

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 258**

51 Int. Cl.:
C07K 14/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08843012 .9**
96 Fecha de presentación: **20.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2203468**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2010**

54 Título: **NUEVOS PÉPTIDOS ANTIVIRALES DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA AFRICANA QUE IMPIDEN LA UNIÓN DEL VIRUS A DLC8.**

30 Prioridad:
24.10.2007 ES 200702792

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2012

73 Titular/es:
**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA
CAMPUS DE PUERTA DE HIERRO I. AUTOVÍA A6
KM. 7,5
28040 MADRID, ES y
ALTERNATIVE GENE EXPRESSION, S.L.**

72 Inventor/es:
**ALONSO MARTÍ, Covadonga;
HERNÁEZ DE LA PLAZA, Bruno y
MARTÍNEZ ESCRIBANO, José Ángel**

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

ES 2 373 258 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

Nuevos péptidos antivirales del virus de la fiebre porcina Africana que impiden la unión del virus a DLC8

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo técnico del desarrollo de nuevos compuestos antivirales y su uso en la prevención o tratamiento de infecciones por virus en animales o seres humanos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los virus son parásitos intracelulares que requieren de la integridad de ciertas funciones celulares para que su ciclo replicativo dentro de las células pueda realizarse con éxito. La dineína ha demostrado tener un papel relevante en distintos pasos de la infección de virus en diferentes modelos virales tales como el virus de la rabia, el virus Herpes simple humano tipo I o el virus de la inmunodeficiencia humana. La dineína es una proteína motora microtubular, que interviene en el transporte intracelular ligado a microtúbulos y la ruta endosomal es moduladora de diferentes vías de traducción de señales intracelulares, entre otras funciones. Los virus utilizan la dineína para su internalización y transporte intracelular, para la formación de la factoría vírica donde se van a producir los nuevos viriones y para la regulación de la señalización celular necesaria en la coordinación de estos y otros procesos.

En particular, la proteína p54 del virus de la Peste porcina africana (VPPA), interacciona con una proteína celular que es parte del complejo motor microtubular llamado dineína y su función está relacionada esencialmente con el transporte intracelular [1]. Esta interacción se encontró empleando el sistema de doble híbrido en levaduras (un sistema heterólogo), buscando proteínas interactoras en una genoteca de ADNc de macrófagos porcinos con respecto a posibles proteínas de interacción de la proteína vírica p54. La secuencia codificante para p54 (gen E183L) está incluida en la secuencia completa del aislado BA71V, depositada en la base de datos del NCBI con número de acceso [U18466](#). Los clones obtenidos e identificados como positivos se secuenciaron para descubrir que contenían la secuencia codificante completa de la cadena ligera de la dineína de 8 kilodaltons (kDa), llamada DLC8, LC8, DLC1, DNLC1 o PIN (proteína inhibidora de la sintetasa del óxido nítrico neuronal). La secuencia codificante para DLC8 en *Sus scrofa* se ha depositado en la base de datos del NCBI con el número [AF436777](#). Posteriormente este resultado se corroboró utilizando otro tipo de técnicas incluyendo cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación y colocalización de ambos componentes mediante microscopía confocal. Los resultados obtenidos confirmaron la interacción entre p54 de VPPA y DLC8.

DLC8 es una proteína con una secuencia nucleotídica y aminoacídica altamente conservada entre especies evolutivamente distantes (desde nematodos al hombre) [2, 3]. Las dineínas citoplásmicas son una familia de motores moleculares que conducen cargas diferentes a lo largo de los microtúbulos. Se encargan del transporte de vesículas, endosomas y orgánulos desde el exterior de la célula al interior, a la zona nuclear o perinuclear. Son grandes complejos multiproteicos, constituidos por de una a tres cadenas pesadas con una cabeza globular y actividad ATPasa, que son responsables de generar la energía necesaria para producir movimiento. Unidas a estas cadenas pesadas hay un número variable de cadenas intermedias y de cadenas ligeras. Estas últimas son responsables de interaccionar directamente con la carga a transportar. Se han descrito, hasta la fecha, siete familias de cadenas ligeras, entre las que podemos encontrar a DLC8. DLC8 se encuentra dispuesta como un dímero *in vivo*, lo que permite la existencia de dos lugares idénticos de unión a diferentes secuencias entre ambos monómeros.

Con respecto a la proteína celular, se han descubierto para DLC8 [12, 13] dos tipos de lugares preferenciales de unión con las proteínas celulares con las que interaccionan. Uno de los motivos (Lys/Arg)XThrThr (siendo X un amino ácido cualquiera) se une a DLC8 con una serie de moléculas tales como la cadena intermedia de la dineína, la molécula proapoptótica Bim, los factores de transcripción Kid1 y Swallow y algunas proteínas virales de diverso origen. Este sitio de unión está localizado entre los dos dímeros de la molécula de DLC8. El segundo motivo es: Gly(Ile/val)GlnValAsp que une a DLC8 con la óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS) o con la proteína de armazón neuronal, como se ha descrito hasta la fecha.

Para identificar los restos aminoacídicos requeridos para la unión de la proteína viral a dineína, se expresaron varios fragmentos truncados de la proteína p54 y se ensayaron en el sistema de levadura para determinar que la zona de unión a DLC8 se localiza en el extremo carboxi terminal de la proteína p54 en 13 aminoácidos comprendidos entre Tyr149 y Thr161 (TyrThrThrThrValThrThrGlnAsnThrAlaSerGlnThr) [1].

Varios virus utilizan la cadena ligera de la dineína (DLC8) en distintas etapas de su ciclo infeccioso en el interior de la célula hospedadora. Por una técnica llamada pep-scan, se sintetizaron péptidos que se asemejaban a las secuencias lineales de diferentes proteínas de origen viral, se transfirieron al papel de filtro y se exploró con DLC8 para determinar que secuencias lineales eran adecuadas para esa interacción [10]. Las secuencias lineales que aparecen a continuación serían teóricamente adecuadas para unión a DLC8. Estas contienen frecuentemente restos de Gln (Q), con frecuencia con un resto de T (Thr) contiguo en la secuencia:

- El motivo TyrAlaSerGlnThr de la proteína p54 del virus de la Peste porcina africana

- El motivo TyrSerThrGlnThr de la glicoproteína de unión del virus respiratorio sincitial
- El motivo LysSerThrGlnThr de la proteína P del virus de la rabia y del virus Mokola, de la helicasa del virus del herpes simple humano, de la proteasa de adenovirus, o del entomopoxvirus A. moorei.
- El motivo LysGlnThrGlnThr de la proteína E4 del virus del papiloma humano o de la polimerasa del virus vaccinia.
- El motivo LysGlnThrGlnThr del gen U19 del virus del herpes humano
- El motivo ArValMetGlnLeu de la proteína de la cápsida del virus coxackie humano, etc.

Incluso aunque se ha descubierto que algunas secuencias proteicas virales lineales son teóricamente capaces de unirse a DLC8, esto no excluye que todas estas secuencias deberían ser adecuadas para la interacción de la forma de proteína nativa o cuando la moléculas se integra en el complejo motor *in vivo*. Además no se demuestra que esas secuencias virales se expongan de algún modo en la partícula viral ni que sus sitios de unión potenciales sean capaces de unirse a DLC8 de hecho y/o si estas proteínas virales se sintetizan en compartimentos celulares accesibles para dineína durante la infección tales como el citosol (no retículo endoplásmico u otros orgánulos y estructuras separada). Además, no se ha demostrado hasta la fechas que ninguna de estas secuencias lineales sean capaces de bloquear la unión de una proteína dada a DLC8 por ningún medio y, finalmente, nada garantiza que el bloqueo de este sitio de cómo resultado inhibición de la infección. De hecho, hay dos sitios de unión potenciales por molécula de DLC8 como se ha descrito anteriormente y hay varias otras cadenas ligeras e intermedias que podrían usarse como alternativa por cualquier virus. En resumen, ninguno de estos hallazgos demuestra que el bloqueo de este sitio interrumpiría la interacción ni obstaculizaría la infección por virus y nada garantiza que las secuencias anteriormente mencionadas pudieran ser útiles como compuestos antivirales.

Además, para que cualquier péptido sea candidato a usarse como agente antiviral, debería alcanzar por algún medio el ambiente intracelular de forma adecuada y también debe asegurarse toxicidad nula o muy baja en las células vivas. El hecho de que las secuencias de aminoácidos puedan identificarse como implicadas en la unión entre proteínas virales y DLC8, cuando esas secuencias permanecen en estructura primaria (lineal) no excluye que esas secuencias lineales inhiban la interacción de proteína viral y DLC8 y, en consecuencia, los péptidos que comprenden esas secuencias de aminoácidos pueden actuar como compuestos antivirales. Ambas superficies de interacción deberían analizarse (por ejemplo por sus espectros de resonancia magnética nuclear) para diseñar una secuencia peptídica adecuada para bloquear la interacción proteína-proteína. La razón para eso está en el hecho de que las secuencias de aminoácidos lineales, cuando se pliegan en estructura de mayor complejidad en la célula, por ejemplo, unidas a un complejo macromolecular llamado el complejo motor microtubular, puede ocultar los restos aminoácidos implicados en la unión con DLC8 o la proteína viral y, por lo tanto, los péptidos plegados en estructura secundaria no mostrarían ninguna actividad antiviral. Además una secuencia definida que *in vitro* o en un sistema heterólogo como levadura estaría implicada en la unión podría no exponerse en el contexto de la partícula viral y/o podría sintetizarse en un orgánulo o estructura separada, haciéndola inaccesible a la proteína celular en la infección en células de mamífero. En todos estos casos, un péptido teóricamente capaz de bloquear la interacción no mostraría ninguna actividad antiviral. Una razón adicional es que los péptidos lineales cuando se disuelven en el citosol celular tienen tendencia a formar agregados que, a su vez, ocultarían de nuevo los aminoácidos responsables de la unión a DLC8 o a proteínas virales. Esos péptidos agregados no mostrarían propiedades antivirales. Otro aspecto importante en el diseño de nuevos péptidos antivirales se refiere a su toxicidad en células no infectadas. Una sustancia antiviral comercial debería evitar y/o inhibir la infección viral pero, preferiblemente, sin afectar a la viabilidad celular y proliferación celular de las células no infectadas. En último lugar pero no menos importante, la invención ha descubierto que los aminoácidos que rodean los motivos implicados en área de unión con proteínas virales DLC8, y particularmente su hidrofobicidad, desempeñan un papel importante en la capacidad de inhibición de unión de esos péptidos, a considerar como verdaderos compuestos antivirales. Los péptidos antivirales para conseguir una inhibición eficaz de unión de proteínas virales con DLC8 deben disolverse completamente en el citosol celular y, en consecuencia, la hidrofobicidad y contenido de prolina de los aminoácidos cercanos a los motivos de unión es crucial.

Por todas estas razones, es necesario generar estrategias antivirales para bloquear la infección de dichos virus por interferencia con el uso que los virus hacen de la dineína celular, es decir bloqueando su función o los sitios de unión que permiten que las diferentes proteínas de origen viral usen la dineína de forma adecuada. Sin embargo, aunque se repiten algunas secuencias de aminoácidos parciales solapantes presentes en esos virus como motivos de unión para DLC8, como KSTQT o GIQVD, también es importante inspeccionar los restos cercanos para evaluar si la interacción virus-DLC8 efectivamente tendrá lugar. Se evaluaron cambios específicos en esos aminoácidos con respecto a sus capacidades para suprimir la interacción con DLC8.

Los inventores han demostrado usando un modelo viral (virus de la peste porcina africana, VPPA), que la intervención del sistema DLC8-dineína implica el bloqueo de la infección que proporciona el ensayo principal para una nueva estrategia antiviral que constituye el objeto de la presente invención.

Los inventores han comparado los dominios de interacción de algunas de las proteínas implicadas en la interacción y sus secuencias flanqueantes y esta información se ha usado para diseñar péptidos que actúan como los antagonistas principales de la interacción del par de proteínas que interaccionan pero que, a la vez, se marcan para alcanzar el ambiente intracelular de forma adecuada y cumplir con todos los requisitos que un compuesto antiviral

debe cumplir, principalmente como se ha indicado previamente: inhibición específica de la unión proteínas virales-DLC8 en determinadas condiciones, accesibilidad y solubilidad en el citosol celular, no formación de agregados y no intervención en la viabilidad celular y capacidad proliferativa (sin toxicidad celular).

- 5 En conclusión, la presente invención describe por primera vez el uso como compuestos antivirales de péptidos, que se diseñaron basándose en la secuencia (total o parcial) por la que un virus se une a dineína DLC8, como una etapa necesaria para éxito de la infección y se muestra que esos péptidos son eficaces inhibiendo la infección viral en células susceptibles y que tienen un efecto antiviral demostrable. La inhibición de la interacción virus-DLC8 se refleja en una inhibición del efecto citopático viral y una reducción drástica del número de células infectadas. Además, el efecto antiviral de este compuesto se midió cuantitativamente para comparar su eficacia relativa con PCR cuantitativa en términos de reducción de las copias de genomas virales por célula (que refleja la reducción de la replicación viral en ng/ μ l hallada en la célula) y también se midió la reducción consecuentemente significativa de la producción de virus y de la síntesis de proteínas virales. La invención se ejemplifica por péptidos producidos basándose en la secuencia de p54 de diversos aislados de VPPA que evitan que la infección progrese, que son la base de una terapia antiviral.

Leyendas de las figuras

20 Figura 1. Diseño de péptido antiviral. Basándose en comparación de análisis de secuencia de la proteína viral de VPPA p54 presente en diferentes aislados virales de diversos orígenes, los inventores diseñaron un conjunto de péptidos (Tabla 1) incluyendo el motivo conservado y seleccionando las secuencias flanqueantes más favorables entre las de hecho presentes en la proteína viral con variaciones entre diferentes aislados virales.

25 Figura 2. Dinámica de RMN de interacción e interrupción por un péptido activo. A. Obtención y purificación de DLC8 marcada con ^{15}N y p54 para análisis de RMN. Espectros de HSQC ^1H - ^{15}N de DLC8 marcada con ^{15}N en diferentes puntos de titulación: B, DLC8 libre; C, DLC8 libre (espectro negro) y con 2 equivalentes de p54 no marcada (espectro gris); D, DLC8 libre (espectro negro) y con 5 equivalentes de péptido PS19 y 2 equivalentes de p54 no marcada (espectro gris) y con 2 equivalentes de p54 no marcada (espectro gris).

30 Figura 3. Demostración de la internalización de péptido en células. Distribución de péptido COVA2 marcado con fluoresceína (SEQ ID NO: 7) en células Vero incubadas durante 1 y 3 horas con diferente concentración de construcciones peptídicas ligadas a un transportador molecular rico en arginina (COVA2). El péptido marcado con FITC (COVA2) se internaliza en el 100 % de las células a una concentración de péptido $100\ \mu\text{M}$.

35 Figura 4: Esquema de infección viral de células e inhibición de dicha infección por acción de los péptidos COVA1 (SEQ ID NO: 6) de la invención. 1.- Células Vero cultivadas a una densidad de $9 \times 10^4/\text{cm}^2$ la noche anterior en DMEM 5 %. 2.- Se añaden $300\ \mu\text{l}$ de soluciones con diferentes péptidos en el rango 0 a $100\ \mu\text{M}$ en DMEM SC durante 1 h a $37\ ^\circ\text{C}$ para internalización de los péptidos. 3.- Infección con 1 ufp/célula de BA71V. 4.- Absorción de 2 h a $37\ ^\circ\text{C}$. 5.- Eliminación del virus residual con 2 lavados con 11 ml de DMEM SC. 6.- Transcurso de la infección desde 6 a 18 h post-infección en DMEM + péptidos. 7.- Detección de células infectadas.

45 Figura 5. Comparación de actividad antiviral de péptidos antivirales y de control por efecto citopático. Presentación por microscopía convencional (aumento 100x) de la inhibición del efecto citopático de VPPA en presencia de concentraciones crecientes de péptidos antivirales (RS27 -SEC ID NO: 3- y PS19 -SEC ID NO: 2-) en las columnas 1 y 2, controles (RS28 -SEC ID NO: 5- y SS20 -SEC ID NO: 4-) en las columnas 3 y 4 y en ausencia de péptidos en la columna 5.

50 Figura 6. Tratamiento con péptido antiviral y número de células infectadas por inmunofluorescencia. La figura 6A muestra los porcentajes de células infectadas a 6 hpi con concentraciones crecientes de péptidos inhibidor (COVA2 -SEC ID NO: 7-) y de control (RS28) marcados con un anticuerpo contra p30 de VPPA. B muestra una fotografía representativa de ensayos de inmunofluorescencia de células infectadas incubadas con $5\ \mu\text{M}$ y $50\ \mu\text{M}$ de péptidos COVA2 y RS28.

55 Figura 7. Tratamiento de péptido antiviral y síntesis de proteínas virales. Análisis de síntesis de proteínas tempranas (p30) y tardías (p72) con diferentes concentraciones de COVA1 (SEQ ID NO: 6) durante 1 y 3 horas. A, muestra un gel representativo de transferencia de Western de proteínas p30 y p72 y B muestra la cuantificación de proteínas p30 y p72 por densitometría.

60 Figura 8. Tratamiento de péptido antiviral y cuantificación ADN viral de PPA por PCR cuantitativa. Efecto de la replicación de ADN de VPPA a 16 hpi después del tratamiento con concentraciones crecientes de péptido inhibidor (COVA21, PEP1 -SEC ID NO: 9- y PEP3 -SEC ID NO: 8-) en comparación con péptido control RS28. Los péptidos que contienen otras secuencias de unión a DLC8 (PEP1 y PEP3) también se representan en esta figura que indica que la secuencia de COVA1 es eficaz desde concentraciones peptídicas más bajas.

Figura 9. Efecto del péptido antiviral en la producción de virus. Efecto en titulaciones de virus intracelular (A) y extracelular (B) recuperados después de 36 hpi con concentraciones crecientes de péptido inhibidor COVA1 (cajas negras) en comparación con el péptido de control RS28 (cajas blancas).

5 Figura 10. Ausencia de citotoxicidad de los compuestos. El índice proliferativo de células Vero no se modifica después de 36 horas de incubación del péptido antiviral (COVA1) y el de control (RS28) a diferentes concentraciones.

10 Figura 11. Preservación de estructuras celulares después de internalización peptídica. Una fotografía representativa de microscopía confocal de células Vero tratadas con péptido COVA2 a diferentes concentraciones durante 1 y 3 horas. Las imágenes muestran la arquitectura del citoesqueleto de microtúbulos conservada (tubulina) (columna izquierda) en células no tratadas y en células tratadas con concentraciones crecientes del péptido marcado con FITC (columna derecha).

15 Figura 12. Conservación de la morfología y formación del huso durante la mitosis. Una fotografía representativa de microscopía confocal de células Vero tratadas con control (A) y péptido inhibidor COVA1 (B). Las fibras de tubulina que forman el huso mitótico durante la división celular en diferentes etapas en células tratadas con péptido de control (A) y (B). La viabilidad y capacidad proliferativa de las células no se ven afectados por tratamiento peptídico.

20 Figura 13. Patrón de distribución celular de péptido COVA2 marcado con fluoresceína. El péptido se une a uno de los sitios de carga de DLC8 y el péptido fluorescente se colocaliza con DLC8 precisamente en su compartimento dinámico tal como proyecciones celulares (A), sitios de tráfico citoplasmático (A) y el citoplasma de las células hijas después de la mitosis (B) en los que DLC8 actúa reposicionando orgánulos después de la división celular.

25 Descripción de la invención

Basándose en comparación de análisis de secuencia de la proteína viral de VPPA p54 presente en diferentes aislados virales de diversos orígenes, los inventores diseñaron un conjunto de péptidos (Tabla 1) que incluía una secuencia consenso conservada en la mayoría de los aislados de virus y las secuencias flanqueantes más convenientes entre las que las proteínas presentan variaciones entre los diferentes aislados virales (Figura 1). Se tomó en consideración la longitud, hidrofobicidad y contenido de prolina. La prolina puede experimentar isomerización cis/trans en solución y agregados. Una vez que los inventores habían seleccionado el conjunto de péptidos, sintetizaron los que se predecía que eran solubles y estables por su composición de aminoácidos y se marcaron con una secuencia para suministrarlos a las células y después los inventores procedieron a ensayar los péptidos por los siguientes enfoques.

La técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) permite un análisis en profundidad de las superficies de interacción entre diferentes proteínas. En la presente invención, se analizó la interacción entre la proteína p54 de VPPA y cadena ligera de dineína (DLC8) por RMN. Este análisis ha proporcionado datos que han hecho posible conocer dicha interacción en detalle, considerando la estructura tridimensional de ambas proteínas y ambas superficies de interacción permitiendo ajustar la secuencia peptídica óptima para abarcar los restos implicados en interacción. Se obtuvo el espectro de RMN de DLC8 y se evaluó como en presencia de concentraciones creciente de la p54 viral, este espectro se modificó (desplazamiento químico) lo que indica una interacción de alta afinidad entre ambas proteínas. Fue posible determinar el centro activo de la proteína constituida por los restos de DLC8 que desaparecieron del espectro porque están implicados en la interacción. Estos restos son los siguientes: Trp54, Lys9, Ser88, Asn61, Asn23, Asn33, Gly59, Ser86, Arg60, Glu15, y Tyr75. Los inventores fueron capaces después de seleccionar los péptidos que podían unirse y abarcar los restos implicados en la superficie de interacción y después se ensayó que fue capaz de prevenir cualquier unión adicional de la proteína viral p54 a cualquier concentración bloqueando esta interacción de alta afinidad.

La presente invención demuestra que una correcta interacción de la proteína viral con dineína celular es crítica para la infección, que necesariamente incluye el transporte intracelular del virus de la membrana a la zona perinuclear (en un área correspondiente al centro organizador de microtúbulos o MTOC, en el que la mayor acumulación de DLC8 se produce en células sanas) y que, en el caso de la infección por VPPA, es donde se posiciona la factoría viral y las proteínas virales se sintetizan para ensamblarse y dar lugar a nuevos viriones.

Recientemente los estudios realizados usando RMN mencionados anteriormente, han hecho posible demostrar en el laboratorio de los inventores que es posible evitar la unión de p54 a DLC8, añadiendo previamente un péptido a DLC8 que incluye la secuencia de interacción TyrThrThrThrValThrThrGlnAsnThrAlaSerGlnThr (SEC ID NO: 13) existente en p54.

Una realización preferida de la presente invención consiste en dificultar el uso de la dineína por los virus durante la infección, mediante la utilización de una secuencia de una proteína vírica, o parte de ella, para dificultar la infección, en algunos casos por saturación de los sitios de unión de la proteína celular mediante péptidos antivirales antagonistas de la unión proteína viral - dineína. Dentro de dichos péptidos la invención se ha probado en el tratamiento de células de cualquier origen con secuencias peptídicas que intervengan en la acción de las proteínas

víricas con la cadena ligera de la dineína, por ejemplo aquellas que contengan los 14 aminoácidos: TyrThrThrThrValThrThrGlnAsnThrAlaSerGlnThr (SEC ID NO: 13) incluyendo los cambios de aminoácidos conservativos en esa secuencia y los análogos de secuencia de distintos virus animales o análogos funcionales a este péptido. Se descubrió que la hidrofobicidad de las secuencias flanqueantes para el motivo crítico (secuencia de aminoácidos que mantiene la interacción entre p54-DLC8, Thr Ala Ser Gln Thr -SEC ID NO: 14-) modificó la capacidad de un péptido de unirse a DLC8. El diseño de la secuencias peptídicas tiene que considerar que el péptido debería unirse a DLC8 en un sitio específico que se localiza en un cañón hidrófobo como se muestra por la estructura tridimensional de la DLC8. Dado el hecho de que de las secuencias teóricas que se espera que se unan a DLC8, algunas se unieron y otras no se unieron a DLC8 *in vitro* como se ha explicado anteriormente, la presente invención ha ido más allá para refinar la secuencia peptídica usando RMN y se seleccionó un conjunto de péptidos inhibidores. Los inventores demostraron que la interacción p54-DLC8 es una interacción de alta afinidad como se define por su dinámica de interacción de RMN. No obstante, los inventores fueron capaces de bloquear esta interacción de alta afinidad añadiendo algunos péptidos lo que muestra por primera vez que la interacción p54-DLC8 podría obstaculizarse interfiriendo en el enlace con secuencias peptídicas dadas (Tabla 1). Las secuencias peptídicas óptimas seleccionadas fueron capaces de bloquear la interacción mientras que se usaron otras como péptidos de control que no modificaron la dinámica de interacción entre p54 y DLC8 analizada por RMN.

Esta aproximación metodológica de la presente invención también incluye cualquier tratamiento de células de cualquier origen con secuencias peptídicas que comprendan alguna de las secuencias anteriores o con cambios de aminoácidos conservativos en dichas secuencias. Incluyen todas las transformaciones conservativas de esas secuencias y todos los mecanismos conocidos en la actualidad encaminados a transportar estos péptidos al interior de las células, por ejemplo: Cualquiera de los péptidos unidos a secuencias translocadoras al interior de la célula (adición de ácido aminocaproico o aminohexanoico, etc.), liposomas o cualquier otro vehículo que sirva para internalizar dichos péptidos en la célula tales como vectores, particularmente vectores virales tales como adenovirus o retrovirus, plásmidos, etc., preferentemente los vectores que se ligan a secuencias de marcadores. El tratamiento con péptidos tiene como objeto saturar los motivos de unión a dineína que utilizan el transporte ligado a dineína preincubándolos con la cadena ligera de dineína, la proteína DLC8, o cualquier secuencia de aminoácidos contenida en la misma, o cualquier péptido que contengan los motivos (Lys/Arg)XThrThr o Gly(Ile/val)GlnValAsp, o secuencias derivadas de los mismos con cambios de aminoácidos conservativos. Se definen cambios conservativos aquéllos que no cambien la carga, la topología o la formación de la proteína. Asimismo, la invención comprende cualquiera de los péptidos anteriores unidos a otras secuencias peptídicas, péptidos translocadores, etc., o suministrados junto a liposomas y otros vehículos para internalizar los péptidos en la célula y en general los sistemas de transporte conocidos en la actualidad para células de cualquier origen.

35 Descripción detallada de la invención

Por lo tanto, son objeto de la invención composiciones antivirales de péptidos seleccionados de secuencia de P54 de diferentes aislados virales, que son capaces de competir por la unión a DLC8 con proteínas virales. Particularmente esos péptidos deben evitar eficazmente la unión de la proteína y el virus con DLC8 *in vitro* e *in vivo* y, en consecuencia, inhibir la infección viral. Entre estos péptidos pueden seleccionarse péptidos que pertenecen a las secuencias implicadas en la interacción proteína viral-DLC8, aisladas de la secuencia de proteína viral o de la secuencia de DLC8 en sí misma. Cualquier péptido derivado de la misma, particularmente con sustituciones de aminoácidos conservativas también se incluirían en la presente invención [14: Taylor, W.R.].

Los péptidos seleccionados, aparte de inhibir la interacción de la proteína viral con DLC8, no deben mostrar toxicidad cuando se incuban con células para las que se busca protección antiviral. Además, la mayoría de los péptidos aislados que están implicados en la unión de proteína viral con DLC8, aislados de la proteína viral o de la cadena ligera de dineína (DLC8) muestra una tendencia a agregar y a formar dímeros. Cuando esto tiene lugar, su capacidad de unión es mucho menor y puede incluso desaparecer. Esa formación y/o agregación de dímeros puede evitarse convenientemente cambiando algunos aminoácidos en las secuencias de los péptidos considerando la hidrofobicidad, longitud total y contenido de prolina. La invención ha investigado esos cambios y ha seleccionado una familia de péptidos que obstaculizan la unión del virus a DLC8, por una unión competitiva de alta afinidad con DLC8, no muestran agregación o formación de dímeros y tienen baja toxicidad para la célula en la que la infección viral debe prevenirse o tratarse.

Adicionalmente, los péptidos seleccionados tienen una cola de Arg, en número de 8 por ejemplo, para facilitar que esos péptidos entren en las células en las que la infección viral debe prevenirse o tratarse.

La familia de péptidos seleccionados (PS19, COVA1, COVA2, PEP1 y PEP3) derivan todos de la parte de secuencia que corresponde a P54, responsable de la unión con DLC8. La familia de péptidos de la invención se representa por SEC ID NO:14 como se indica en la reivindicación 1 y comprende cualquier otro péptido derivado de la misma por sustitución conservativa en al menos uno de los aminoácidos de SEC ID NO: 14 como en la reivindicación 1. La subfamilia de péptidos representada por SEC ID NO 1 es particularmente de interés debido a sus efectos no tóxicos en las células.

La composiciones antivirales de la invención que comprenden al menos un péptido de la familia representada por SEC ID NO: 14 como en la reivindicación1 o SEC ID NO: 1, pueden comprender adicionalmente cualquier otro compuesto activo y/o excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 Dentro de las diferentes infecciones virales que pueden tratarse con las composiciones antivirales de la invención estarían: VPPA, virus del papiloma humano, adenovirus, entomopoxvirus A. moorei, virus vaccinia, virus respiratorio sincitial, virus coxackie humano, virus de la rabia, virus del Herpes simple humano, virus Mokola o el virus del SIDA.

10 Otro objeto de la presente invención consiste en un método de selección de compuestos antivirales y de evaluación de su eficacia caracterizado por que implica:

- a) Preincubar o premezclar un cultivo celular con un compuesto capaz de unirse a DLC8 marcada con secuencias de suministro intracelular adecuadas o en combinación con métodos de suministro conocidos tales como liposomas, etc. transfectados con un vector que expresa dichas secuencias peptídicas
- 15 b) Poner en contacto el virus con el cultivo celular incubado o mezclado previamente de la etapa a)
- c) Detectar y cuantificar el nivel de infección vírica en el interior de la célula al cabo de un tiempo
- d) Comparar dicho nivel de infección vírica con el alcanzado en un cultivo celular infectado con el virus sin preincubar o premezclar con el compuesto capaz de unirse a DLC8.

20 Otro objeto de la presente invención consiste en un método de selección de compuestos antivirales y de evaluación de su eficacia caracterizado por:

- a) Preincubar o premezclar un virus con un compuesto que comprende una secuencia capaz de unirse a DLC8, una secuencia parcial de la misma o una secuencia análoga producida por sustitución conservativa de al menos un aminoácido de la secuencia capaz de unión a DLC8 o de una secuencia parcial de la misma
- 25 b) Poner en contacto un cultivo celular con el virus incubado o mezclado previamente en la etapa a)
- c) Detectar y cuantificar el nivel de infección vírica en el interior de la célula al cabo de un tiempo
- d) Comparar dicho nivel de infección vírica con el alcanzado en un cultivo celular infectado con el virus, sin preincubar o premezclar con el compuesto de la etapa a).

30 Además, otro objeto de la presente invención se refiere a la investigación de rutas virales dentro de la célula, asociado con el sistema de transporte de dineína. También esta abarcado en la presente invención un método de investigación caracterizado por marcaje de un conjunto de péptidos capaces de unirse a DLC8, que puede detectarse por, por ejemplo, microscopio de fluorescencia directa. Como marcador de etiquetado puede seleccionarse cualquiera de los disponibles en la investigación celular: fluoresceína, rodamina u otros marcadores fluorescentes y no fluorescentes tales como biotina, hemaglutinina, c-myc, etc., preferentemente usados como marcadores para detección con anticuerpos secundarios, etc.

40 Finalmente, la invención también se refiere a un método para evaluar la inhibición de la unión de ligandos con DLC8 midiendo los cambios de los espectros de cadena ligera de dineína (DLC8).

Los siguientes ejemplos son realizaciones preferidas de ejecutar las invenciones relacionadas contenidas en la presente solicitud y se proporcionan sin fines de limitación del alcance, solamente para permitir al experto en la materia reproducir las invenciones relacionadas sin esfuerzo indebido.

45 **EJEMPLO: Inhibición de la infección por el Virus de la peste porcina africana (VPPA) mediante péptidos que impiden la interacción entre p54 y la cadena ligera de la dineína celular de 8 kDa (DLC8).**

50 1.1. MATERIALES

1.1.1 Líneas celulares y medios de cultivo utilizados

A lo largo de este ejemplo se ha utilizado la línea celular Vero como modelo. Las infecciones y ensayos de internalización de péptidos se desarrollaron en esta línea celular establecida, aneuploide y de crecimiento indefinido en cultivo. Deriva del riñón de mono verde africano adulto (*Cercopithecus*) y se obtuvo a través de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), depositada con el número 84113001. Su morfología es de tipo fibroblasto y se utilizó siempre en un número de etapas menor de 20, manteniéndolos congelados y en alícuotas en nitrógeno líquido hasta su uso. Esta línea celular se cultivó empleando medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Lonza), suplementado con 5 % de suero bovino fetal (SBF, Lonza) inactivado durante 30 minutos a 56 °C, glutamina 4 mM (Invitrogen), 200 UI/ml de penicilina y estreptomycin 100 mM (Invitrogen). Las condiciones de cultivo de las células fueron 37 °C y una atmósfera de 5 % de CO₂. Rutinariamente estas células se subcultivaron 1:6 en dos ocasiones a la semana, creciendo en frascos de cultivo Easy-T-Flasks de 75 cm² recubiertos de Nunclon® (Nunc).

65 El medio de cultivo DMEM fue suplementado de diversas maneras dependiendo de los requisitos del ensayo en particular. Así, los inventores se refieren a DMEM SC cuando se utilizó sin antibióticos, glutamina ni SBF. Los

inventores se refieren a DMEM 2 % cuando el porcentaje de SBF se añade en este porcentaje manteniendo el resto de aditivos en las concentraciones mencionadas en el párrafo anterior.

Para la siembra en placas de agarosa se utilizó medio de Dulbecco 2X (Gibco).

5

1.1.2. Aislados virales utilizados

El aislado del virus de la Peste porcina africana utilizado en los ensayos de inhibición de la infección fue el BA71V, adaptado a crecer en la línea celular Vero [4]. La reserva viral se conservó en alícuotas de 100 µl a – 80 °C en medio DMEM suplementado con 15 % de suero bovino fetal. En el momento de su uso las alícuotas necesarias se descongelaron rápidamente en baño a 37 °C y se mantuvieron en hielo.

10

1.1.3. Material fungible utilizado

- 15 • Criotubos de 1 ml de capacidad (Nalgene) para conservar en alícuotas los aislados virales y mantener una línea celular Vero en nitrógeno líquido.
- Micropipetas (Gilson) con capacidades máximas de 1000, 200 y 20 µl.
- Puntas de micropipeta (Arc) con filtro y libres de RNAsas, para evitar posibles contaminaciones, de 1000, 200 y 20 µl de capacidad.
- 20 • Tubos de 1.5 ml de capacidad (Eppendorf) libres de RNAsas.
- Placas de cultivo celular multipocillo de 4, 6, 12 y 24 pocillos (Nunc).
- Cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro (Gever Labs).
- Portaobjetos convencional rectangular (Gever Labs).
- Membrana de nitrocelulosa para proteínas de 9 x 7 cm (GE Healthcare).
- 25 • Papel Whatman de 9 x 7 cm.

1.1.4. Anticuerpos y cromógenos utilizados

- 30 • Anticuerpo monoclonal anti-p30: desarrollado en el laboratorio del Dr. José Ángel Martínez Escribano, reconoce y detecta de manera específica la proteína temprana p30 del VPPA.
- Anticuerpo policlonal anti-DLC8 obtenido en conejos inmunizados con la proteína DLC8 unida a 10 restos de Histidina expresada en el sistema heterólogo de *E. coli* y posteriormente purificada. Generado en nuestro laboratorio.
- Anticuerpo monoclonal anti-α tubulina (Sigma).
- 35 • Anticuerpo monoclonal anti-p72 (anti-p73): comercializado por Ingenasa, reconoce y detecta de manera específica la proteína estructural tardía principalmente p72 o p73 del VPPA.
- Anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 594 (Molecular Probes).
- Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes).
- Anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa HRP (GE Healthcare).
- 40 • Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa HRP (GE Healthcare).

1.1.5. Otros reactivos.

- 45 • Triton X-100 (Sigma).
- Tween 20. (Sigma).
- Tampón fosfato (PBS).
- BSA, Albúmina de suero bovino (Sigma).
- Reactivo de quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare).
- Agua libre de RNAsas (Ambion).
- 50 • Solución RNaseZAP (Ambion) para eliminar actividad RNasa de las superficies y materiales de trabajo.
- ProLong, reactivo de montaje para conservar la fluorescencia.
- Hoechst 3332 (Sigma) como agente cromógeno intercalante de ácidos nucleicos.
- B-mercaptoetanol, SDS, Tris base (Sigma)
- NP-40 (Fluka)
- 55 • NaCl (Duchefa biochemicals).
- Agarosa de bajo punto de fusión ultra pura (Invitrogen).

1.1.6. Péptidos utilizados

60 Se diseñaron diferentes péptidos conteniendo el motivo de unión a DLC8 previamente descrito en la proteína del VPPA p54 y otra serie de péptidos de secuencia irrelevante para usar como controles negativos (péptidos RS27 y SS20). Todos ellos se encuentran descritos en la Tabla nº 1. En algunos péptidos se incluyeron algunas modificaciones tales como las siguientes:

- Adición de 8 restos de arginina (R) en el extremo N-terminal, con el fin de incrementar la internalización del péptido en la célula [6] (RS27; RS28; COVA1; COVA2; PEP3; PEP1).
 - Conjugación con fluoresceína en el extremo N-terminal para su visualización directa por microscopía de fluorescencia (COVA2; PEP3; PEP1).
- 5
- Sustitución de restos concretos para facilitar la disolución del péptido y evitar su agregación (COVA1, COVA2, PEP1 y PEP3)
 - Sustitución de restos dentro del motivo ThrAlaSerGlnThr por otros que mantienen la capacidad de p54 de interactuar con DLC8 (PEP3) [1].
- 10
- Todos los péptidos diseñados empleados a lo largo del presente ejemplo se sintetizaron por Sigma-Genosys. La purificación de los mismos se llevó a cabo por HPLC obteniendo en todos los casos un grado de pureza superior al 90 %. Una vez sintetizados y purificados los péptidos se recibieron en el laboratorio como un liofilizado.

Tabla nº 1. Péptidos usados en el ejemplo 1

15

Péptido	Otro nombre	Secuencia (aa)	Características	Nº de restos	Peso molecular
PS19	INTSTP1	SEC ID NO: 3	(1)	19	2028
RS27	INTSTP2	SEC ID NO: 4	(1, 4)	27	3277
SS20	INTCT1	SEC ID NO: 5	(5)	20	1949
RS28	INTCT2	SEC ID NO: 6	(4, 5)	28	3199
COVA1	DNBLK1	SEC ID NO: 7	(1, 3, 4)	28	3294
COVA2	DNBLK2	SEC ID NO: 8	(1, 2, 3, 4)	28	3653
PEP3	DNBLK3	SEC ID NO: 9	(1, 2, 3, 4, 6)	28	3652
PEP1	DNBLK4	SEC ID NO: 2	(1, 2, 3, 4)	28	3673

(1): contiene secuencia de unión con DLC8 presente en p54.

(2): conjugado con fluoresceína

- 20
- (3): contiene cambios con respecto a la secuencia de unión con DLC8 presente en p54 para evitar la agregación y dimerización del péptido.

(4): contiene secuencia de 8x argininas para facilitar su internalización en la célula

(5): control negativo

- 25
- (6): sustituciones en el motivo de unión a DLC8 presente en p54 que no modifican la unión entre ambas proteínas.

1.2. MÉTODOS

1.2.1. Análisis de comparación de secuencia

30

La secuencia de p54 existente en diferentes campos y aislados de laboratorio de virus PPA que se depositó en Genbank (NCBI) se representó en la base de datos BLAST y se comparó con la herramienta de búsqueda de alineamiento local. A partir de las diferentes secuencias de diferentes aislados se tomó el motivo conservado y las secuencias flanqueantes más adecuadas. Para este diseño de péptido, se tomó en consideración la longitud, hidrofobicidad y contenido en prolina. La prolina puede experimentar isomerización cis/trans en solución y agregados. La naturaleza hidrófoba del péptido puede también ser difícil purificar y facilitar los precipitados. Una vez que los inventores habían diseñado el conjunto de péptidos, seleccionaron para sintetizar los que se había predicho que serían solubles y estables por su composición de aminoácidos y los marcaron con una secuencia para suministrarlos a las células (una cola de 8 argininas como se detalla posteriormente).

35

40

1.2.2. Resonancia magnética nuclear

Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear después de marcar con N¹⁵ y purificación de proteína de VPPA p54 y DLC8. El método usado para este estudio se denomina perturbación de desplazamiento químico. En primer lugar ambas proteínas se purificaron y se compararon los espectro con los indicados por Lo *et al.*, 1998 para DLC8 (Figura 2).

45

1.2.3. Manipulación de los péptidos

Atendiendo a su peso molecular (ver Tabla nº 1) los péptidos se resuspendieron en el volumen de H₂O con un grado de pureza mQ y estéril correspondiente, para obtener una solución madre a una concentración de 5 mM. Se prestó especial atención para evitar turbidez en la solución y siempre se utilizaron puntas con filtro para evitar posibles contaminaciones cruzadas. Se realizaron alícuotas de 20 µl y se conservaron a -80 °C hasta el momento de su uso. Para usarlos su descongelación fue lenta, en hielo.

Las soluciones de trabajo con los péptidos se realizaron a partir de las soluciones madre en medio DMEM SC en el rango de concentraciones 0 – 100 µM, siempre en condiciones de esterilidad y justo antes de su adición al cultivo celular para evitar su degradación.

1.2.4. Bloqueo de la interacción p54-DLC8 mediante péptidos en cultivo celular

Se cultivaron 9×10^4 células Vero en placas de 24 pocillos la noche anterior al experimento. A la mañana siguiente se lavaron las células en DMEM SC y se sustituyó el medio existente por 300 µl de las soluciones conteniendo los diferentes péptidos en diferentes concentraciones. La incubación de las células con los péptidos tuvo lugar durante 1 hora a 37 °C y 5 % CO₂, transcurridos los cuales se infectaron las células con el VPPA. Para infectar las células se retiró el cultivo celular existente y se sustituyó por 350 µl/pocillo 2 % conteniendo la cantidad correspondiente para obtener una multiplicidad de infección de 1 unidad formadora de placa (ufp) por célula. Se dejó transcurrir la infección hasta el momento deseado a 37 °C y 5 % CO₂.

Transcurrido el periodo de absorción (2 h a 37 °C) se eliminó el virus residual lavando 2 veces con DMEM SC y finalmente se dejaron las células en 300 µl de DMEM SC fresco conteniendo la correspondiente concentración de péptidos. Se dejó transcurrir la infección a 37 °C el tiempo deseado en cada experimento, dependiendo del parámetro de la infección a analizar. De forma esquemática se representa este proceso en la Figura 4

1.2.5. Detección de células infectadas por el VPPA mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La detección de células infectadas por el VPPA en células previamente expuestas a los diferentes péptidos se realizó a las 6 horas post-infección. Las técnicas de IFI empleadas para detectar por inmunofluorescencia las células infectadas por el VPPA fueron convencionales. De modo resumido, se lavaron las células con 1 ml de PBS antes de fijarse con una solución de PBS-paraformaldehído al 3,8 % a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se eliminó a continuación el paraformaldehído residual lavando 3 veces las células con 1 ml de PBS. La permeabilización de las membranas celulares se realizó empleando PBS-Triton X-100 al 0.2 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras otros 3 lavados con PBS, las células se incubaron a 37 °C en solución de bloqueo (PBS-BSA al 3 %) durante 45 minutos. Como antígeno viral a detectar se eligió la proteína temprana del VPPA p30 [5] y su detección se llevó a cabo usando el anticuerpo anti-p30 diluido en PBS 1:200 durante 1 hora a 37 °C. Se lavaron las células 3 veces con PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución con anticuerpo anti-IgG de ratón diluido 1:300 en PBS. Se lavaron las células en PBS y se incorporó finalmente un marcaje de núcleos con Hoechst 3332. Finalmente los cubreobjetos conteniendo las células se montaron sobre portaobjetos empleando Prolong como medio de montaje. Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia convencional (Leica) para contabilizar el número de células positivas para el antígeno viral p30.

1.2.6. Análisis de la síntesis de proteínas virales por transferencia de western durante la infección por el VPPA

Las proteínas virales objeto de análisis fueron la proteína del VPPA temprana p30 expresada durante las fases iniciales de la infección [5] y la proteína p72 (en ocasiones también denominada p73) expresada durante la fase tardía de la infección [7, 8]. La transferencia de western se llevó a cabo sobre las células, que se lavaron con 1 ml de PBS frío, antes de recogerse en 50 µl de tampón de extracción de proteínas RIPA helado (NaCl 150 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, NP40 1 %, SDS 1 % y Tris-HCl pH=8 50 mM). Se incubaron a 4 °C con agitación orbital durante 20 minutos para solubilizar las proteínas y a continuación se centrifugaron a 12.000 rpm en centrifuga de mesa a 4 °C durante 10 minutos. Se descartaron los precipitados y se recogieron los sobrenadantes, que se guardaron a -70 °C hasta su análisis por °C de western.

Las muestras se descongelaron en hielo y se cuantificó la cantidad de proteína de las diferentes muestras por el método de Bradford. 20 µg de proteína total desnaturalizada a 100 °C durante 5 minutos se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida:bis-acrilamida al 15 % durante 90 minutos a 100 V constantes. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 90 minutos a 100 V constantes en presencia de un tampón de transferencia (Tris-Glicina, Metanol 20 %). La membrana se bloqueó en presencia de 50 ml de PBS-leche desnatada en polvo al 5 % a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora con agitación orbital. A continuación la membrana se hibridó con 10 ml del anticuerpo policlonal anti-DLC8 diluido 1:50 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Transcurrido este tiempo la membrana se lavó 3 veces con 20 ml de PBS-Tween 0.05 % a temperatura ambiente durante 15 minutos en cada ocasión. La incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa y diluido 1:4000 en PBS duró 1 h a temperatura ambiente con agitación. Finalizada ésta las membranas se lavaron otras 3 veces con PBS-Tween 0,005 % durante 15 minutos en

cada ocasión. Finalmente la detección mediante quimioluminiscencia empleando ECL se realizó siguiendo de manera convencional las instrucciones del fabricante.

5 Como muestra de partida a analizar se utilizaron extractos de proteína soluble total procedentes de células Vero expuestas o no a los diferentes péptidos y posteriormente infectadas o no con el VPPA durante 16 horas.

10 Como anticuerpos primarios se utilizaron en membranas independientes el anticuerpo monoclonal anti-p30 diluido 1:100 en PBS y el anticuerpo monoclonal anti-p72 diluido 1:2000 en PBS. Las membranas se incubaron con ambos anticuerpos durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital.

10 Como anticuerpo secundario se utilizó en ambos casos el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa.

15 Finalmente se realizó el densitometrado de la reacción de quimioluminiscencia para cuantificar y relativizar la cantidad de proteína existente en cada banda detectada.

1.2.7. Detección y cuantificación del genoma de VPPA

20 La detección y cuantificación del genoma de VPPA se consiguió por PCR cuantitativa en tiempo real usando oligonucleótidos específicos (SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11) y una sonda TaqMan (SEC ID NO: 12). Se extrajo ADN de células infectadas o de simulación con BA71V 0,5 ufp/célula y se purificó con kit de sangre y tejido DNeasy (Qiagen) a 16 hpi. La concentración y pureza del ADN se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}).

Se preparó mezcla de amplificación en hielo como sigue:

- 25 3 µl de molde de ADN (1 µg).
- 1 µl de oligonucleótido OE3F 50 pmol.
- 1 µl de oligonucleótido OE3R 50 pmol.
- 10 µl de Quantimix Easy Probes Biotools 2X.
- 1 µl de sonda TaqMan™ SE2 5 pmol.
- 30 4 µl de H₂O.

La reacción de amplificación se realizó en un Rotor Gene 6000™ (Corvette Research), como se indica en la siguiente tabla:

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
94	10 minutos	1
94	15 segundos	45
58	1 minuto	

35 Se incluyeron controles de amplificación positivos (ADN purificado de viriones de VPPA) y controles de amplificación negativos (ADN de células infectadas con simulación) en el ensayo y se analizaron duplicados de cada muestra.

1.2.8. Efecto de tratamiento con péptido en la producción de descendencia del virus durante la infección por VPPA.

40 Se sembraron 9×10^4 células Vero en placas de 24 pocillos la noche antes del experimento. 1 hora antes de la infección las células se incubaron en 300 µl de DMEM que contenía diferentes concentraciones de péptidos COVA1 o RS28. Después, las células se infectaron o se infectaron con simulación con 0,5 ufp/célula de cepa BA71V de VPPA. A 36 hpi, se recogieron 100 µl de medio de los pocillos y se almacenó a -80 °C hasta analizar la descendencia del virus extracelular. También se recogieron células infectadas en 100 µl de DMEM fresco. Las células se congelaron y descongelaron tres veces para permitir la solubilización de la descendencia del virus intracelular y después se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Las titulaciones virales de muestras intracelulares o extracelulares se analizaron por ensayo en placa. Brevemente, se inocularon monocapas de células Vero en placas de 6 pocillos con 500 µl de diluciones seriadas 10 veces de muestras que contenían descendencia del virus. Después de un periodo de adsorción de 90 minutos, las células se lavaron dos veces en DMEM fresco 5 % y se añadieron 3 ml/pocillo de revestimiento (agarosa de bajo punto de fusión 2 % y DMEM 2X, v:v) a las células. Cuando el revestimiento se volvió sólido, las placas se incubaron a 37 °C y CO₂ 5 % durante 12 días. Después, las células se tiñeron con violeta cristal 1 % en formaldehído 5 % para permitir la visualización de placas virales. Las titulaciones del virus se calcularon como sigue: ufp/ml = 2 x nº de placas x dilución 10 veces.

55 1.2.9. Análisis de citotoxicidad. Ensayos de viabilidad y proliferación celular.

60 Para evaluar la viabilidad celular se incubaron células Vero en placas de 24 pocillos en DMEM que contenía péptido inhibidor COVA1 o control negativo RS28 a concentraciones que variaban de 0 a 100 µM. Después de la incubación con péptidos durante 24 horas, las células se recogieron y se determinó el número de células viables presentes en las suspensiones celulares por ensayo de exclusión de colorante azul de tripano (Sigma). Brevemente, se añadieron

20 µl de PBS con azul de tripano 0,08 % a volumen igual de suspensión celular y se mezcló. Después de 2 minutos se contaron las células azules (células muertas) usando un hematocitómetro y un microscopio óptico convencional.

Para evaluar la proliferación celular se incubaron 3×10^4 células sembradas en placas de 96 pocillos en 50 µl de DMEM que contenía péptido inhibidor COVA1 o control negativo RS28 a concentraciones que variaban de 0 a 100 µM. después de 36 horas de incubación la proliferación celular se determinó usando ensayo CellTiter 96 Aqueous™ (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Diseño de péptidos antivirales

La secuencia de p54 existente en diferentes aislado de campo y laboratorio de virus PPA se representó en una base de datos y se comparó. Basándose en esta comparación de análisis de secuencia de la proteína viral p54 de VPPA presente en diferentes aislados virales de diversos orígenes, los inventores diseñaron un conjunto de péptidos (Tabla 1) que incluía una secuencia consenso conservada en la mayoría de los aislados de virus y las secuencias flanqueantes más convenientes entre las que las proteínas presentan variaciones entre los diferentes aislados virales (Figura 1). Para el diseño del péptido, se tomó en consideración la longitud, hidrofobicidad y contenido de prolina. La prolina puede experimentar isomerización cis/trans en solución y agregados. La naturaleza hidrófoba del péptido también puede ser difícil para purificar y facilitar precipitados. Una vez que los inventores habían diseñado el conjunto de péptidos, seleccionaron para sintetizar los que se predecía que eran solubles y estables por su composición de aminoácidos y se marcaron con una secuencia para suministrarlos a las células (una cola de 8 argininas como se detalla posteriormente) y después los inventores procedieron a ensayar los péptidos por los siguientes enfoques.

1.3.2. Análisis de superficies de interacción por sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear

Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear después de marcar con N^{15} y purificación de ambas proteínas. El método usado para este estudio se denomina perturbación de desplazamiento químico. Este método analiza los cambios químicos observados en la proteína diana cuando interacciona con un ligando. En primer lugar ambas proteínas se purificaron y los espectros se compararon con los indicados por Lo y col., 1998 (13) para DLC8 (Figura 2A). En presencia de concentraciones crecientes de proteína p54 de VPPA, los espectros de cambios de DLC8, y las señales implicadas en el motivo de unión, desaparecieron progresivamente. A concentración de p54 de 0,1 equivalente, las señales que desaparecían en primer lugar corresponden a los restos W54, K9, S88, N61, N23. Cuando se alcanzan concentraciones de 0,3 equivalente, las señales que desaparecen corresponden a los restos N33, G59, N23, S86, R60, E15, y Y75 (Figura 1A). El lento intercambio del proceso de interacción observado entre DLC8 y P54 indicó que la unión entre estas proteínas se produce a alta afinidad. No obstante, los inventores han sido capaces de interferir en esta interacción de alta afinidad cuando se añadieron algunos péptidos y no se observaron modificaciones de los espectros de DLC8 en cualquiera de los restos anteriormente mencionados del centro activo de la proteína a ninguna concentración de p54 (Figura 2B) que muestra por primera vez que esta interacción podría bloquearse eficazmente con secuencias peptídicas dadas (Tabla 1).

1.3.3. Internalización de los péptidos en las células Vero

En la bibliografía se describe que la adición de restos de Arginina en los extremos de un péptido incrementa de manera significativa la penetración de éstos al interior celular. Con dicho fin, los inventores incorporaron un transportador de suministro intracelular compuesto de ocho argininas. Para comprobar que los péptidos diseñados se internalizasen con eficacia al interior celular se incorporó un marcaje de fluoresceína en el extremo N-terminal. Los péptidos sin el transportador de suministro intracelular de arginina no fueron capaces de entrar en la célula, mientras que lo que incorporaban la cola de transportador se internalizaban eficazmente y se tiñeron claramente casi el 100 % de las células presentes en el cultivo, después de 1 y 3 horas de incubaciones con el péptido, en un patrón microtubular continuo (Figura 3). El péptido COVA2 reúne este conjunto de características, incluyendo el motivo de unión a DLC8 previamente descrito en p54, y se utilizó para visualizar directamente la internalización en células Vero.

Como se puede observar en la Figura 3, el péptido se internalizó eficazmente, pudiendo detectarse fácilmente por microscopía de fluorescencia directa, incluso 6 h después de su adición.

Las concentraciones de péptidos COVA2 óptimas fueron 50 y 100 µM, sin observar grandes diferencias entre ambas concentraciones. 25 µM de COVA2 pudieron detectarse, aunque con mayor dificultad que en las concentraciones mayores, y sin embargo concentraciones menores, es decir por debajo de 5 µM no pudieron apenas detectarse por microscopía de fluorescencia.

1.3.4. Inhibición de la infección por el VPPA mediante péptidos que bloquean la unión p54-DLC8

Tal y como se detalla en la sección de métodos de este ejemplo, se realizaron infecciones con 1 ufp/célula del VPPA monocapa de células Vero que previamente se habían expuesto a diferentes péptidos. La infección se dejó transcurrir en presencia del péptido y se analizaron los siguientes parámetros de la infección para comprobar el efecto inhibitorio de los péptidos en cuestión.

5

1.3.4.1. Efecto de los péptidos sobre el efecto citopático característico de la infección viral

La infección por el VPPA produce un daño sobre las células infectadas que es muy característico y fácilmente detectable como efecto citopático por microscopía convencional. Comienza temprano tras la infección y desemboca finalmente en la vacuolización intracelular progresiva, el redondeo del contorno celular, y el desprendimiento de la superficie a la cual se encontraba adherida la célula infectada [9].

10

Los inventores evaluaron la presencia o ausencia de efecto citopático generalizado a las 18 horas post-infección en cultivos de células Vero donde la infección progresó en presencia de los diferentes péptidos. Usando este método se pudo constatar la inhibición del efecto citopático en los cultivos celulares incubados con los péptidos que contenían en su secuencia el motivo de unión a DLC8 junto la secuencia de argininas para facilitar su entrada al interior celular. Por el contrario las células expuestas a los péptidos control o sin la secuencia de argininas desarrollaron un efecto citopático semejante al observado en las células control donde la infección se desarrolló de un modo normal.

15

Como se puede observar en la Figura 3, el grado de efecto citopático observado fue directamente proporcional a la concentración de péptido empleada. Así, las concentraciones del péptido PS19 inhibieron el efecto citopático totalmente en el rango de concentraciones que oscila entre 25 y 100 µM, pero concentraciones inferiores a 25 µM no resultaron efectivas a la hora de inhibir el efecto citopático.

20

En la siguiente tabla se resume la capacidad de inhibición del efecto citopático para los diferentes péptidos ensayados y sus correspondientes concentraciones.

25

Tabla nº 2.

Péptido	Otros nombres	motivo unión a DLC8	8 x Argininas	C.E.I. a 50 µM	C.E.I. a 100 µM
PS19	INTSTP1	si	no	si	Si
RS27	INTSTP2	si	si	si	si
SS20	INTCT1	no	no	no	no
RS28	INTCT2	no	si	no	no
COVA1	DNBLK1	si	si	si	Si
COVA2	DNBLK2	si	si	si	Si
PEP1	DNBLK3	si	si	si	Si
PEP3	DNBLK4	si	si	si	Si

Además el péptido que contiene el motivo de unión a DLC8 con esas modificaciones mantuvo la capacidad de interacción del péptido y demostró ser eficaz a la hora de inhibir el efecto citopático en la infección.

30

1.3.4.2. Efecto de los péptidos sobre el porcentaje de células infectadas

Se analizó el efecto inhibitorio de los péptidos contabilizando el número de células infectadas por el VPPA (positivas para el antígeno p30). Para ello se incubaron las células en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos inhibidores y controles antes de la infección con el virus, como se detalla en la sección de métodos del presente ejemplo.

35

Como se puede observar en la Figura 6, la incubación con el péptido COVA2 previa a la infección resultó en una drástica reducción del porcentaje de células infectadas, al comparar con los datos obtenidos en células incubadas con el péptido control RS28. Además esta reducción dependió de las concentraciones de péptido COVA2 empleadas.

40

1.3.4.3. Efecto de los péptidos sobre la síntesis de proteínas virales

Se analizó la síntesis de proteínas del VPPA tempranas y tardías por transferencia de western empleando anticuerpos específicos. Así se pudo observar que tanto la síntesis de proteínas virales tempranas (p30) como tardías (p72) disminuyó en modo dependiente de dosis cuando la infección por el VPPA transcurre en presencia del péptido COVA1. Además dicha reducción es dependiente de la dosis de COVA1 añadida al cultivo celular (Fig. 7).

50

1.3.4.4. Efecto de los péptidos medido por conteos de replicación de genoma viral

Se preincubaron células Vero con diferentes concentraciones de péptidos, como se ha descrito anteriormente, y se infectaron con aislado de VPPA BA71 V. Las células se recogieron a 16 hpi y se analizó la replicación del genoma

55

de VPPA por PCR cuantitativa en tiempo real usando sonda TaqMan y oligonucleótidos específicos [11]. Como puede verse en la Figura 8, el tratamiento con péptido COVA1 inhibidor redujo en gran medida de forma dependiente de dosis la replicación del genoma de VPPA. De forma similar, la preincubación con otros péptidos de bloqueo (PEP1 y PEP3), que contenían cambios en el motivo de unión a DLC8 que no afectan a la interacción p54-DLC8, también da como resultado una reducción de la replicación del genoma de VPPA, aunque el tratamiento con secuencia de COVA1 es eficaz desde concentraciones de péptido menores (25 μ M). Esta reducción de la replicación del ADN viral después del tratamiento con péptido es consecuencia de la inhibición de la infección por estos péptidos. Después, por este método cuantitativo sensible fue posible definir dentro de los péptidos que pueden obstaculizar el enlace p54-DLC8 e interfieren en la infección, que hay secuencias dadas que pueden bloquear más eficazmente la infección *in vivo* (fig. 8).

1.3.4.5. Efecto del tratamiento con péptido en la producción de descendencia del virus durante infección por VPPA.

Se trataron 9×10^4 células Vero que crecían en placas de 24 pocillos con diferentes concentraciones de péptidos COVA1 y RS28 durante 1 hora a 37 °C, como se describe en la sección de materiales y métodos. Las células se infectaron después con BA71 V o se infectaron con simulación a 0,5 ufp/célula. A las 36 hpi se analizó la descendencia de virus extracelular e intracelular a partir de cultivos celulares infectados por ensayo en placa. Como se muestra en la Figura 9, se observó una reducción estadísticamente significativa en las titulaciones de virus extra (Figura 9B) en intracelular (Figura 9A) calculada cuando la infección se produce en presencia de COVA1 50 μ M o concentraciones mayores. No obstante, la incubación con péptido RS28 de control negativo a diferentes concentraciones no afectó a las titulaciones del virus y los valores de descendencia del virus resultantes fueron similares a los detectados de células infectadas en ausencia de péptido.

1.3.5. Análisis de citotoxicidad. Efecto del tratamiento con péptido en la viabilidad y proliferación celular

Para evaluar si cualquier citotoxicidad o efectos secundarios estaban ligados al tratamiento de células Vero con los péptidos, se realizaron ensayos de proliferación celular y viabilidad celular. En estos experimentos, los valores de proliferación de las células después del tratamiento con diferentes concentraciones de péptido COVA1 no aumentaron en comparación con células tratadas con el péptido de control negativo RS28 (Figura 10). Los valores de proliferación obtenidos con COVA1 fueron similares a los obtenidos en células de control en ausencia de péptidos. Además no se modificaron los porcentajes de viabilidad celular después de incubación con diferentes péptidos (péptidos inhibidores o control), como se juzga a partir del ensayo de exclusión de azul de tripano. Los porcentajes de viabilidad celular fueron aproximadamente 90 % en todos los casos. Estos resultados demuestran que la incubación con los péptidos descritos en la presente invención no afecta a la proliferación o viabilidad de las células Vero.

1.3.5.1. Estructura celular e integridad funcional de DLC8

Los inventores ensayaron si se modificaron estructuras celulares importantes relacionadas con dineína motora microtubular por el tratamiento con péptido. Junto con la internalización de péptidos, los inventores analizaron la integridad de los componentes del citoesqueleto y observaron que los microtúbulos no se modificaron en presencia del péptido COVA2 (Figura 11). Además, el patrón de distribución de la cadena ligera de dineína en los microtúbulos se conservó con un área condensada correspondiente al centro de organización microtubular (MTOC) (Figura 11). Se sabe que la función de la dineína es importante en mitosis, desempeñando un papel en la formación del huso mitótico y la migración de los cromosomas y los inventores descubrieron que la división celular no estaba alterada (Figura 12).

1.3.5.2. Patrón de distribución celular de péptido COVA2 marcado con fluoresceína

El péptido COVA2 marcado con fluoresceína mostró una distribución similar a la DLC8 teñida usando un anticuerpo policlonal contra la molécula de DLC8 completa. DLC8 interacciona en el citoplasma con cargas seleccionadas mediando el transporte de orgánulos, ARN y proteínas al extremo menos de los microtúbulos (hacia el núcleo) y su función es esencial para relocalizar los orgánulos tales como Golgi después de mitosis. Resulta interesante que el péptido COVA2 se colocó precisamente con el compartimento dinámico de la molécula de DLC8. El péptido fluorescente se distribuyó principalmente en áreas citoplásmicas, proyecciones celulares, filopodios y contactos celulares en células en reposo. En células que experimentan mitosis, permaneció en áreas citoplásmicas periféricas hasta que se han producido fases tardías de la mitosis. Después, en células que experimenta cariocinesis y células hijas, la tinción de COVA2 aumentó y fue muy intensa en todas las áreas citoplásmicas en las células que experimentan redistribución de orgánulos después de la mitosis (Figura 13). Los porcentajes de colocación fueron mayores en células que relocalizan activamente orgánulos celulares después de mitosis usando el anticuerpo que tiñe la molécula de DLC8 completa. Después, se descubrió que era un marcador selectivo de un compartimento dinámico ligado a transporte mediado por DLC8 en células.

Estos resultados demuestran claramente que se puede inhibir la infección viral (por el VPPA) empleando péptidos diseñados especialmente basados en el motivo de unión a DLC8 existente en la p54 viral en diferentes aislados virales que impide la interacción entre ambas proteínas. Esta inhibición se refleja en una inhibición del efecto

citopático, una reducción drástica del número de células infectadas, de las copias de genomas virales por célula (que refleja la reducción de la replicación viral en ng/μl descubierta en la célula) y la consiguiente reducción significativa en la producción de virus y en la síntesis de proteínas virales.

- 5 En conclusión, la presente invención usa por primera vez péptidos que se diseñaron basándose en la secuencia por la que un virus se une a dineína DLC8, una etapa necesaria para el éxito de la infección y se muestra que esos péptidos son eficaces inhibiendo la infección viral en células susceptibles y que tienen un efecto antiviral demostrable.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso, C., et al., *African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein*. J Virol, 2001. **75**(20): p. 9819-27.
2. Harrison, A. and S.M. King, *The molecular anatomy of dynein*. Essays Biochem, 2000. **35**: p. 75-87.
- 15 3. King, S.M., *Organization and regulation of the dynein microtubule motor*. Cell Biol Int, 2003. **27**(3): p. 213-5.
4. Enjuanes, L., et al., *Titration of African swine fever (ASF) virus*. J Gen Virol, 1976. **32**(3): p. 471-7.
5. Afonso, C.L., et al., *Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus*. Virology, 1992. **189**(1): p. 368-73.
6. Melikov, K. and L.V. Chernomordik, *Arginine-rich cell penetrating peptides: from endosomal uptake to nuclear delivery*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(23): p. 2739-49.
- 20 7. Tabares, E., et al., *Proteins specified by African swine fever virus. II. Analysis of proteins in infected cells and antigenic properties*. Arch Virol, 1980. **66**(2): p. 119-32.
8. Cobbold, C. and T. Wileman, *The major structural protein of African swine fever virus, p73, is packaged into large structures, indicative of viral capsid or matrix precursors, on the endoplasmic reticulum*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 5215-23.
- 25 9. Nunes, J.F., J.D. Vigario, and A.M. Terrinha, *Ultrastructural study of African swine fever virus replication in cultures of swine bone marrow cells*. Arch Virol, 1975. **49**(1): p. 59-66.
10. Martínez-Moreno, M. et al., *Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique*. FEBS Letters 2003. 544: 262-267.
- 30 11. King, D.P., et al., *Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus*. Virol Methods. 2003. 107: 53-61.
12. Rodríguez-Crespo, I., et al., *Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique*. FEBS Lett. 503: 135-141 (2001).
- 35 13. Lo, K.W., et al., *The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif*. J. Biol. Chem. 276: 14059-14066 (2001).
14. Taylor, W.R., *The classification of amino acid conservation*. Journal of Theoretical Biology, 119: 205-218 (1986).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INIA
 - <110> ALGENEX
 - 5 <120> NUEVOS PEPTIDOS ANTIVIRALES QUE IMPIDEN LA UNION DEL VIRUS A DLC8
 - <130> VALP-04905
 - <150> ES200702792
 - <151> 24.10.07
 - <160> 14
 - 10 <210> 1
 - <211> 20
 - <212> PÉPTIDO
 - <213> SINTÉTICO
 - <220>
 - 15 <221> MUTANTE
 - <222> 1
 - <223> /NOTA= XAA
 - <220>
 - <221> MUTANTE
 - 20 <222> 3
 - <223> /NOTA= THR
 - <220>
 - <221> MUTANTE
 - <222> 14
 - 25 <223> /NOTA= SER
 - <220>
 - <221> MUTANTE
 - <222> 16
 - <223> /NOTA= ALA
 - 30 <220>
 - <221> MUTANTE
 - <222> 5
 - <223> /NOTA= SER
 - <220>
 - 35 <221> MUTANTE
 - <222> 6
 - <223> /NOTA= TYR
 - <220>
 - <221> MUTANTE
 - 40 <222> 7
 - <223> /NOTA= THR
 - <400>
-
- His Pro Ala Glu Pro Gly Ser Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser**
5
10
15
20
-
- <210> 2
 - 45 <211> 19
 - <212> PÉPTIDO
 - <213> SINTÉTICO
 - <220>
 - <223> PS19 (INTSTPI)
 - 50 <400>
-
- Pro Ala Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser**
5
10
15
19
-
- <210> 3
 - <211> 27
 - <212> PÉPTIDO
 - 55 <213> SINTÉTICO
 - <220>
 - <223> RS27 (INTSTP2)
 - <400>

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Ala Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn
 5 10 15 20
 Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser
 25 27

- <210> 4
- <211> 20
- <212> PÉPTIDO
- 5 <213> SINTÉTICO
- <220>
- <223> SS20 (INTCT1)
- <400>

Ser Leu Val Ser Ser Asp Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ser Ser Gly Glu His Ser
 5 10 15 20

- 10 <210> 5
- <211> 28
- <212> PÉPTIDO
- <213> SINTÉTICO
- <220>
- 15 <223> RS28 (INTCT2)
- <400>

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Val Ser Ser Asp Glu Ser Ser Ser Gly Ser
 5 10 15 20
 Ser His Ser Ser Gly Glu His Ser
 25 28

- <210> 6
- <211> 28
- 20 <212> PÉPTIDO
- <213> SINTÉTICO
- <220>
- <223> COVAL (DNBLK1)
- <400>

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His Pro Ala Glu Pro Gly Ser Thr Val Thr Thr Gln
 5 10 15 20
 Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser
 25 28

- 25 <210> 7
- <211> 28
- <212> PÉPTIDO
- <213> SINTÉTICO
- 30 <220>
- <223> COVA2 (COVA1 CONJUGADA CON FLUORESCEÍNA) (DNBLK2)
- <400>

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His Pro Ala Glu Pro Gly Ser Thr Val Thr Thr Gln
 5 10 15 20
 Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser
 25 28

- <210> 8
- 35 <211> 28
- <212> PÉPTIDO
- <213> SINTÉTICO
- <220>
- <223> PEP3 (DNBLK4) (CONJUGADA CON FLUORESCEÍNA)
- 40 <4.00>

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His Pro Thr Glu Ser Gly Ser Thr Val Thr Thr Gln
 5 10 15 20
 Asn Ser Ala Ala Gln Thr Met Ser
 25 28

<210> 9
 <211> 28
 <212> PÉPTIDO
 5 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <223> PEP1 (DNBLK3) (CONJUGADA CON FLUORESCÉINA)
 <400>

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His Pro Thr Glu Ser Gly Ser Thr Val Thr Thr Gln
 5 10 15 20
 Asn Ser Ala Ser Gln Thr Met Ser
 25 28

10 <210> 10
 <211> 25
 <212> NUCLEÓTIDO
 <213> SINTÉTICO
 <220>
 15 <223> OLIGONUCLEÓTIDO OE3F
 <400>
 CTGCTCATGG TATCAATCTT ATCGA 25

<210> 11
 <211> 20
 20 <212> NUCLEÓTIDO
 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO OE3R
 <400>

25 GATACCACAA GATCAGCCGT 20
 <210> 12
 <211> 25
 <212> NUCLEÓTIDO
 <213> SINTÉTICO

30 <220>
 <223> Sonda TaqMan SE2
 <400>
 CCACGGGAGG AATACCAACC CAGTG 25

<210> 13
 35 <211> 14
 <212> PÉPTIDO
 <213> Viral
 <220>
 <223> secuencia parcial de p54 responsable de unión a DLC8
 40 <400>

Tyr Thr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr
 5 10 14

<210> 14
 <211> 5
 <212> PÉPTIDO
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Motivo crítico de unión
 <220>
 <221> MUTANTE
 50 <222> 1
 <223> /NOTA= Ser
 <220>
 <221> MUTANTE
 <222> 3

<223> /NOTA= Ala
<400>

Thr Ala Ser Gln Thr
5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición antiviral que comprende un péptido capaz de unirse a la proteína DLC8 seleccionada del grupo: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9 y SEC ID NO: 14 cuando esta última secuencia tiene el resto aminoacídico Ser situado en la primera posición y/o el resto aminoacídico Ala situado en la tercera posición.
- 10 2. Composición antiviral de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el péptido contiene además medios para aumentar la internalización del péptido en la célula.
- 15 3. Composición antiviral de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el medio para internalizar el péptido en la célula consiste en una cola de 8 argininas.
- 20 4. Composición antiviral de acuerdo con la reivindicación 1, que también comprende otro compuesto activo y/o cualquier vehículo, excipiente, transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 25 5. Composición antiviral de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de las infecciones atribuibles a un virus seleccionado entre: VPPA, virus del papiloma humano, adenovirus, entomopoxvirus A. moorei, virus vaccinia, virus respiratorio sincitial, virus coxackie humano, virus de la rabia, virus del Herpes simple humano, virus Mokola o el virus del SIDA.
- 30 6. Péptidos que pertenecen a la familia representada por SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 1 o cualquier secuencia derivada de las mismas con cambios conservativos en al menos un aminoácido y capaces de unirse a la proteína DLC8, que se conjugan para ser detectables con un marcador fluorescente o cualquier etiqueta que permita que se detecten con un anticuerpo secundario, marcadores fluorescentes y cromógenos.
- 35 7. Péptidos de acuerdo con la reivindicación 6, seleccionados de: SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8 y SEC ID NO: 9.
- 40 8. Un método *in vitro* para evaluación de la internalización y tráfico citoplásmico de péptidos, particularmente de origen de virus, en la célula, por cualquier método usado en la actualidad tal como marcar uno de los péptidos que pertenecen a las familias representadas por SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 1 con un marcador rastreable directamente y detectarlo midiendo específicamente la señal emitida por el marcador unido al péptido o, indirectamente, por un marcador de segunda etapa en un anticuerpo secundario.
- 45 9. Un método *in vitro* para estudiar la biología celular y funciones de dineína en la célula marcando uno de los péptidos que pertenecen a las familias representadas por SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 1 o un anticuerpo secundario específico para dicho péptido, con un marcador rastreable y detectándolo midiendo la señal emitida por el marcador unido al péptido o al anticuerpo.
- 50 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 en el que el péptido o el anticuerpo se marca con un marcador fluorescente tal como fluoresceína, rodamina o cualquier otro marcador fluorescente conocido en el estado de la técnica que permite la detección por microscopio de fluorescencia directa.
- 55 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 en el que el péptido o el anticuerpo se marca con cualquier marcador no fluorescente tal como biotina, hemaglutinina, c-myc o GST.
- 60 12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 en el que el péptido se selecciona de: SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8 y SEC ID NO: 9.

BA71V	HPTEHYTTVTTQNTASQTMS	163
E75	HPTEHYTTVTTQNTASQTMS	163
PRETORISUSKOP	HPAEHYTTVTTQNTASQTMS	164
Lillie-148	HPAEHYTAVTTQNTASQTMS	164
Warthog	HPAEHYTTVTTQNTASQTMS	173
Warmbath	YPAEHYTTVTTQNTASQTMS	175
Tengani	HPAEHYTTVTTQNTASQTMS	179
Portalegre90	-PTEHYTTVTTQNTASQTMS	163
mafra86	-PTEHYTTVTTQNTASQTMS	163
Almodovar99	-PTEHYTTVTTQNTASQTMS	163
Mkuzi	-PTEHYTTVTTQNTASQTMS	163
Kenya1950	-SAELYTTATTQNTASQTMP	155
MALAWI	-----TDQLQTSQLQT	131

Figura 1

A

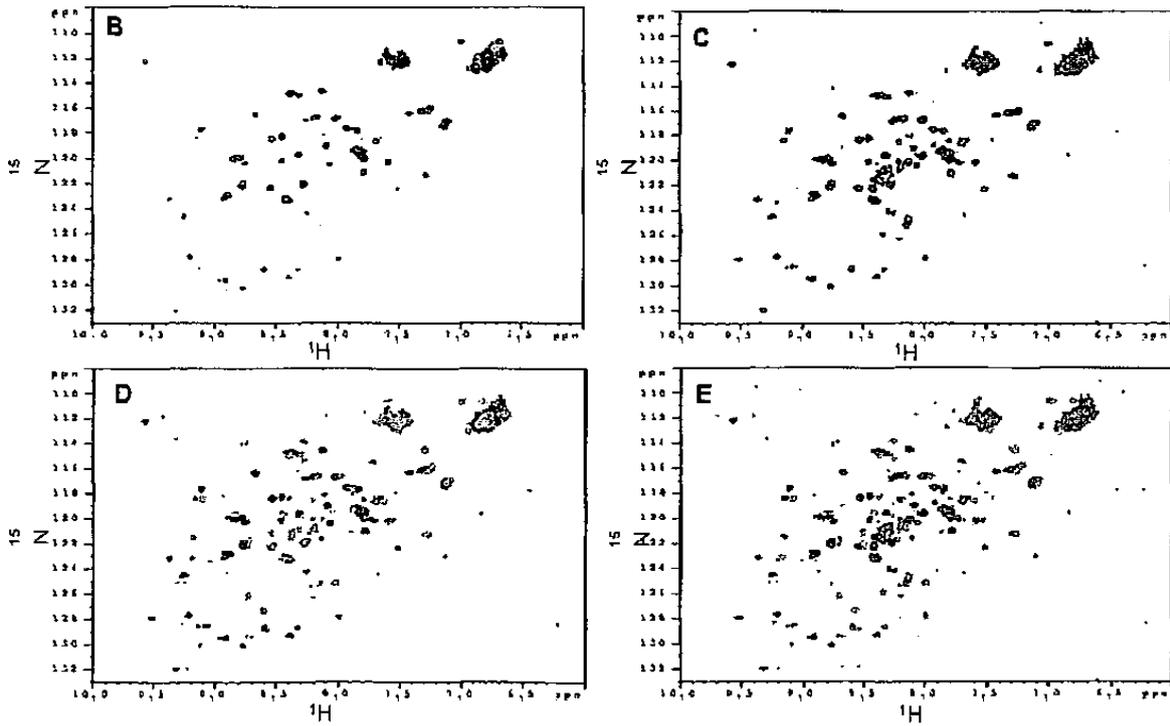
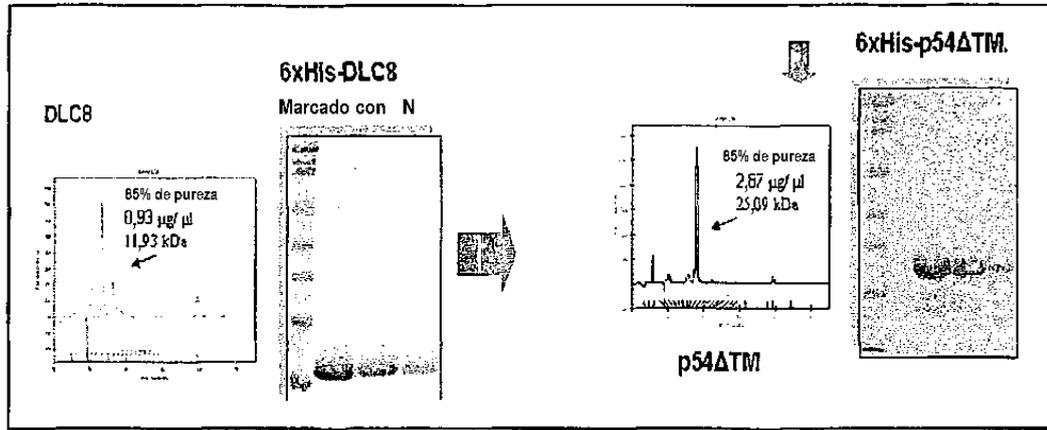


Figura 2

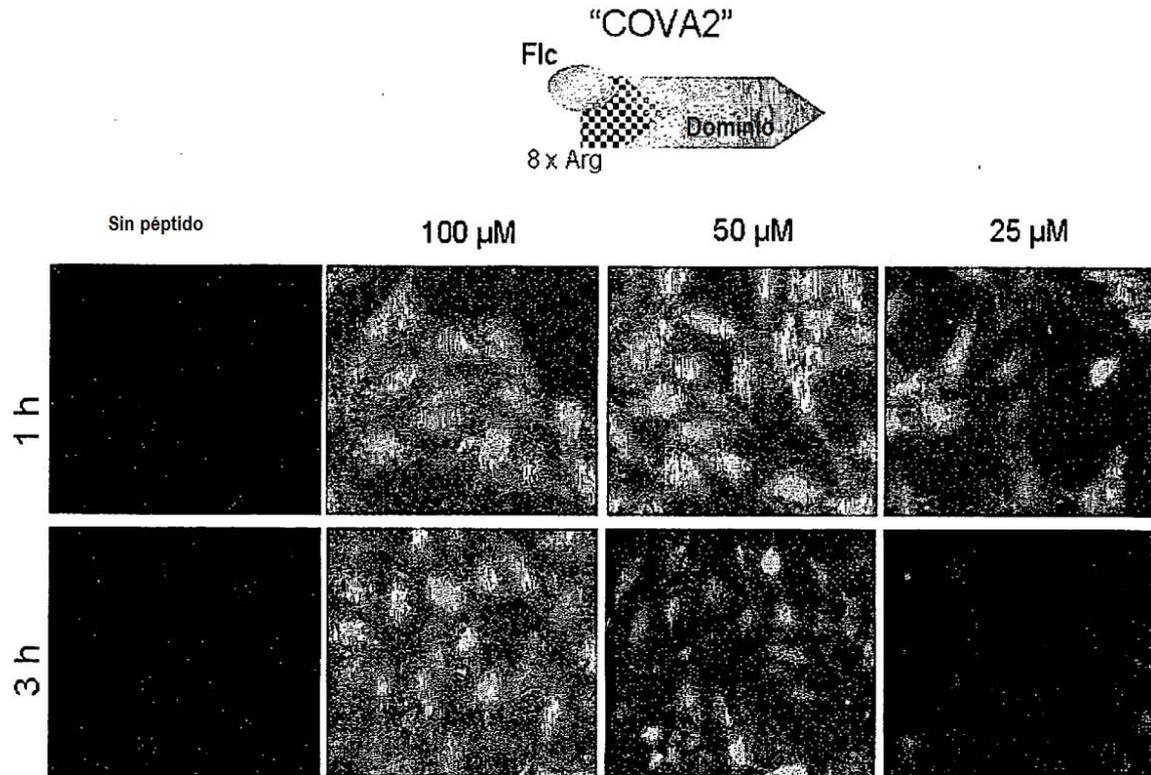


Figura 3

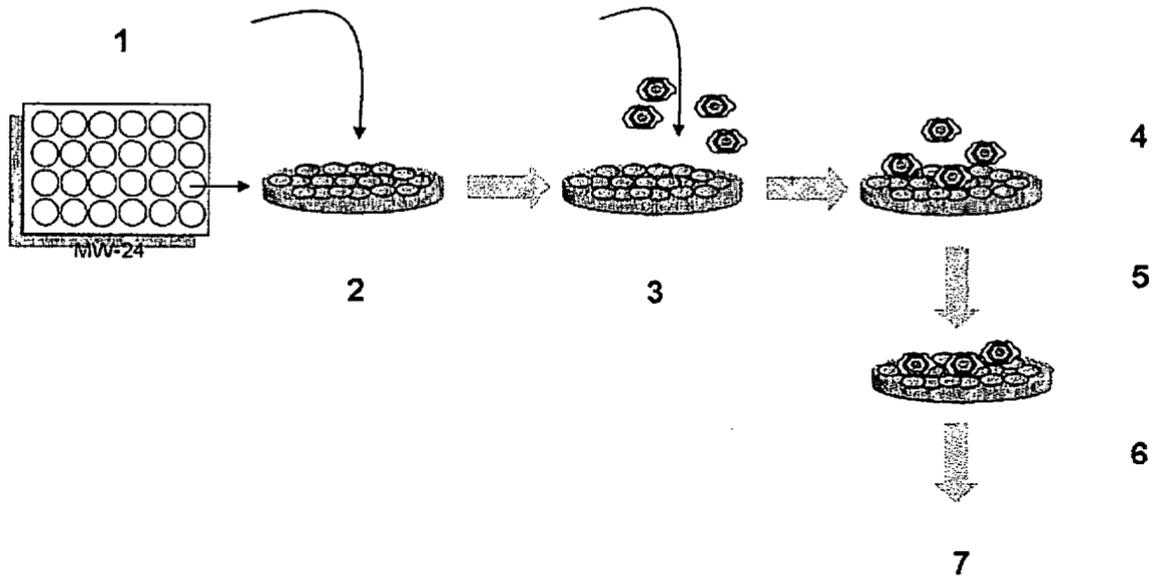


Figura 4

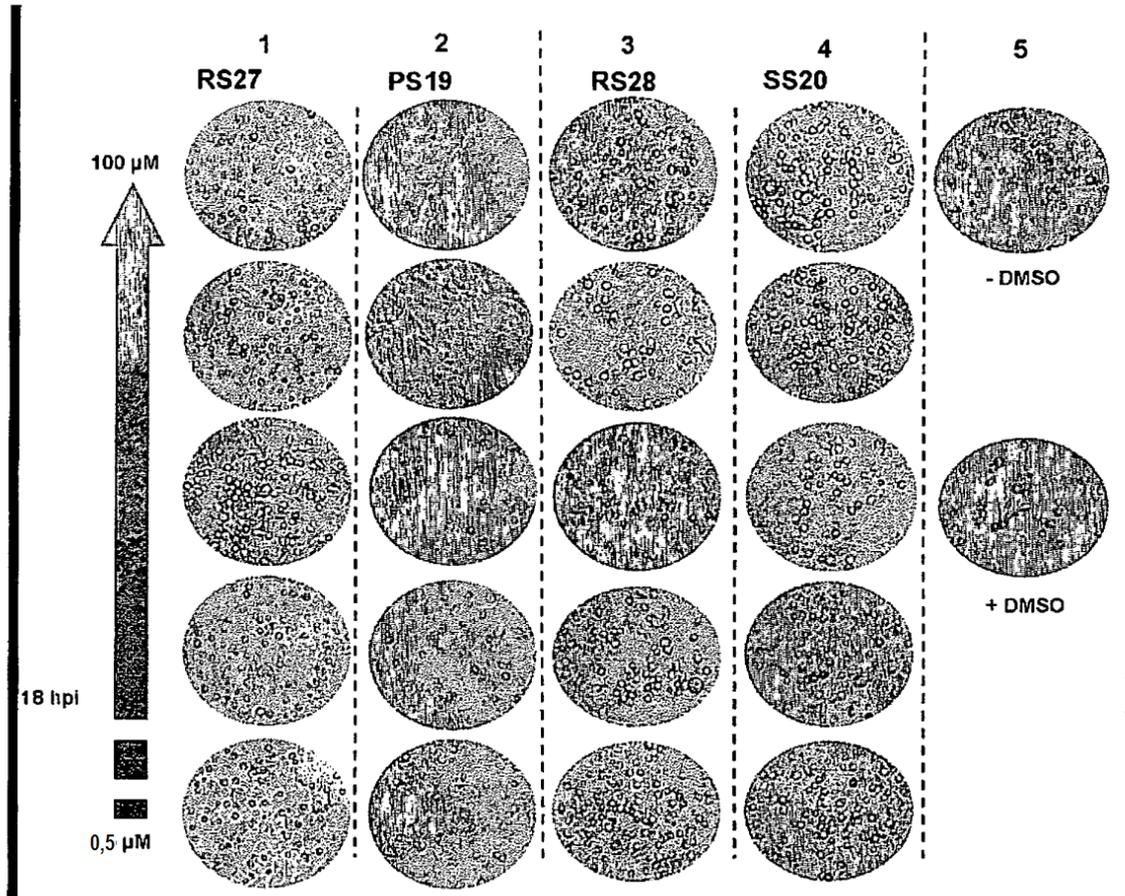


Figura 5

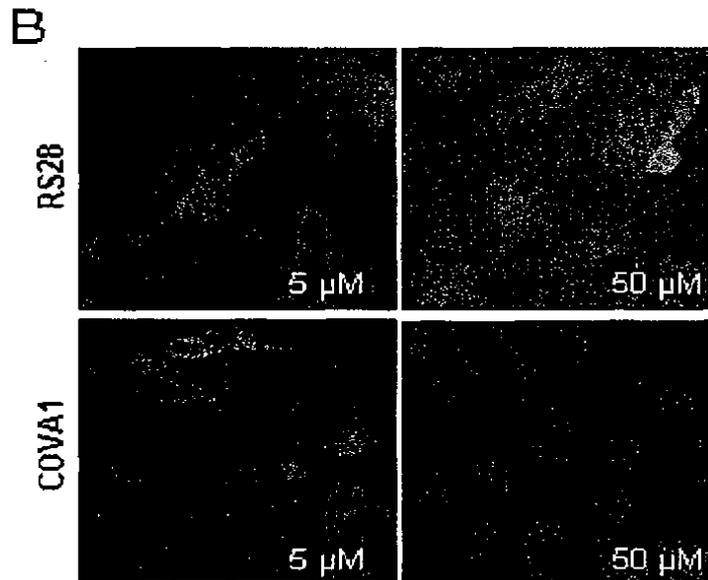
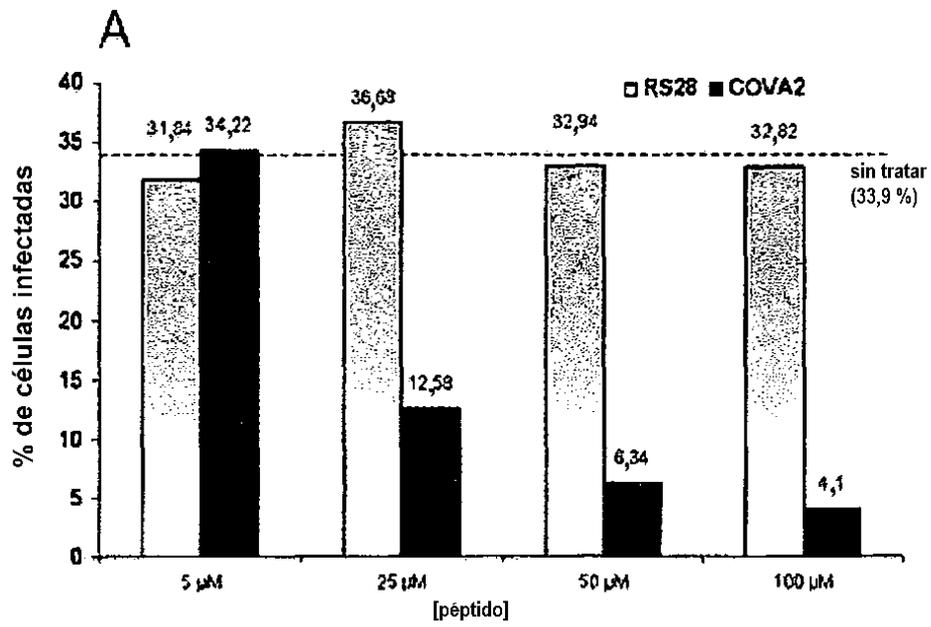


Figura 6

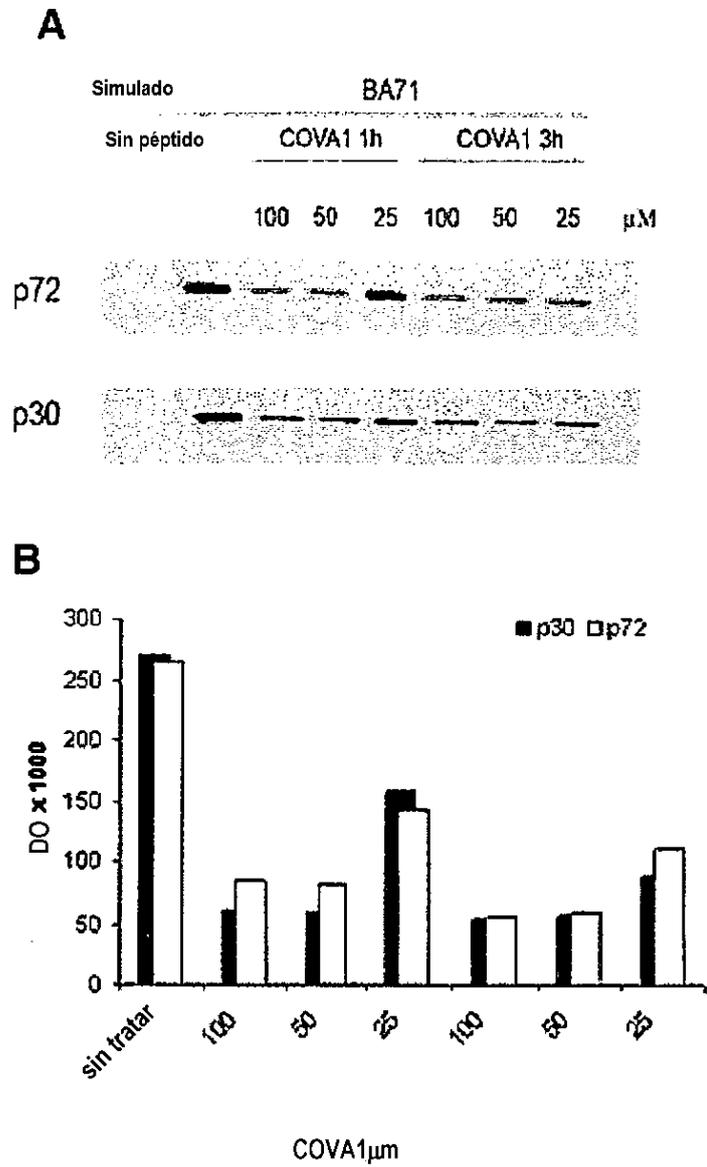


Figura 7

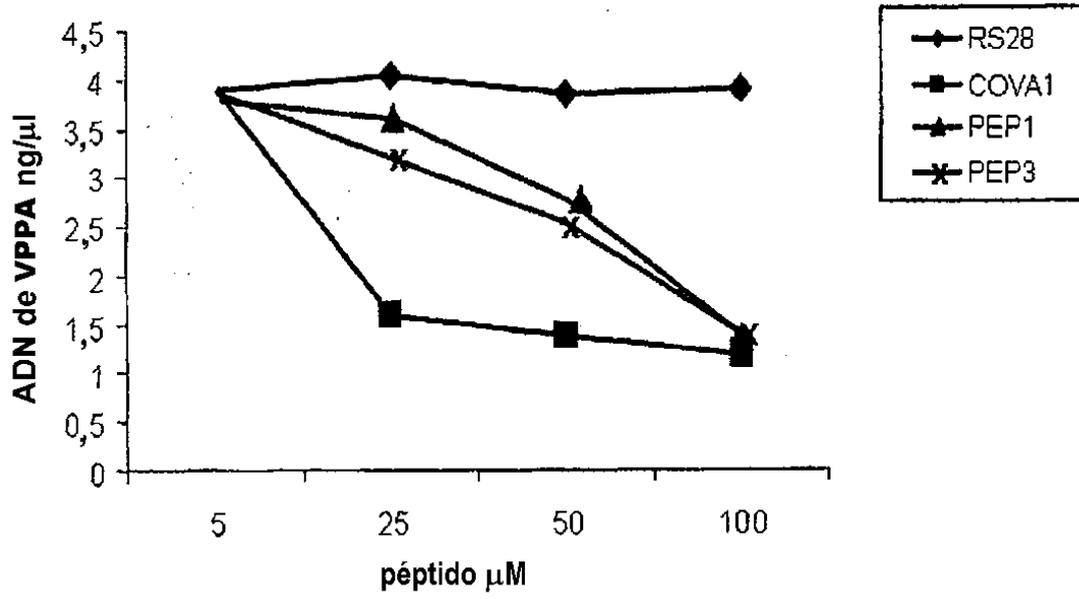


Figura 8

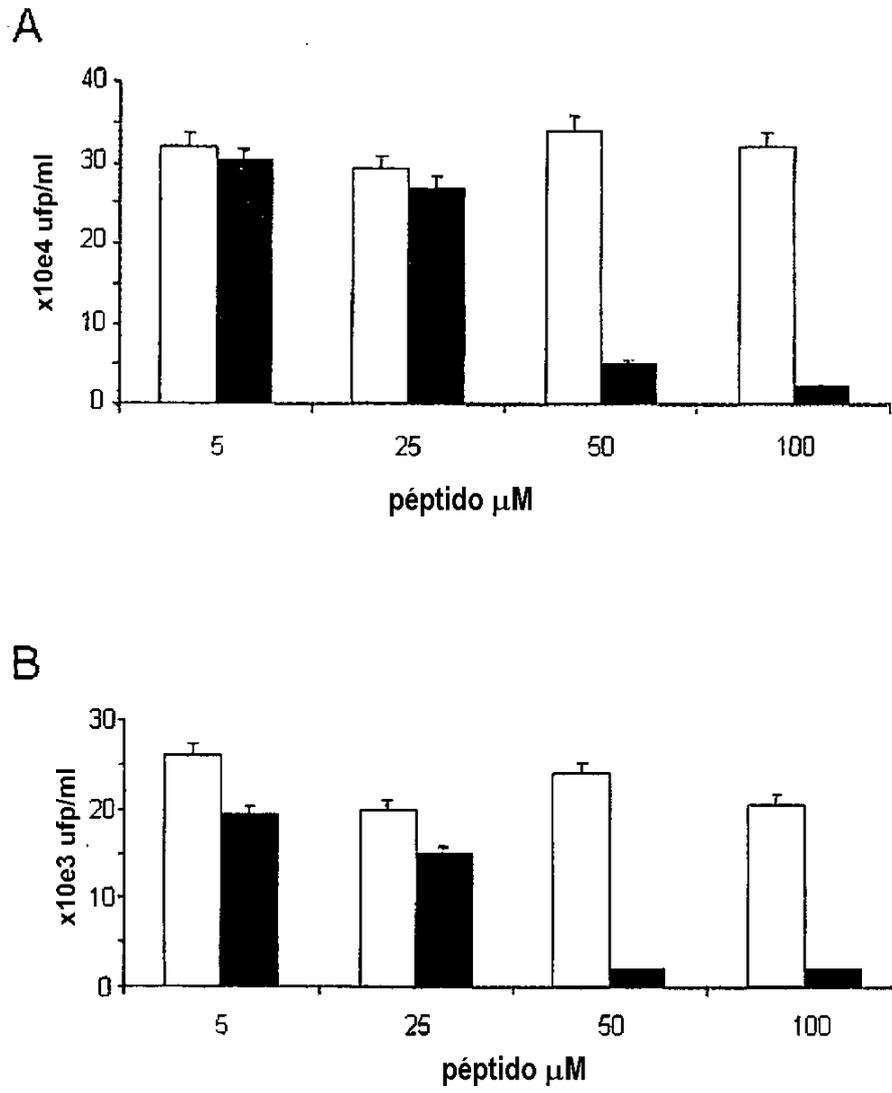


Figura 9

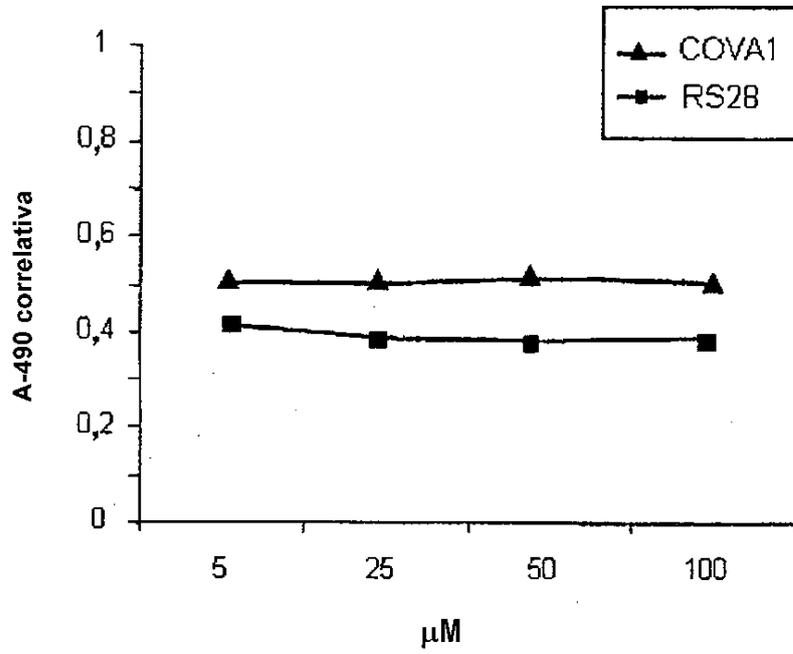


Figura 10

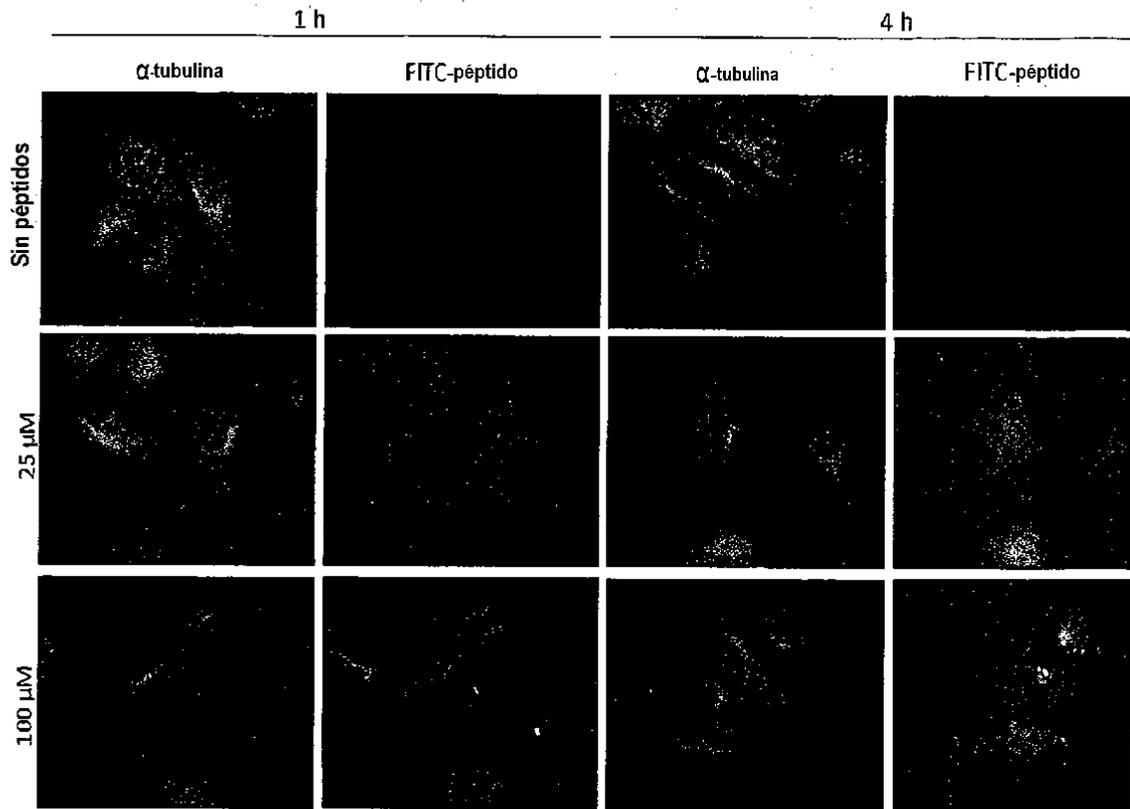


Figura 11

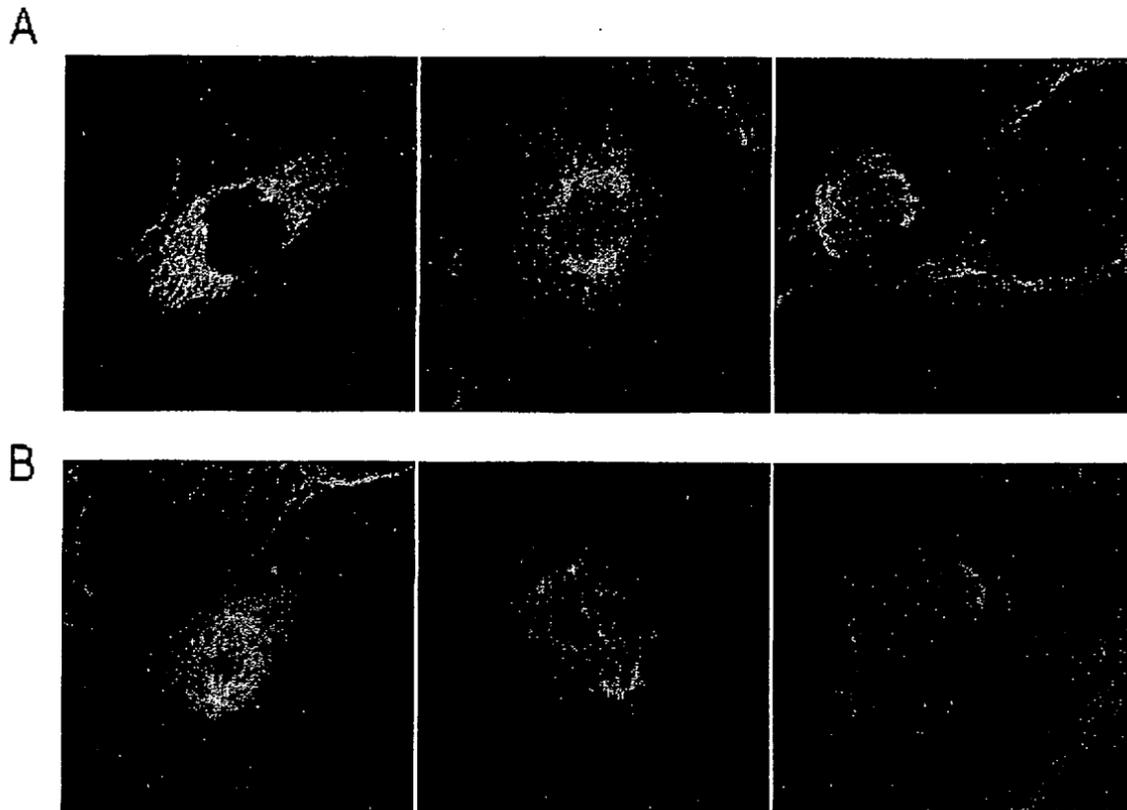


Figura 12

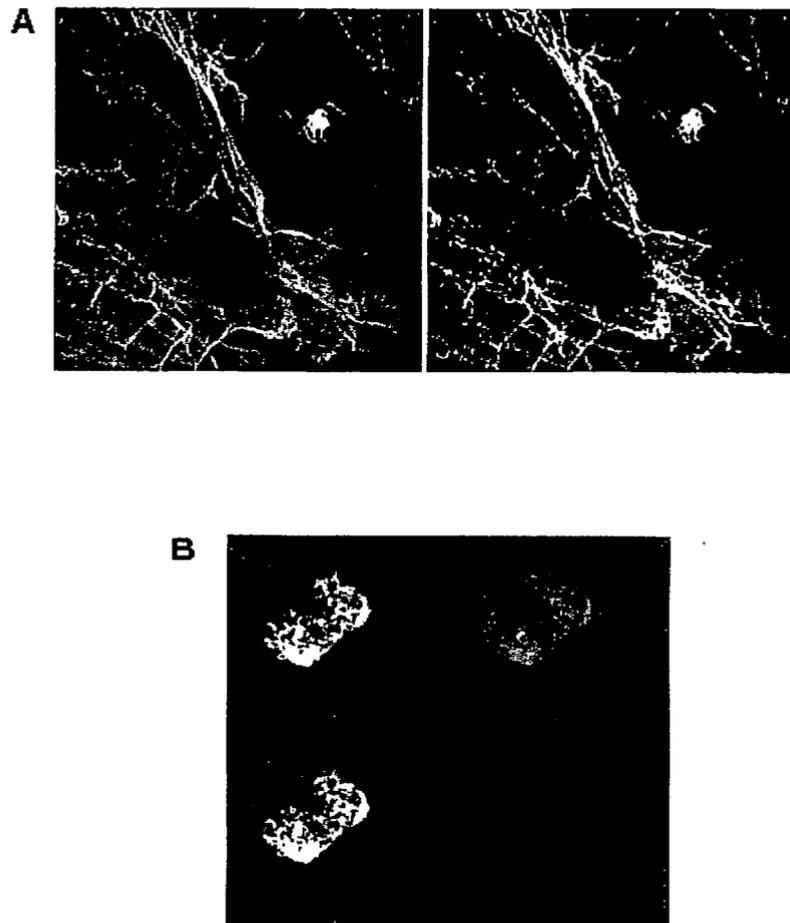


Figura 13

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- ES 200702792 [0082]

Literatura no patente citada en la descripción

10

- **Alonso, C. et al.** African swine fever virus p54 protein interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol*, 2001, vol. 75 (20), 9819-27 [0082]
- **Harrison, A. ; S.M. King.** The molecular anatomy of dynein. *Essays Biochem*, 2000, vol. 35, 75-87 [0082]
- **King, S.M.** Organization and regulation of the dynein microtubule motor. *Cell Biol Int*, 2003, vol. 27 (3), 213-5 [0082]
- **Enjuanes, L. et al.** Titration of African swine fever (ASF) virus. *J Gen Virol*, 1976, vol. 32 (3), 471-7 [0082]
- **Afonso, C.L. et al.** Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus. *Virology*, 1992, vol. 189 (1), 368-73 [0082]
- **Melikov, K. ; L.V. Chernomordik.** Arginine-rich cell penetrating peptides: from endosomal uptake to nuclear delivery. *Cell Mol Life Sci*, 2005, vol. 62 (23), 2739-49 [0082]
- **Tabares, E. et al.** Proteins specified by African swine fever virus. II. Analysis of proteins in infected cells and antigenic properties. *Arch Virol*, 1980, vol. 66(2), 119-32 [0082]
- **Cobbold, C. ; T. Wileman.** The major structural protein of African swine fever virus, p73, is packaged into large structures, indicative of viral capsid or matrix precursors, on the endoplasmic reticulum. *J Virol*, 1998, vol. 72 (6), 5215-23 [0082]
- **Nunes, J.F. ; J.D. Vigario ; A.M. Terrinha.** Ultrastructural study of African swine fever virus replication in cultures of swine bone marrow cells. *Arch Virol*, 1975, vol. 49 (1), 59-66 [0082]
- **Martinez-Moreno, M. et al.** Recognition of novel viral sequences that associate with the light chain dynein LC8 identified through a pepscan technique. *FEBS Letters*, 2003, vol. 544, 262-267 [0082]
- **King, D.P. et al.** Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Virol Methods*, 2003, vol. 107, 53-61 [0082]
- **Rodriguez-Crespo, I. et al.** Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Lett.*, 2001, vol. 503, 135-141 [0082]
- **Lo, K.W. et al.** The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 14059-14066 [0082]
- **Taylor, W.R.** The classification of amino acid conservation. *Journal of Theoretical Biology*, 1986, vol. 119, 205-218 [0082]