagtagcac gctcatccgc
1680

gtgctcttct accacacgcc cgaccagaac cacatcgaac agcccttcta cctcatgggc
1740

25

cgcgacaagg cgctggccgt agaacagttc atctcgctt tcaactcggg ctacatcaaa
1800

gcctcgcaag agctcgtctc ctacaccatc aagctgagcc acgacccat cgagtatctt
1860

30

ctggagcaga ttcagaacct gcaccgcgtc acgctggccg aaggcacgac ggcacgctac
1920

tcggccaagc gccagaatcg tatctcggac gatcttatca tagccgtcat catggccacc
1980

35

tacctgtgtg acgagataca cgccatccgt ttcagggtca gctag
2025

40

<210> 4

<211> 22

45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

50

<223> Sonda de reconocimiento de la proteasa TEV

<400> 4

55

Met Gly His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr Glu
1 5 10 15

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
20

60

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

65

<213> Artificial Sequence

<220>



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200931195

②² Fecha de presentación de la solicitud: 17.12.2009

②³ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C07K14/045** (01.01.2006)
C12Q1/25 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BOGNER E. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. Reviews in Medical Virology. 2002, Vol.12, páginas 115-127, todo el documento.	1-21
A	CHAMPIER G. et al. New functional domains of human cytomegalovirus pUL89 predicted by sequence analysis and three-dimensional modelling of the catalytic site DEXDc. Antiviral Therapy. 2007. Vol. 12, páginas 217-232, todo el documento.	1-21
A	BUERGER I. et al. A Novel Nonnucleoside Inhibitor Specifically Targets Cytomegalovirus DNA Maturation via the UL89 and UL56 Gene Products. Journal of Virology. 2001. Vol 75(19), páginas 9077-9086, página 9077, resumen.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.12.2010

Examinador
M. García Grávalos

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BOGNER E. Reviews in Medical Virology. 2002, Vol.12, páginas 115-127.	2002
D02	CHAMPIER G. et al. Antiviral Therapy. 2007. Vol.12, páginas 217-232.	2007
D03	BUERGER I. et al. Journal of Virology. 2001. Vol 75(19), páginas 9077-9086.	2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga la obtención de un péptido que comprende la región C-terminal de la proteína UL89 (UL89-C) del citomegalovirus humano (reivindicaciones 1-2), la forma cristalina de dicho péptido (reivindicaciones 3-13) y el uso de los mismos para el *screening* y/o diseño de medicamentos para tratamiento de infecciones causadas por herpesvirus (reivindicaciones 14-21).

El documento D01 divulga al uso de las proteínas terminasas del citomegalovirus humano, pUL56 y pUL89, como posibles dianas terapéuticas, efectivas en la búsqueda de nuevos productos antivirales. Se refiere también, a que los productos inhibidores de las proteínas pUL56 y pUL89, ofrecen una buena alternativa a los de uso en la actualidad para infecciones por herpesvirus, debido a que estas proteínas no son fundamentales para la replicación del ADN de mamíferos, ya que esta no implica el empaquetamiento de concatámeros (ver todo el documento).

El documento D02 divulga nuevos dominios funcionales de la proteína pUL89 del citomegalovirus humano, relacionados con la unión y empaquetamiento del ADN, mediante el análisis de las secuencias de 25 cepas de diferentes herpesvirus y la identificación de las regiones conservadas entre ellas (ver todo el documento).

El documento D03 divulga el compuesto BAY 38-4766, inhibidor no nucleósido, específico para citomegalovirus, debido a que inhibe la replicación del ADN viral interfiriendo en la codificación de los genes UL89 y UL56 (ver página 9077, resumen)

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).

El objeto técnico de la presente solicitud es la obtención de un péptido que comprende la región C-terminal de la proteína UL89 (UL89-C) del citomegalovirus humano, su forma cristalina y su uso para *screening* de productos antivirales.

1.1. REIVINDICACIONES 1-21

El uso de la proteína terminasa UL89 del citomegalovirus humano como diana para detección de productos antivirales, especialmente herpesvirus, es conocido en el estado de la técnica, sin embargo no se ha encontrado ninguna secuencia que coincida con el péptido reivindicado, ni con la forma cristalina, ni el uso de los mismos para *screening* y/o diseño de medicamentos para tratamiento de infecciones causadas por herpesvirus.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-21 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D01-D03 se refieren al estado de la Técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención