

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 462**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/37 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06804656 .4**
96 Fecha de presentación: **27.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1945797**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Ensayo de la actividad NS2/3 del virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:
28.10.2005 US 730999 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.08.2012

73 Titular/es:
**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH
BINGER STRASSE 173
55216 INGELHEIM AM RHEIN, DE**

72 Inventor/es:
**MAURICE, Roger y
THIBAUT, Diane**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

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).

ES 2 386 462 T3

DESCRIPCIÓN

Ensayo de la actividad NS2/3 del virus de la hepatitis C.

5 Campo de la invención

La presente invención hace referencia a un ensayo para la detección de la escisión de la proteína del VHC en una muestra, y más particularmente, a un ensayo para la detección selectiva de la actividad de autoescisión de la NS2/3 del VHC, y aún más particularmente para la identificación de compuestos inhibitorios potenciales del VHC.

10 Antecedentes de la invención

El virus de la hepatitis C (VHC) es el principal agente etiológico de hepatitis no-A, no-B postransfusional y adquirida en la comunidad a nivel mundial. Un porcentaje de portadores se convierten en infectados crónicos y muchos de ellos progresan hacia enfermedad hepática crónica, la llamada hepatitis C crónica. Este grupo, a su vez, presenta un alto riesgo de padecer una enfermedad hepática grave, tal como la cirrosis hepática, el carcinoma hepatocelular y la enfermedad hepática terminal, los cuales llevan a la muerte.

El VHC es un virus RNA de cadena positiva y cubierto de la familia *Flaviviridae*. El genoma RNA de cadena simple del VHC tiene una polaridad positiva y contiene un marco de lectura abierto (ORF) de aproximadamente 9.600 nucleótidos de longitud que codifica por una poliproteína lineal de aproximadamente 3.010 aminoácidos. En las células infectadas, esta proteína se escinde en múltiples lugares mediante proteasas celulares y virales para producir unas proteínas estructurales y no estructurales (NS). Las proteínas estructurales (C, E1, E2 y p7) contienen polipéptidos que constituyen la partícula viral. El procesamiento de las proteínas estructurales se cataliza mediante las proteasas de la célula huésped. Las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) codifican por enzimas o factores accesorios que catalizan y regulan la replicación del genoma RNA del VHC. La generación de proteínas no estructurales maduras se cataliza mediante dos proteasas codificadas por el virus. La primera es la proteasa NS2/3, la cual autocataliza la escisión entre NS2 y NS3. La NS3 contiene un dominio serín proteasa N-terminal y cataliza las escisiones restantes de la poliproteína. La proteína NS4A producida tiene, al menos, dos roles. El primer rol consiste en la formación de un complejo estable junto a la proteína NS3 y la colaboración en la localización en la membrana del complejo NS3/NS4A; el segundo consiste en la actuación como cofactor para la actividad proteasa NS3. A su vez, este complejo asociado a la membrana cataliza la escisión de los lugares restantes de la poliproteína, efectuando así la liberación de NS4B, NS5A y NS5B.

La escisión de la poliproteína del virus de la hepatitis C (VHC) entre las proteínas no estructurales NS2 y NS3 está mediada por la proteasa NS2/3, una actividad proteasa que está codificada por la región NS2 y el dominio proteasa NS3 mínimo que flanquea el lugar de la escisión. La proteasa NS2/3 se expresa en los hepatocitos infectados por el virus y los datos experimentales coinciden en su rol esencial para la propagación del virus y de la enfermedad. De hecho, no se observó una infección productiva en chimpancés en los que se había inoculado clones del VHC que contenían mutaciones que abolían la actividad proteasa NS2/3, sugiriendo que esta enzima codificada por el VHC es esencial para la replicación productiva *in vivo* (1).

Se ha definido una región catalítica mínima de la proteasa NS2/3 y ésta incluye el extremo C-terminal de NS2 y el extremo N-terminal del dominio proteasa NS3 (2-5). La variante NS2/3 (904-1206) del genotipo del VHC 1b se purificó a partir de los cuerpos de inclusión de *E. coli* y se replegó mediante cromatografía de filtración en gel tal y como se describe previamente (2, 3). La forma inactiva y purificada de NS2/3 (904-1206) puede activarse mediante la adición de glicerol y detergente para inducir la autoescisión en el lugar predicho entre el residuo de leucina 1026 y el residuo de alanina 1027 (2, 3). *In vitro*, la forma aislada de la proteína NS2/3 posee ambas actividades proteasa, es decir, la actividad de autoescisión de la proteasa NS2/3 y la actividad proteasa NS3. Se requiere la separación de los productos resultantes de la escisión del precursor NS2/3, o al menos la discriminación entre las dos formas de actividad proteasa NS3, para evaluar la cantidad de proteasa NS3 producida mediante la autoescisión de NS2/3 en la misma mezcla de reacción.

Se han descrito ensayos de detección de la escisión de la proteasa NS2/3 basados en la separación de los productos NS2 y NS3 procedentes del precursor NS2/3 mediante SDS-PAGE y mediante HPLC, así como un ensayo basado en la actividad proteasa NS3 de la proteína NS2/3, que también requiere la separación de precursores NS2/3 no escindidos del producto de la proteasa NS3 (2-5). Tales métodos pueden llevar mucho tiempo y no están adaptados al cribaje rápido. Además, aún no se ha desarrollado ningún ensayo que presente selectividad para la detección de los productos de escisión de NS2/3 en presencia de la NS2/3 no escindida.

Entonces sería deseable desarrollar un ensayo de escisión de la NS2/3 eficiente que salve una o más de las desventajas de los ensayos existentes. Particularmente, es deseable desarrollar un ensayo de escisión NS2/3 eficiente que discrimine entre las actividades proteasa NS3 de la proteína NS2/3 y los productos de escisión de la proteasa NS3.

Se proporciona un nuevo método de ensayo NS3-selectivo que incluye la escisión de la proteasa NS2/3 en una muestra y el tratamiento de la muestra escindida, lo cual permite la detección del producto de escisión NS3 en ella. El método es útil para detectar el producto de escisión de NS3 sin tener que separar el precursor NS2/3 del mismo.

5 Resumen de la invención

La presente invención proporciona un nuevo ensayo para la detección de la escisión de NS2/3. Más particularmente, la presente invención proporciona un nuevo ensayo para la detección del producto de escisión de NS3 en presencia de NS2/3 no escindida basado en la discriminación de la actividad del producto resultante de la proteasa NS3 respecto a la actividad proteasa NS3 de la proteína NS2/3 no escindida.

Hemos observado que ciertas condiciones de reacción permiten la discriminación *in situ* sin tener que recurrir a la separación física de ambas proteasas. Estas condiciones permiten esta discriminación mediante la disminución de la actividad de la proteasa NS3 de la proteína NS2/3 y el aumento de la actividad proteasa NS3 del producto resultante de la proteasa NS3, produciendo así una "ventana de señal" sobre la cual es factible la distinción y medición de la actividad proteasa NS3 producida a partir de la escisión de NS2/3.

En la presente invención, tras la autoescisión de NS2/3 para generar un producto de NS3, la muestra se incuba con un sustrato de NS3 en presencia de una cantidad suficiente de cofactor NS4A y un detergente adecuado. Tales condiciones adecuadas producirán un efecto discriminatorio entre ambas formas de la proteasa.

Consecuentemente, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la detección de la actividad de autoescisión de NS2/3 en una muestra que contiene la proteasa NS2/3 sin que haya una separación física entre la proteasa NS3 y la proteasa NS2/3, y el método incluye los pasos de:

- a) someter la muestra a unas condiciones bajo las cuales al menos una porción de la proteasa NS2/3 se autoescinde para producir un producto de la proteasa NS3;
- b) incubar la muestra que contiene el producto de la proteasa NS3 generado en el paso a) con una cantidad adecuada de un cofactor NS4A en presencia de un detergente adecuado y un sustrato de NS3 apropiado bajo las condiciones suficientes para permitir que el producto de la proteasa NS3 catalice la escisión del sustrato de NS3 para producir un subproducto del sustrato NS3; y
- c) detectar el subproducto del sustrato de NS3 generado en el paso b), donde la detección del subproducto del sustrato de NS3 indica la actividad de autoescisión de NS2/3 en una muestra.

Tal y como los expertos en la materia entenderán, la detección del subproducto del sustrato de NS3 puede medirse para producir una cantidad específica que se correlacione con la cantidad de la autoescisión de NS2/3.

La presente invención también es útil para cribar compuestos inhibitorios de NS2/3 candidatos que pueden ser útiles en la terapéutica anti-VHC.

Consecuentemente, en un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el cribado de un compuesto candidato para la actividad inhibitoria de la autoescisión de NS2/3 en una muestra que contiene la proteasa NS2/3, y el ensayo incluye:

- a) someter una primera muestra que contiene la proteasa NS2/3 a unas condiciones bajo las cuales al menos una porción de la proteasa NS2/3 se autoescinde para producir un producto de la proteasa NS3;
- b) someter una segunda muestra que contiene la proteasa NS2/3, en presencia de un compuesto candidato, a las mismas condiciones que en el paso a);
- c) incubar cada una de las muestras primera y segunda con una cantidad suficiente de un cofactor NS4A en presencia de un detergente adecuado y un sustrato de NS3 apropiado durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el producto de la proteasa NS3 catalice la escisión del sustrato de NS3 para producir un subproducto del sustrato NS3;
- d) determinar la cantidad del subproducto del sustrato de NS3 generado en cada una de las muestras primera y segunda, donde la disminución en la cantidad del subproducto del sustrato NS3 generado en la segunda muestra en comparación con la cantidad de subproducto del sustrato NS3 generado en la primera muestra indica que el compuesto candidato puede ser un inhibidor de la actividad de autoescisión de NS2/3.

Tal como los expertos en la materia reconocerán, en el método/ensayo de la presente invención se pueden utilizar otros tipos de proteasas autoescindibles similares o homólogas a la proteasa NS2/3 del VHC en la búsqueda de inhibidores respectivos. Estas otras proteasas pueden encontrarse en pestivirus tales como, pero sin limitarse a: los

virus GB A, B, o C; el virus de la diarrea viral bovina (VDVB); el virus de la fiebre porcina clásica; el virus de la enfermedad de la frontera; el pestivirus bovino; y el pestivirus porcino.

Estos y otros aspectos de la presente invención se describen aquí mediante la referencia a las siguientes figuras.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una representación esquemática de un ensayo de la proteasa NS2/3 de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

La figura 2 ilustra gráficamente la actividad de la proteasa NS3 en un muestra de ensayo antes y después del paso de la autoescisión de acuerdo con el ensayo de la figura 1;

La figura 3 ilustra gráficamente los resultados obtenidos con un ensayo de la proteasa NS2/3 de acuerdo con el ensayo del ejemplo 3; y

La figura 4 ilustra gráficamente la curva IC₅₀ del compuesto A obtenida mediante una realización del presente ensayo de la proteasa NS2/3 de acuerdo con el ejemplo 3.

Descripción detallada de la presente invención

Definiciones

A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tiene el mismo significado que el que habitualmente entiende aquel con habilidades ordinarias en la materia a la que pertenece la invención. Generalmente, los procedimientos para el cultivo celular, la infección, la purificación de proteínas, los métodos de biología molecular y similares son métodos comunes utilizados en la materia. Tales técnicas pueden encontrarse en los manuales de referencia tales como, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press); Ausubel et al. (1994, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, Nueva York) y Coligan et al. (1995, Current Protocols in Protein Science, Volumen 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Las designaciones "P3, P2, P1, P1', etc.." tal y como se utilizan aquí hacen referencia a la posición de los residuos de aminoácidos comenzando por el extremo N-terminal de los análogos del péptido y extendiendo hacia y más allá del lugar de escisión, es decir el enlace en un sustrato de la enzima proteasa que normalmente se escinde mediante la acción catalítica de una enzima proteasa. Consecuentemente, P3 hace referencia a la posición 3 del lado C-terminal del lugar de escisión, P2 a la posición 2 del lado C-terminal del lugar de escisión, etc. El enlace entre los residuos P1 y P1' corresponde al lugar de escisión. Consecuentemente, la posición P1' corresponde a la primera posición en el lado N-terminal del lugar de escisión (véase Berger A. & Schechter I., Transactions of the Royal Society London series B257, 249-264 (1970)). Por ejemplo, tales péptidos pueden expresarse como: P3-P2-P1↓P1'-P2'... Etc.

Las secuencias de nucleótidos se presentan aquí mediante cadenas simples, en dirección 5'-3', de izquierda a derecha, utilizando los símbolos de una letra de los nucleótidos tal y como se utilizan habitualmente en la materia y de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica (Biochemistry, 1972, 11:1726-1732).

Todos los valores y concentraciones presentados aquí están sujetos a variaciones inherentes y aceptables en la ciencia biológica dentro de un margen de error del 10%. El término "aproximadamente" también hace referencia a esta variación aceptable.

El término "control negativo" tal y como se utiliza aquí significa un recipiente de reacción sometido a las mismas condiciones que los otros utilizados en el experimento, pero con la omisión de un factor crucial (tal como la enzima o el sustrato).

En el caso particular que nos ocupa, el agente de activación que permite la autoescisión de NS2/3 se omite en los pocillos control negativos.

Proteasa NS2/3

El término "NS2/3", "proteína NS2/3" o "proteasa NS2/3", utilizados aquí de forma intercambiable, hacen referencia a la región de la poliproteína del virus de la hepatitis C (VHC) que cataliza la escisión del dominio NS2 (810-1026) del dominio NS3 (1027-1615), así como las variantes funcionalmente equivalentes de la misma. En una realización tal y como se describe aquí, está codificada por la región nativa NS2 (específicamente, los aminoácidos 810-1026) y el dominio proteasa NS3 mínimo (1027 a 1206) de la poliproteína (numerada de acuerdo con la secuencia del genotipo

1 a H77, con el número de acceso GenBank AAB67036) al cual se hace referencia aquí como 810*-1206 [Id. de Sec. N° 1; *donde el aminoácido 810 corresponde al aminoácido 1 de la Id. de Sec. N° 1].

Las variantes funcionalmente equivalentes de la proteasa NS2/3 están comprendidas en el término "NS2/3", "proteína NS2/3" o "proteasa NS2/3", y "funcionalmente equivalente" hace referencia a variantes capaces de catalizar la escisión de NS2/3 tales como las variantes de otros aislados de VHC/genotipos. El término "variante" también hace referencia a una proteína derivada de la NS2/3 nativa, pero con modificaciones en la secuencia mediante la inserción, la delección, la sustitución o la modificación de uno o más aminoácidos. Con respecto a las sustituciones de los aminoácidos, éstas generalmente incluyen sustituciones de aminoácidos conservativas que no afectan a la función NS2/3 de la proteína tal y como pueden apreciar los expertos en la materia. También incluye aminoácidos modificados, por ejemplo, aminoácidos que contienen cadenas laterales modificadas.

Además, una "variante funcionalmente equivalente" hace referencia a truncamientos que incluyen la región catalítica mínima de la proteasa NS2/3, de la cual se ha determinado que incluye el extremo C-terminal de NS2 (comenzando en la posición de aminoácido 907 de la poliproteína) y el extremo N-terminal de NS3 (hasta la posición de aminoácido 1206) (5). De acuerdo con esto, los truncamientos de NS2/3 que incluyen estas delecciones de aminoácidos, llamados "fragmento NS2/3" son ejemplos de variantes de acuerdo con la presente invención, tales como: (907-1206; Id. de Sec. N° 2) o (904-1206; Id. de Sec. N° 3). Adicionalmente, los mutantes con delecciones de NS2/3 que incluyen cualquier número de delecciones de aminoácidos entre la secuencia nativa de NS2/3 (810-1615 o 810-1206) y la NS2/3 truncada (907-1206) también se contemplan como variantes de acuerdo con la presente invención. Igualmente, se conocen otras variantes en la materia, tales como las que se describen en las patentes WO 01/68818, WO 02/48375 y US 6.815.159.

Tal y como se reconoce en la materia o la técnica, el término "variante" también comprende modificaciones de la proteína tales como la adición de marcadores de afinidad o marcadores detectables con tal de facilitar la extracción/purificación o la detección/medición. También se comprenden en el término "variante" las sustituciones o las inserciones, tales como la adición de aminoácido(s) para potenciar la solubilidad (tal como la lisina). Un ejemplo de tal variante es (4K-6H-904-1206-ST-4K) [Id. de Sec. N° 4].

Si una variante funcionalmente equivalente de la proteasa NS2/3 se utiliza en el ensayo de acuerdo con la presente invención, es necesario confirmar que el péptido modificado mantiene la actividad de autoescisión de NS2/3. Esto se puede llevar a cabo mediante la utilización de ensayos de escisión estándares tales como los que se describen en las referencias 2-5, citadas aquí.

El término "al menos una porción de la proteasa NS2/3 se escinde" significa que al menos se escinde una porción de la cantidad total de la proteasa NS2/3 presente en la mezcla del ensayo.

Marcador de afinidad

El término "marcador de afinidad" o "etiqueta de afinidad", tal y como se utiliza aquí, significa un ligando cuya fuerte afinidad por un receptor (o un ligando complementario) se puede utilizar para extraer (por ejemplo, de una solución) o atrapar específicamente la entidad a la que el ligando está adherido covalentemente. Los marcadores de afinidad son herramientas indispensables que se desarrollaron para facilitar la detección y la purificación de proteínas recombinantes. Se pueden clasificar en dos categorías: 1) marcadores de afinidad que utilizan fusiones de péptidos o proteínas que se unen a ligandos moleculares pequeños enlazados a un soporte sólido (marcador de hexahistidina que se une a metales de transición inmovilizados, tal como el níquel, o la GST que se une a glutatión); o 2) marcadores peptídicos que se unen a un compañero de unión a proteínas inmovilizado (incluyendo anticuerpos) tal como el marcador FLAG, el péptido de unión a la calmodulina, el marcador Strep o el marcador Strep II y el péptido aceptor de biotina. Algunos ejemplos de pares de marcadores de afinidad/ligandos de afinidad incluyen, pero no se limitan a: proteína de unión a maltosa (MBP)/maltosa; Glutatión-S-transferasa (GST)/glutatión; histidina (His)/metal; avidina/biotina; marcador Strep/estreptavidina o neutravidina. El metal que se utiliza como ligando de afinidad puede seleccionarse de un grupo que incluye: cobalto, zinc, cobre, hierro, y níquel. El marcador de afinidad puede colocarse en el extremo N- o C-terminal de la proteína, pero particularmente en el extremo N-terminal de la proteína. Particularmente, el metal seleccionado es níquel. El ligando de afinidad puede configurarse en columnas para facilitar la separación mediante cromatografía de afinidad. Como referencia, un artículo de revisión se publicó recientemente (13).

Proteasa NS3

Tal y como se utiliza aquí, el término "producto de la proteasa NS3" hace referencia a un dominio proteasa NS3 que se escinde o se libera de la proteasa NS2/3. El producto de NS3 puede corresponderse con la NS3 nativa (1027-1615), o puede ser una variante funcionalmente equivalente de la misma, es decir una variante que mantiene la actividad proteasa NS3. En una realización, en una construcción descrita aquí, el dominio proteasa NS3 se representa mediante los aminoácidos 1027-1206 de la Id. de Sec. N° 3; no obstante, un experto en la técnica apreciará que el producto de la proteasa NS3, de acuerdo con la presente invención, puede modificarse mediante la

inserción, la delección, la modificación o la sustitución de uno o más aminoácidos tal y como se describe con anterioridad. Se prevé que tales modificaciones se corresponderán con las modificaciones existentes en el dominio NS3 de la proteasa NS2/3 utilizada en el ensayo. El término "producto de la proteasa NS3" se utiliza de forma intercambiable con los términos "producto de NS3" "proteasa NS3", "producto escindido de NS3" o "el producto de la escisión de NS3".

En la presente realización, tras la escisión de NS2/3 para la generación de un producto de la proteasa NS3, se incubaba la muestra con un sustrato de la proteasa NS3 marcado (al que también se hace referencia como sustrato de NS3) en presencia de una cantidad suficiente de cofactor NS4A y un detergente adecuado.

Sustrato de NS3

La caracterización *in vitro* de los sustratos sintéticos de la proteasa NS3 basada en todos los lugares naturales de escisión reveló la siguiente secuencia consenso (D/E)XXXXC↓(A/S) [Id. de Sec. Nº 5] para todos los lugares de escisión *trans* (14), donde X es cualquier aminoácido y el enlace escindible está localizado entre el residuo de Cys P1 y el residuo de Ala o Ser P1'. Estos estudios también mostraron que los mejores sustratos estaban basados en los lugares de escisión naturales de NS4A/NS4B o NS5A/NS5B, tales como por ejemplo: DEMEEC-ASH [Id. de Sec. Nº 6] o DDIVCC-SMSYTW [Id. de Sec. Nº 7], respectivamente.

El sustrato utilizado en el ensayo de la proteasa NS2/3 basado en la actividad de la proteasa NS3 se ha descrito en (7). Tales sustratos depsipeptídicos incorporan un enlace éster entre los residuos P1 y P1' y se escinden de manera eficiente mediante la serín proteasa a causa de que la formación del intermediario acil-enzima se lleva a cabo mucho más fácilmente debido a una reacción de transesterificación termodinámicamente más favorable.

Otros sustratos útiles de esta invención son aquellos que están enlazados a un marcador detectable. En realizaciones adicionales, el sustrato de NS3 se marca con fines de detección. El sustrato puede marcarse utilizando marcadores que se utilizan convencionalmente en la materia incluyendo, por ejemplo, marcadores fluorescentes tales como pares de radicales donadores fluorescentes y radicales aceptores fluorescentes, otros tipos de marcadores detectables y marcadores colorimétricos. Los marcadores radioactivos son otros marcadores prácticos y detectables, tal como I¹²⁵, o β-galactosidasa. Tales otros marcadores detectables pueden encontrarse en *Invitrogen-Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technology*, 10ª ed. 2005.

Tal y como se utiliza aquí, los términos "marcador", "marcador detectable" o "etiqueta detectable" hacen referencia a cualquier grupo que se pueda unir al sustrato de NS3 para permitir el reconocimiento directo o indirecto del subproducto del sustrato de NS3 resultante, de manera que éste puede detectarse, medirse y cuantificarse. Algunos ejemplos de tales "marcadores" incluyen, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores colorimétricos, marcadores enzimáticos, isótopos radioactivos y marcadores de afinidad tales como la biotina. Tales marcadores se adhieren al péptido mediante métodos bien conocidos. Se puede introducir un marcador, o múltiples marcadores, de la presente invención en cualquier posición del péptido, por ejemplo, el marcador puede estar tanto en el extremo C- o N-terminal como en el medio del péptido, siempre que no perturbe sus propiedades funcionales para ser reconocido y escindido por la proteasa NS3.

Los sustratos de la proteasa NS3 fluorogénicos depsipeptídicos marcados internamente se diseñaron en base a la transferencia de energía por resonancia entre un par donador/aceptor y se pueden describir genéricamente de la siguiente manera: (*donador/aceptor*) – secuencia de aminoácidos del lugar P - [C(O)-O] – secuencia de aminoácidos del lugar P' - (*aceptor/donador*).

El término "radical donador fluorescente", tal y como se utiliza aquí, significa un radical emisor de fluorescencia que puede modificarse y adherirse a la secuencia de aminoácidos. Algunos ejemplos de tales radicales son aquellos derivados del 2-aminobenzoil (y derivados halogenados del mismo), 5-[(2-aminoetil)amino]-naftalen-1-sulfonilo (EDANS), 7-metoxicumarin-4-acetilo, ácido nicotínico (y derivados del mismo) y triptófano.

El término "radical aceptor fluorescente", tal y como se utiliza aquí, significa un radical aromático marcador que absorbe la energía fluorescente del radical donador fluorescente y que reduce la emisión de fluorescencia cuando el radical donador de fluorescencia se une covalentemente en estrecha proximidad al radical aceptor. Algunos ejemplos de tales radicales incluyen 3-nitrotirosina, 4-nitrofenilalanina, 2,4-dinitrofenilalanina, 5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonilo (DANSIL), 4-[[4-(dimetilamino)fenil]azo]benzoil (DABCIL) o 4-(dimetilamino)azobencen-4'-sulfonil (DABSIL).

Algunos ejemplos de pares de radicales donador/aceptor se seleccionan de los siguientes pares:

EDANS / DABCIL;
triptófano / 2,4-dinitrofenilalanina;
triptófano / DABSIL;
7-metoxicumarin-4-acetilo / 2,4-dinitrofenilalanina;

2-aminobenzoil / 2,4-dinitrofenilalanina; o
2-aminobenzoil / 3-nitrotirosina.

Cofactor NS4A

[0041] Generalmente, el cofactor NS4A (también referido como NS4A_{péptido}) es un péptido derivado de un dominio central e hidrofóbico de la proteína NS4A, tal como GSVVIVGRILSGR [Id. de Sec. N° 8], como se describe en la referencia (11). Debe comprenderse que en el contexto de la presente invención, se pueden emplear variantes del cofactor natural NS4A en la presente invención, tales como variantes que contienen sustituciones conservativas o aminoácidos añadidos para la solubilidad, siempre que no se vea comprometida la actividad del cofactor en conjunción con la proteasa NS3. La actividad del cofactor puede evaluarse mediante el método de Urbani et al. (12).

Tal y como se utiliza aquí, el término "detergente" significa una molécula de superficie activa y anfipática con dominios polares y no polares. Estos se unen fuertemente a moléculas hidrofóbicas o a dominios moleculares para conferir solubilidad acuosa. Algunos ejemplos de detergentes incluyen, pero no se limitan a: sulfato de dodecil sódico (SDS), sales de ácidos grasos, la familia Triton®, octilglicosida, 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propansulfonato (CHAPS), maltósido de dodecil sódico (DM), óxido de laurildietilamina (LDAO), NP-40 y la familia Tween®.

Tal y como se utiliza aquí, el término "inhibir" o "actividad inhibitoria", cuando se utiliza en referencia a la proteasa NS2/3, pretende significar que la capacidad de la proteasa para autoescindirse disminuye. Los fármacos o ligandos que pueden inhibir la proteasa NS2/3 (en adelante referidos como "inhibidores" potenciales) pueden ser útiles para la modulación de la infección del VHC en una población de células y, por consiguiente, pueden ser útiles como medicamentos para el tratamiento de una patología caracterizada por la presencia del VHC en las células.

El término "subproducto de NS3", "subproducto de la proteasa NS3" o "subproducto de la escisión de NS3" o "subproducto del sustrato de NS3", que se utilizan de forma intercambiable aquí, significan el producto resultante de la escisión del sustrato de NS3 mediante la proteasa NS3, ya sea en forma de NS2/3, de proteasa NS3 o de cualquier otra forma activa de proteasa NS3.

Realizaciones específicas

Por consiguiente, en una realización del primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la detección de la actividad de autoescisión de NS2/3 en una muestra que contiene la proteasa NS2/3 sin que haya una separación física entre la proteasa NS3 y la proteasa NS2/3, y el método incluye los pasos de:

a) someter la muestra a unas condiciones bajo las cuales al menos una porción de la proteasa NS2/3 se autoescinde para producir un producto de la proteasa NS3;

b) incubar la muestra que contiene el producto de la proteasa NS3 generado en el paso a) con una cantidad adecuada de un cofactor NS4A en presencia de LDAO o DM y un sustrato de NS3 apropiado, bajo unas condiciones que permiten que el producto de la proteasa NS3 catalice la escisión del sustrato de NS3 para producir un subproducto del sustrato NS3; y

c) detectar el subproducto del sustrato de NS3 generado en el paso b), donde la detección del subproducto del sustrato de NS3 indica la actividad de autoescisión de NS2/3 en una muestra.

En una realización del segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un ensayo para el cribaje de un compuesto candidato para la actividad inhibitoria de la autoescisión de NS2/3 en una muestra que contiene la proteasa NS2/3, y el ensayo incluye:

a) someter una primera muestra que contiene la proteasa NS2/3 a unas condiciones bajo las cuales al menos una porción de la proteasa NS2/3 se autoescinde para producir un producto de la proteasa NS3;

b) someter una segunda muestra que contiene la proteasa NS2/3, en presencia de un compuesto candidato, a las mismas condiciones que en el paso a);

c) incubar cada una de las muestras primera y segunda con una cantidad suficiente de un cofactor NS4A en presencia de LDAO o DM y un sustrato de NS3 apropiado durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el producto de la proteasa NS3 catalice la escisión del sustrato de NS3 para producir un subproducto del sustrato NS3;

d) determinar la cantidad del subproducto del sustrato de NS3 generado en cada una de las muestras primera y segunda, donde la disminución en la cantidad del subproducto del sustrato NS3 generado en la segunda muestra en comparación con la cantidad de subproducto del sustrato NS3 generado en la primera muestra

indica que el compuesto candidato puede ser un inhibidor de la actividad de autoescisión de NS2/3.

Desde luego, y como reconocerán los expertos en la técnica, debe llevarse a cabo un contraensayo adecuado para asegurar que se puede distinguir entre un inhibidor de la proteasa NS3 y un inhibidor de la actividad de autoescisión de NS2/3. Un contraensayo como el ensayo de la proteasa NS3 se conoce bien en la materia.

Variante de la proteasa NS2/3

Particularmente, la variante de NS2/3 (4K-6H-904-1206-ST-4K) de Id. de Sec. N° 4 se utiliza en el ensayo de la presente invención.

Condiciones del ensayo de autoescisión de NS2/3

En un primer paso del presente método, se somete una muestra a unas condiciones bajo las cuales NS2/3 se escinde para producir un producto de NS3. Tales condiciones, incluyendo la utilización de un detergente como agente de activación, se conocen en la materia (2-5) y aquí también se ejemplifican las condiciones adecuadas.

Particularmente, la NS2/3 se prepara originalmente en una solución de LDAO para prevenir la autoescisión con anterioridad al comienzo del ensayo. Particularmente, la concentración de LDAO debería ser muy superior a la concentración micelar crítica (CMC) para bloquear la autoescisión. Más particularmente, en las presentes condiciones del ensayo, el LDAO debería estar presente en la solución al 0,5-1,5%, más particularmente, aproximadamente al 1 %. La solución de NS2/3 se diluye después en una solución que carece de LDAO, para lograr concentraciones menores con el fin de que la autoescisión proceda.

Por consiguiente, la reacción de autoescisión se induce mediante la disminución de la concentración de LDAO, en presencia de un agente de activación, y el agente de activación es un detergente seleccionado a partir del grupo que incluye: CHAPS, Triton X-100, NP-40 y n-dodecil-β-D-maltósido (DM). Habitualmente, el detergente que actúa como agente de activación está presente por encima de su CMC.

Habitualmente, el glicerol está presente para potenciar la autoescisión, particularmente al 0-50%, más particularmente, al 20-50%.

Condiciones del ensayo de la proteasa NS3

Debe comprenderse que pueden emplearse una variedad de concentraciones para conseguir la escisión del sustrato de NS3 marcado en conjunción con el producto de NS3. En una realización, se utiliza un exceso molar de aproximadamente unas 1000 veces del cofactor NS4A en relación con el producto de la proteasa NS3. En otra realización, se puede utilizar un exceso molar de unas 100 veces. Se entiende que los expertos en la materia pueden determinar las concentraciones útiles en la presente invención.

Los detergentes adecuados para la utilización en este paso de la presente realización incluyen aquellos que, en presencia del cofactor NS4A y bajo las condiciones adecuadas, logran una actividad potenciada de la actividad proteasa de la proteasa NS3 frente a un sustrato de NS3 en relación a la actividad proteasa de una NS2/3 no escindida frente al mismo sustrato de NS3. En una realización, el detergente incluye óxido de laurildietilamina (LDAO) o n-dodecil-β-D-maltósido (DM) por encima de sus respectivas concentraciones micelares críticas. En una realización particular, el detergente es LDAO a una concentración de entre el 0,2% y el 2%; particularmente de entre el 0,5% y el 1%, específicamente de aproximadamente un 0,5%. De forma alternativa, el detergente es DM a una concentración de entre el 0,05% y el 2%, particularmente de entre el 0,2% y el 1%, específicamente de aproximadamente un 0,2%.

Cofactor NS4A

En una realización, el cofactor NS4A es el péptido que tiene la secuencia KKGSVVIVGRILSGRK [SEQ ID

N° 9], donde se han añadido residuos de lisina para conferir una solubilidad potenciada al cofactor NS4A.

Marcaje del sustrato de NS3

En una realización, el sustrato es un depsipéptido basado en el lugar de escisión de NS4A/4B. Más particularmente, en una realización adicional, el sustrato marcado es el sustrato depsipeptídico fluorogénico marcado internamente: Ac-DED(EDANS)EE-Abu-[C(O)-O]ASK(DABCIL)-NH₂ [Id. de Sec. N° 10].

Composición del tampón de la actividad de la proteasa NS3

Los rangos habituales para los componentes de la proteasa NS3 son: pH: 6-9; glicerol: 20%-50%; detergente: por

encima de su concentración micelar crítica; agente reductor: TCEP, ditioneitol (DTT) o β -mercaptoetanol.

Particularmente, la composición del tampón del ensayo es la siguiente: 50 mM de HEPES, pH 7,5, glicerol al 30%, LDAO al 0,5%, 1 mM de TCEP que contiene 4 μ M del sustrato fluorogénico Ac-DED(EDANS)EE-Abu[C(O)-O]ASK(DABCIL)-NH₂ y 10 μ M de NS4A_{péptido}.

Condiciones de reacción

Se entiende que el periodo de tiempo suficiente para permitir que el producto de NS3 catalice la escisión del sustrato marcado de NS3 variará en relación a las condiciones varias empleadas en el ensayo. En una realización, el tiempo es de aproximadamente 45 minutos.

Una vez se incubaba la mezcla de la reacción escindida con un sustrato de NS3 durante un periodo de tiempo suficiente, por ejemplo entre 0,25 y 3,0 horas, aunque este tiempo podría ser mayor, se puede determinar la cantidad de NS3 en la muestra en relación a la cantidad de subproducto marcado del sustrato de NS3 marcado que se genera. Esta determinación variará con la naturaleza del marcador del sustrato de NS3, como un experto en la materia apreciará, e involucra la utilización de métodos de detección convencionales.

Debe comprenderse en la presente realización y en varias de las otras realizaciones descritas y reivindicadas aquí que las condiciones generales, incluyendo los tampones utilizados, el pH de los tampones y las soluciones empleadas, las temperaturas utilizadas y los tiempos de reacción, incluirán las condiciones que no inhiben los diversos pasos deseados y serán fáciles de determinar por los expertos en la materia.

Las realizaciones de la invención se describen mediante referencia a los siguiente ejemplos específicos, que no pretenden ser limitantes:

EJEMPLOS

Abreviaciones

Abu: ácido aminobutírico;

BSA: albúmina de suero bovino;

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propansulfonato;

DABCIL: 4-{{4-(dimetilamino)fenil}azo}benzoil

DANSIL: 5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonilo;

DMSO: dimetilsulfóxido;

DM: n-dodecil- β -D-maltósido;

EDANS: 5-{{(2-aminetil)amino}-naftalen-1-sulfonilo};

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico;

LDAO: óxido de laurildietilamina;

TCEP: Clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina.

Materiales y métodos

Reactivos del ensayo

El BSA, el glicerol, el HEPES y el DMSO se adquirieron de Sigma-Aldrich. Los detergentes n-dodecil- β -D-maltósido (DM) y óxido de laurildietilamina (LDAO) se adquirieron de Anathrace Inc. y Fluka respectivamente. El TCEP se adquirió de Pierce, el Tween[®]20 de Bio-Rad y el cloruro de sodio de EM Science.

El péptido cofactor derivado de NS4A KKGSVVIVGRIILSGRK (Id. de Sec. N° 9) se sintetizó en la empresa mediante la utilización de metodología de fase sólida estándar (6). El sustrato fluorogénico depsipeptídico marcado internamente Ac-DED(EDANS)EE-Abu[C(O)-O]ASK(DABCIL)-NH₂ (Id. de Sec. N° 10) se diseñó en base al lugar de escisión de NS4A/4B y se sintetizó de acuerdo con el método previamente descrito (7).

Preparación de la proteasa NS2/3

La expresión, producción y purificación de la proteasa NS2/3 se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento previamente descrito (2). Hablando en términos prácticos, las alícuotas de la proteína NS2/3 inactiva y replegada pueden almacenarse congeladas a -80°C , y luego descongelarse y diluirse para inducir la autoescisión.

Preparación de la proteasa NS3

La expresión, producción y purificación del dominio proteasa NS3 se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento previamente descrito (8).

Ejemplo 1 – Autoescisión de la proteasa NS2/3

La activación de la proteasa NS2/3 replegada requiere la utilización de detergentes a concentraciones superiores a sus concentraciones micelares críticas, aunque algunos detergentes no promueven la autoescisión. Además, el efecto del detergente sobre la actividad de autoescisión de NS2/3 se potencia en presencia de glicerol (2). La dependencia de concentración de la reacción de autoescisión de la proteasa NS2/3 anteriormente descrita (4) se confirma mediante la utilización del análisis SDS-PAGE/Western blot. A concentraciones superiores a los 200 nM, no se observa dependencia de concentración (no se muestran los datos). El efecto del glicerol, del pH, y del DMSO sobre la autoescisión también se evalúa. Se observan cinéticas de escisión similares en un tampón que contiene glicerol al 20% o al 30% (no se muestran los datos). Finalmente, la autoescisión es óptima a pH 7,5 y el DMSO no tiene efecto sobre la actividad a concentraciones entre 0,5-5% (no se muestran los datos).

Consecuentemente, la reacción de autoescisión se inicia mediante la adición de 10 μL de la proteasa NS2/3 (Id. de Sec. N°4) a 800 nM en 50 mM de HEPES, pH 7,5, glicerol al 20% y 1 mM de TCEP en 30 μL de 50 mM de HEPES, pH 7,5, glicerol al 20%, n-dodecil- β -D-maltósido al 0,266%, 1 mM de TCEP, manteniendo el contenido final de DMSO al 5%. La mezcla de reacción se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente.

En los pocillos control negativos, la autoescisión se previno mediante la no adición de un agente de activación (es decir, DM en este caso).

Ejemplo 2 – Ensayo de la proteasa NS2/3 basado en la actividad proteasa NS3

Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de la actividad proteasa NS3 de la proteasa NS2/3 (Id. de Sec. N° 4) se comparan a los del dominio proteasa NS3 y se determinan con el sustrato fluorogénico Ac-DED(EDANS)EE-Abu[C(O)-O]ASK(DABCIL)-NH₂ (Id. de Sec. N° 10). La escisión del sustrato se monitoriza continuamente a temperatura ambiente en un fluorómetro BMG POLARstar Galaxy, equipado con filtros de excitación y emisión de 355 nm y 485 nm, respectivamente, en presencia de entre 0,5 y 8 μM de sustrato. La actividad proteasa NS3 de la proteasa NS2/3 (de 15 a 350 nM) y del dominio proteasa NS3 (de 1,5 a 800 nM) se evaluó con y sin un exceso molar de 1000 veces del NS4A_{péptido} en 50 mM de HEPES, pH 7,5, glicerol al 30%, DMSO al 5%, 1 mM de TCEP que contiene LDAO al 0, 0,5 o 1%. En presencia del NS4A_{péptido}, se introduce una preincubación de 15 min. para permitir la formación del complejo proteasa-cofactor.

Las eficiencias catalíticas de la proteasa NS3 y de la actividad proteasa NS3 de NS2/3 se pueden comparar en ausencia de detergente y del cofactor NS4A_{péptido}, tal y como se muestra en la tabla 1. La adición del detergente bipolar LDAO al tampón del ensayo es perjudicial para la actividad proteasa, con eficiencias catalíticas que disminuyen hasta 21 y 36 veces para la actividad proteasa NS3 de NS2/3 y para la proteasa NS3, respectivamente (tabla 1).

La actividad proteasa NS3 de ambas enzimas se puede comparar bajo la adición del cofactor NS4A ($6,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para NS2/3 y $7,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para NS3). Es interesante que la adición del detergente LDAO al tampón del ensayo que contiene el NS4A_{péptido} resulta en un incremento de la actividad de la proteasa NS3 (2,2 veces con LDAO al 0,5% y 3,2 veces con LDAO al 1%), pero tiene un efecto mínimo o inexistente sobre la actividad proteasa NS3 de NS2/3 (tabla 1 y figura 2). En conjunto, se observa una diferencia de unas 3 veces entre las actividades proteasa tras la adición de LDAO al tampón que contiene el NS4A_{péptido}. Esta diferencia en la actividad permite la discriminación de la actividad proteasa NS3 entre el precursor de la proteasa NS2/3 y el producto de la proteasa NS3. Consecuentemente, la autoescisión de NS2/3 se puede monitorizar sin separar el precursor del producto. Por lo tanto, el ensayo de la proteasa NS2/3 basado en la actividad proteasa NS3 se inicia con una dilución de unas 20 veces de la mezcla de la reacción de autoescisión en un tampón que contiene el sustrato, el NS4A_{péptido} y LDAO. La dilución también contribuye a la detención de la autoescisión mediante 1) la disminución de la concentración de la proteasa NS2/3, 2) la inhibición con el NS4A_{péptido} (9, 10) y 3) la adición de LDAO.

TABLA 1. Parámetros cinéticos de la actividad proteasa NS3 de la proteasa NS2/3 (Id. de Sec. N°4) y del dominio proteasa NS3 con y sin el detergente LDAO y el cofactor NS4A_{péptido}¹.

		Proteasa					
Condiciones		Proteasa NS2/3			Proteasa NS3		
LDAO (%)	NS4A	K _m (μM)	K _{cat} (min ⁻¹)	K _{cat} /K _m (10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	K _m (μM)	K _{cat} (min ⁻¹)	K _{cat} /K _m (10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)
0	-	0,45	0,54	2,00	1,24	0,72	0,97
0,5	-	2,73	0,25	0,15	5,95	0,15	0,042
1	-	3,85	0,22	0,095	5,39	0,087	0,027
0	+	0,57	2,30	6,73	2,42	11,3	7,78
0,5	+	1,47	7,34	8,32	0,58	6,02	17,3
1	+	1,43	6,56	7,65	0,75	11,1	24,7

¹Los parámetros cinéticos se determinan mediante la utilización del sustrato fluorogénico depsi-peptídico Ac-DED(EDANS)EE-Abu[C(O)-O]ASK(DABCIL)-NH₂. Los datos son medias de dos determinaciones diferentes.

5 Finalmente, las cinéticas de la autoescisión observadas mediante la utilización de este ensayo están en consonancia con las cinéticas determinadas mediante el análisis SDS-PAGE/Western blot (no se muestran los datos).

10 Por consiguiente, se añaden 5 μL de la mezcla de la reacción de autoescisión a 95 μL de 50 mM de HEPES, pH 7,5, glicerol al 30%, LDAO al 0,5%, 1 mM de TCEP que contiene 4 μM del sustrato fluorogénico Ac-DED(EDANS)EE-Abu[C(O)-O]ASK(DABCIL)-NH₂ y 10 μM de NS4A_{péptido}. Entonces, la mezcla del ensayo se incuba durante 45 minutos a temperatura ambiente. La fluorescencia se monitoriza utilizando el BMG POLARstar[®] Galaxy configurado a la ganancia apropiada con un filtro de excitación de 355 nm y un filtro de emisión de 485 nm. En la figura 1 se muestra una representación esquemática del ensayo.

15 Ejemplo 3 – Ensayo para el cribado de inhibidores

20 Este ensayo ilustra el tipo de formato que tal ensayo debe adoptar para los propósitos de cribaje de un gran número de inhibidores potenciales de la proteasa NS2/3 del VHC. Como resultará aparente a partir de esta descripción, deben ejecutarse los controles adecuados de forma paralela con tal de evaluar la actividad basal de la actividad proteasa NS3 de la proteína NS2/3 no escindida para poder sustraer tal actividad basal.

Descripción del ensayo

25 La proteasa NS2/3 Lys4-His6-[NS2/3 (904-1206)]-marcador strep-Lys4 [Id. de Sec. N° 4] es la que se utiliza en el ensayo [la producción, purificación y repliegamiento de la enzima se describen en (2)]. La reacción de autoescisión se lleva a cabo en un tampón que contienen n-dodecil-β-D-maltósido (DM) y glicerol (compuesto del ensayo) y se inicia mediante la adición de la proteasa NS2/3 seguida de una incubación durante 45 min. a temperatura ambiente. La evaluación de la autoescisión se basa en la monitorización de la actividad proteasa del producto de la proteasa NS3. Las condiciones son aquellas en las que la actividad proteasa NS3 de la proteasa NS2/3 es al menos 3 veces menor a la actividad del dominio proteasa NS3. Consecuentemente, el ensayo de la proteasa NS3 se inicia con una dilución de unas 20 veces de la mezcla de la reacción de autoescisión en un tampón que contiene el NS4A_{péptido} y el sustrato de la proteasa NS3. La dilución de la proteasa NS2/3, la adición del NS4A_{péptido} y la adición de LDAO al 1% detienen la autoescisión.

35 Por último, la autoescisión de la proteasa NS2/3 resulta en un incremento de la fluorescencia.

Protocolo

40 A) Reacción de autoescisión

En una placa de polipropileno de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon) se añaden:

- 45
- 30 μL del compuesto del ensayo (originalmente, en DMSO al 100% pero diluido en 50 mM de HEPES, pH 7,5, glicerol al 20%, DM al 0,266%, 1 mM de TCEP);
 - 10 μL de proteasa NS2/3 (800 nM en 50 mM de HEPES, pH 7,5, glicerol al 20%, 1 mM de TCEP para una

concentración final de 200 nM). El contenido final de DMSO se mantiene al 5%.

La placa se incuba durante 45 min. a temperatura ambiente.

5 En los pocillos control negativos, no se añade detergente activador (es decir, DM).

En los pocillos control positivos, no se añade el compuesto del ensayo (en su lugar, se añade una solución tampón/DMSO).

10 B) Actividad proteasa NS3

En una placa de microflúor blanco de 96 pocillos con fondo en U (Thermo Labsystems) se añaden:

15 • 95 µL de 50 mM de HEPES, pH 7,5, glicerol al 30%, LDAO al 0,5%, 1 mM de TCEP que contiene 4 µM del sustrato fluorogénico de la proteasa NS3 (Ac-DED(EDANS)EE-Abu[C(O)-O]ASK(DABCIL)-NH₂) [Id. de Sec. Nº 10] y 10 µM de NS4A_{péptido} (NH₂-KKGSVVIVGRILSGRK-COOH) [Id. de Sec. Nº 9]; y

• 5 µL de la mezcla de autoescisión del paso A.

20 Los pocillos se incuban durante 45 min. a temperatura ambiente.

El incremento de la fluorescencia del subproducto del sustrato de NS3 [Ac-DED(EDANS)EE-Abu-COOH] se monitoriza mediante la utilización de un BMG POLARstar Galaxy o un lector de placas TECAN GENios Pro configurado a la ganancia adecuada con un filtro de excitación de 355 nm y un filtro de emisión de 485 nm.

25 Los resultados de este experimento se presentan en la figura 3, donde puede verse que la ventana de señal de 2,2 es estable entre el control positivo (máxima actividad proteasa NS3 de la proteasa NS3 escindida) y el control negativo (actividad proteasa NS3 basal de la proteína NS2/3 no escindida) con un valor Z' de 0,55 [donde Z' es un parámetro estadístico definido en (15)].

30 La figura 4 muestra los resultados obtenidos con el mismo ensayo con el compuesto A del ensayo diluido a diferentes concentraciones. El porcentaje de inhibición se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$100 - [(f.u.^{inh} - f.u.^{-ctl}) / (f.u.^{+ctl} - f.u.^{-ctl})] \times 100$$

35 (f.u.: unidades de fluorescencia; inh: compuesto del ensayo; -ctl: control negativo; +ctl: control positivo)

Se aplica un ajuste de curva no lineal con el modelo de Hill a los datos de inhibición-concentración, y se calcula el 50% de la concentración efectiva (IC₅₀) mediante la utilización del programa SAS (Statistical Software System; SAS Institute, Inc., Cary, N.C.).

40 Se obtiene un IC₅₀ de aproximadamente 55 µM para el compuesto A.

45 Desde luego, y como reconocerán los expertos en la materia, se debe llevar a cabo un contraensayo adecuado para asegurar que los resultados positivos no son "falsos positivos" causados por un inhibidor de la proteasa NS3. Para eliminar tales compuestos del ensayo que aportan "falsos positivos", se configuran "placas oscuras" como en el paso B (actividad proteasa NS3) del ensayo de NS2/3, pero la proteasa NS2/3 se reemplaza por la proteasa NS3.

50 De manera alternativa, cada compuesto positivo se contrarriba posteriormente en un ensayo de la proteasa NS3 adecuado, tal y como se conoce en la materia (14).

55 En conclusión, en el ensayo de la proteasa NS2/3 basado en la actividad proteasa NS3 presentado aquí, la actividad proteasa del producto de NS3 se mide directamente después de la dilución de la mezcla de la autoescisión en un tampón que contiene el sustrato, el cofactor NS4A_{péptido} y el detergente LDAO o DM, que permite la discriminación de la actividad proteasa NS3 del precursor de la proteasa NS2/3 y del producto de la proteasa NS3. Consecuentemente, no se requiere el paso de separación.

Referencias

60 (1) Kolykhalov, A.A., Mihalik, K., Feinstone, S.M. y C.M. Rice. (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3'-nontranslated region are esencial for virus replication in vivo. J. Virol. 74:2046-2051.

(2) Thibeault, D., Maurice, R., Pilote, L., Lamarre, D. y Pause, A. (2001) In vitro caracterización of a purified

NS2/3 protease variant of hepatitis C virus. J. Biol. Chem. 276 (49): 46678-46684.

(3) Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd. Patente de EE.UU 6.815.159 (9 de noviembre de 2004) Purified active HCV NS2/3 protease.

(4) Pallaoro, M., Lahm, A., Biasiol, G., Brunetti, M., Nardella, C., Orsatti, L., Bonelli, F., Orrù, S., Narjes, F. y Steinkühler, C. (2001) Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. J. Virol. 75: 9939-9946.

(5) Istituto di ricerche di biologia molecolare P. Angeletti, Italia. Solicitud de patente WO 01/68818 A2 (prioridad del 17 de marzo del 2000), HCV NS2/3 fragments and uses thereof.

(6) Bodansky, M. (1993) Peptide Chemistry, 2ª edición, Springer-Verlag, Berlín.

(7) Bianchi, E., Steinkühler, C., Taliani, M., Urbani, A., De Francesco, R., y A. Pessi. (1996) Synthetic depsipeptide substrates for the assay of human hepatitis C virus protease. Analyt. Biochem. 237: 239-244.

(8) LaPlante, S.R., Cameron, D.R., Aubry, N., Lefebvre, S., Kukolj, G., Maurice, R., Thibeault, D., Lamarre, D., y Llinas-Brunet, M. (1999) Solution structure of substrate-based ligands when bound to hepatitis C virus NS3 protease domain. J. Biol. Chem. 274 (26), 18618-18624.

(9) Darke, P.L., Jacobs, A.R., Waxman, L., y L.C. Kuo (1999) Inhibition of hepatitis C virus NS2/3 processing by NS4A peptides. J. Biol. Chem. 274: 34511-34514.

(10) Merck & Co., Solicitud de patente WO 02/16379 A1 (prioridad del 30 de agosto de 1999), Hepatitis C virus replication inhibitors.

(11) Lin, C., Thomson, J. A. y C.M. Rice. 1995. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex *in vivo* and *in vitro*. J. Virol. 69: 4373-4380.

(12) Urbani, A., Biasiol, G., Brunetti, M., Volpari, C., Di Marco, S., Sollazzo, M., Orrù, S., Dal Piaz, F., Casbarra, A., Pucci, P., Nardi, C., Gallinari, P., De Francesco, R., y Steinkühler, C. (1999) Multiple determinants influence complex formation of the hepatitis C virus NS3 protease domain with its NS4A cofactor peptide. Biochemistry 38 (16): 5206-5215.

(13) Waugh, D.S. 2005; Making the most of affinity tags; Trends Biotechnology 23: 316-320.

(14) Steinkühler C., Urbani A., Tomei L., Biasiol G., Mohinder S., Bianchi E., Pessi A., DeFrancesco R. (1996) Activity of Purified Hepatitis C Virus Protease NS3 on Peptide Substrates, J. Virol. 70(10): 6694-6700.

(15) Zhang J.-H., Chung, T.D.Y., Oldenburg K.R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening, J. of Biomol. Screening 4(2): 67-73.

Listado de secuencias

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

Boehringer Ingelheim Pharma KG GmbH

<120> Ensayo de la actividad NS2/3 del virus de la hepatitis C

<130> 13-137 WO

<150> 60/730,999 <151> 2006-10-28

<160> 10

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

5 <210> 1

<211> 1191

<212> DNA

10

<213> VHC

<220>

15

<221> CDS

<222> (1)...(1191)

<223> Secuencia de nucleótidos de NS2/3

20

<400> 1

atg gac cgg gag atg gct gca tcg tgc gga ggc gcg gtt ttc ata ggt	48
Met Asp Arg Glu Met Ala Ala Ser Cys Gly Gly Ala Val Phe Ile Gly	
1 5 10 15	
ctt gca ctc ttg acc ttg tca cca tac tat aaa gtg ctc ctc gct agg	96
Leu Ala Leu Leu Thr Leu Ser Pro Tyr Tyr Lys Val Leu Leu Ala Arg	
20 25 30	
ctc ata tgg tgg tta cag tat tta atc acc aga gtc gag gcg cac ttg	144
Leu Ile Trp Trp Leu Gln Tyr Leu Ile Thr Arg Val Glu Ala His Leu	
35 40 45	
caa gtg tgg atc ccc cct ctc aat gtt cgg gga ggc cgc gat gcc atc	192
Gln Val Trp Ile Pro Pro Leu Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Ile	
50 55 60	
atc ctc ctc acg tgc gca gtc cac cca gag cta atc ttt gac atc acc	240
Ile Leu Leu Thr Cys Ala Val His Pro Glu Leu Ile Phe Asp Ile Thr	
65 70 75 80	
aaa ctc ctg ctc gcc ata ttc ggt ccg ctc atg gtg ctc cag gca ggc	288
Lys Leu Leu Leu Ala Ile Phe Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly	
85 90 95	

ata acc aaa gtg ccg tac ttc gtg cgt gcg cag ggg ctc att cgt gcg	336
Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Ala	
100 105 110	
tgt atg ttg gtg ccg aag gct gcg ggg ggt cat tat gtc caa atg gcc	384
Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala	
115 120 125	
ttc atg aag cta gct gcg ctg aca ggt acg tac gtt tat gac cat ctc	432
Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu	
130 135 140	
act cca ttg cag gat tgg gcc cac gcg ggc cta cga gac ctt gca gtg	480
Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val	
145 150 155 160	
gcg gta gag ccc gtc atc ttc tct gac atg gag gtc aag atc atc acc	528
Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile Ile Thr	
165 170 175	
tgg ggg gcg gac acc gcg gca tgc ggg gac atc att tca ggt ctg ccc	576
Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro	
180 185 190	
gtc tcc gct cga agg gga agg gag ata ctc ctg gga ccg gcc gat aat	624
Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Asn	
195 200 205	
ttt gaa ggg cag ggg tgg cga ctc ctt gcg ccc atc acg gcc tac tcc	672
Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser	
210 215 220	
caa cag aca ccg ggc cta ctt ggt tgc atc atc acc agc ctc aca ggc	720
Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly	
225 230 235 240	
ccg gac aag aac cag gtc gag ggg gag gtt caa gtg gtc tcc acc gct	768
Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala	
245 250 255	
aca caa tct ttc ctg gcg acc tgc gtc aac ggc gtg tgt tgg act gtc	816
Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val	
260 265 270	
ttc cat ggc gcc ggc tca aag acc ttg gcc ggc ccc aaa ggc cca atc	864
Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile	
275 280 285	
acc cag atg tac act aat gtg gac cag gac ctc gtc ggc tgg cag gcg	912
Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala	
290 295 300	
ccc cct ggg gcg cgc tcc atg aca cca tgc acc tgc ggc agc tcg gac	960
Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp	
305 310 315 320	
ctc tat ttg gtc acg aga cat gcc gac gtc att ccg gtg cgc cgg cgg	
1008	
Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg	
325 330 335	

ES 2 386 462 T3

```

          355                      360                      365
ggc atc ttc cgg gct gct gtg tgc acc cgg ggg gtt gca aaa gcg gtg
1152
Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val
    370                      375                      380

gac ttc ata cct gtt gag tct atg gaa act acc atg cgg
1191
Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg
385                      390                      395

ggc gac agt agg ggg agc ctg ctc tcc ccc agg cct gtc tcc tac ttg
1056
Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu
    340                      345                      350

aag ggc tct tcg ggt ggc cca ctg ctc tgc cct tcg ggg cac gtt gtg
1104
Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Val Val

```

<210> 2

5 <211> 300

<212> PRT

<213> VHC

10

<400> 2


```

Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Ala Cys
 1          5          10          15
Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Phe
          20          25          30
Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr
          35          40          45
Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala
          50          55          60
Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile Ile Thr Trp
65          70          75          80
Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro Val
          85          90          95
Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Asn Phe
          100          105          110
Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln
          115          120          125
Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg
          130          135          140
Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr
145          150          155          160
Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Phe
          165          170          175
His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr
          180          185          190
Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala Pro
          195          200          205
Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu
210          215          220

```

```

Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly
225          230          235          240
Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys
          245          250          255
Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Val Val Gly
          260          265          270
Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp
          275          280          285
Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg
290          295          300

```

5 <210> 3

<211> 303

<212> PRT

10

<213> VHC

<400> 3

Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	Val	Pro	Tyr	Phe	Val	Arg	Ala	Gln	Gly	Leu	Ile
1				5					10					15	
Arg	Ala	Cys	Met	Leu	Val	Arg	Lys	Ala	Ala	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Gln
		20						25					30		
Met	Ala	Phe	Met	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Val	Tyr	Asp
		35					40					45			
His	Leu	Thr	Pro	Leu	Gln	Asp	Trp	Ala	His	Ala	Gly	Leu	Arg	Asp	Leu
	50					55					60				
Ala	Val	Ala	Val	Glu	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	Asp	Met	Glu	Val	Lys	Ile
65					70					75					80
Ile	Thr	Trp	Gly	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Cys	Gly	Asp	Ile	Ile	Ser	Gly
			85						90					95	
Leu	Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	Ala
		100					105						110		
Asp	Asn	Phe	Glu	Gly	Gln	Gly	Trp	Arg	Leu	Leu	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala
	115						120					125			
Tyr	Ser	Gln	Gln	Thr	Arg	Gly	Leu	Leu	Gly	Cys	Ile	Ile	Thr	Ser	Leu
	130					135					140				
Thr	Gly	Arg	Asp	Lys	Asn	Gln	Val	Glu	Gly	Glu	Val	Gln	Val	Val	Ser
145				150						155					160
Thr	Ala	Thr	Gln	Ser	Phe	Leu	Ala	Thr	Cys	Val	Asn	Gly	Val	Cys	Trp
			165						170					175	
Thr	Val	Phe	His	Gly	Ala	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly
		180						185					190		
Pro	Ile	Thr	Gln	Met	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp	Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp
		195					200					205			
Gln	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Arg	Ser	Met	Thr	Pro	Cys	Thr	Cys	Gly	Ser
	210					215					220				
Ser	Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Thr	Arg	His	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Val	Arg
225					230					235					240
Arg	Arg	Gly	Asp	Ser	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Pro	Val	Ser
			245					250						255	
Tyr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Leu	Cys	Pro	Ser	Gly	His
		260					265						270		
Val	Val	Gly	Ile	Phe	Arg	Ala	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Gly	Val	Ala	Lys
		275				280						285			
Ala	Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Ser	Met	Glu	Thr	Thr	Met	Arg	
	290					295					300				

<210> 4

5 <211> 334

<212> PRT

<213> VHC

10 <400> 4

Met	Lys	Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	Thr	Ser	Ala
1				5					10					15	
Gly	Ile	Thr	Lys	Val	Pro	Tyr	Phe	Val	Arg	Ala	Gln	Gly	Leu	Ile	Arg
			20					25					30		
Ala	Cys	Met	Leu	Val	Arg	Lys	Ala	Ala	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Gln	Met
		35					40					45			
Ala	Phe	Met	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Val	Tyr	Asp	His
	50					55					60				
Leu	Thr	Pro	Leu	Gln	Asp	Trp	Ala	His	Ala	Gly	Leu	Arg	Asp	Leu	Ala
65					70					75					80
Val	Ala	Val	Glu	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	Asp	Met	Glu	Val	Lys	Ile	Ile
			85						90					95	
Thr	Trp	Gly	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Cys	Gly	Asp	Ile	Ile	Ser	Gly	Leu
			100					105					110		
Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	Ala	Asp
		115					120					125			
Asn	Phe	Glu	Gly	Gln	Gly	Trp	Arg	Leu	Leu	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala	Tyr
	130					135					140				
Ser	Gln	Gln	Thr	Arg	Gly	Leu	Leu	Gly	Cys	Ile	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr
145					150					155					160
Gly	Arg	Asp	Lys	Asn	Gln	Val	Glu	Gly	Glu	Val	Gln	Val	Val	Ser	Thr
				165					170					175	
Ala	Thr	Gln	Ser	Phe	Leu	Ala	Thr	Cys	Val	Asn	Gly	Val	Cys	Trp	Thr
			180					185					190		
Val	Phe	His	Gly	Ala	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	Pro
		195					200					205			
Ile	Thr	Gln	Met	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp	Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp	Gln
	210					215					220				
Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Arg	Ser	Met	Thr	Pro	Cys	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser
225					230					235					240
Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Thr	Arg	His	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Val	Arg	Arg
				245					250					255	
Arg	Gly	Asp	Ser	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Pro	Val	Ser	Tyr
			260					265					270		
Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Leu	Cys	Pro	Ser	Gly	His	Val
		275					280					285			
Val	Gly	Ile	Phe	Arg	Ala	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Gly	Val	Ala	Lys	Ala
	290					295					300				
Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Ser	Met	Glu	Thr	Thr	Met	Arg	Thr	Ser
305					310					315					320
Ser	Ala	Trp	Arg	His	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Lys	Lys	Lys	Lys		
				325					330						

<210> 5

5 <211> 7

<212> PRT

<213> VHC

10

<220>

<221> VARIANTE

15

<222> (1)...(1)

<223> Xaa en la posición 1 puede ser Asp o Glu

5 <221> VARIANTE
 <222> (2) ... (2)
 <223> Xaa en la posición 2 puede ser cualquier aminoácido
 <221> VARIANTE
 10 <222> (3) ... (3)
 <223> Xaa en la posición 3 puede ser cualquier aminoácido
 <221> VARIANTE
 15 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa en la posición 4 puede ser cualquier aminoácido
 20 <221> VARIANTE
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa en la posición 5 puede ser cualquier aminoácido
 25 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 30 <223> Xaa en la posición 7 puede ser Ala o Ser
 <400> 5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5

35 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> VHC
 <400> 6

Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser His
 1 5

45 <210> 7
 <211> 12
 50 <212> PRT
 <213> VHC
 <400> 7
 55

Asp Asp Ile Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp
1 5 10

<210> 8

5 <211> 14

<212> PRT

<213> VHC

10 <400> 8

Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg
1 5 10

<210> 9

15 <211> 17

<212> PRT

<213> VHC

20 <400> 9

Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg
1 5 10 15
Lys

25 <210> 10

<210> 10

<211> 9

30 <212> PRT

<213> VHC

35 <220>

<221> VARIANTE

<222> (1)...(1)

40 <223> Asp en la posición 1 está marcada con acetilo

<221> VARIANTE

<222> (3)...(3)

<223> Asp en la posición 3 está marcada con EDANS

<221> VARIANTE

50 <222> (6)...(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Aou[C(O)-O]

55 <221> VARIANTE

<222> (9)...(9)

<223> Lys en la posición 9 está marcada con DABCIL

5

<400> 10

Asp Glu Asp Glu Glu Xaa Ala Ser Lys
1 5

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de la actividad de autoescisión de NS2/3 en una muestra que contiene la proteasa NS2/3 sin la necesidad de una separación física entre la proteasa NS3 y la proteasa NS2/3, y el método incluye los pasos de:
 - a) someter la muestra a unas condiciones bajo las cuales al menos una porción de la proteasa NS2/3 se autoescinde para producir un producto de la proteasa NS3;
 - b) incubar la muestra que contiene el producto de la proteasa NS3 generado en el paso a) con una cantidad adecuada de un cofactor NS4A en presencia de un detergente que es óxido de laurildietilamina (LDAO) o n-dodecil-β-D-maltósido (DM) y un sustrato de NS3 apropiado, bajo unas condiciones suficientes para permitir que el producto de la proteasa NS3 catalice la escisión del sustrato de NS3 para producir un subproducto del sustrato NS3; y
 - c) detectar el subproducto del sustrato de NS3 generado en el paso b), donde la detección del subproducto del sustrato de NS3 indica la actividad de autoescisión de NS2/3 en una muestra.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde se utiliza LDAO a una concentración de entre el 0,2% y el 2% o donde se utiliza DM a una concentración de entre el 0,05% y el 2%.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteasa NS2/3 incluye una proteasa NS2/3 que se corresponde con la Id. de Sec. Nº 1 (aminoácidos entre 810 y 1206 de GenBank, número de acceso AAB67036).
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicha proteasa NS2/3 incluye un fragmento que se corresponde con la Id. de Sec. Nº 2.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicha proteasa NS2/3 incluye un fragmento que se corresponde con la Id. de Sec. Nº 3.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicha proteasa NS2/3 además incluye un marcador de afinidad o un marcador detectable.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha proteasa NS2/3 es tal y como se define en la Id. de Sec. Nº 4.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho cofactor NS4A consiste esencialmente en un péptido que tiene la secuencia GSWIVGRILSGR tal y como se define en la Id. de Sec. Nº 8.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho cofactor NS4A presenta la secuencia KKGSVVIVGRILSGRK tal y como se define en la Id. de Sec. Nº 9.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho cofactor NS4A se utiliza a un exceso molar de unas 1000 veces en relación con el producto de la proteasa NS3.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho sustrato de NS3 está basado en una secuencia consenso que incluye la secuencia (D o E)X)CXXC(A o S) donde X es cualquier aminoácido.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho sustrato de NS3 incluye un depsipéptido seleccionado de un grupo que consiste en: DEMEEC-ASH [Id. de Sec. Nº 6] y DDIVCC-SMSYTW [Id. de Sec. Nº 7].
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho sustrato de NS3 consiste esencialmente en: Ac-DED(EDANS)EE-Abu-[C(O)-O]ASK(DABCIL)-NH₂ tal y como se define en la Id. de Sec. Nº 10.
14. Un ensayo para el cribaje de un compuesto candidato para la actividad inhibitoria de la autoescisión de NS2/3 en una muestra que contiene la proteasa NS2/3, y el ensayo incluye:
 - a) someter una primera muestra que contiene la proteasa NS2/3 a unas condiciones bajo las cuales al menos una porción de la proteasa NS2/3 se autoescinde para producir un producto de la proteasa NS3;
 - b) someter una segunda muestra que contiene la proteasa NS2/3, en presencia de un compuesto candidato, a

las mismas condiciones que en el paso a);

c) incubar cada una de las muestras primera y segunda con una cantidad suficiente de un cofactor NS4A en presencia de un detergente que es óxido de laurildietilamina (LDAO) o n-dodecil-β-D-maltósido (DM) y un sustrato de NS3 apropiado durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el producto de la proteasa NS3 catalice la escisión del sustrato de NS3, para producir consecuentemente un subproducto del sustrato NS3;

d) determinar la cantidad del subproducto del sustrato de NS3 generado en cada una de las muestras primera y segunda, donde la disminución en la cantidad del subproducto del sustrato NS3 generado en la segunda muestra en comparación con la cantidad de subproducto del sustrato NS3 generado en la primera muestra indica que el compuesto candidato puede ser un inhibidor de la actividad de autoescisión de NS2/3.

15. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 14, donde se utiliza LDAO a una concentración de entre el 0,2% y el 2% o donde se utiliza DM a una concentración de entre el 0,05% y el 2%.

16. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicha proteasa NS2/3 incluye una proteasa NS2/3 que corresponde con la Id. de Sec. Nº 1 (aminoácidos entre 810 y 1206 de GenBank, número de acceso AAB67036).

17. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicha proteasa NS2/3 incluye un fragmento que se corresponde con la Id. de Sec. Nº2.

18. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicha proteasa NS2/3 incluye un fragmento que se corresponde con la Id. de Sec. Nº3.

19. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicha proteasa NS2/3 incluye además un marcador de afinidad o un marcador detectable.

20. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 19, donde dicha proteasa NS2/3 es tal y como se define en la Id. de Sec. Nº 4.

21. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho cofactor NS4A consiste esencialmente en un péptido que tiene la secuencia GSWIVGRILSGR tal y como se define en la Id. de Sec. Nº 8.

22. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 21, donde dicho cofactor NS4A tiene la secuencia KKGSVVIVGRILSGRK tal y como se define en la Id. de Sec. Nº 9.

23. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 21, donde dicho cofactor NS4A se utiliza a un exceso molar de unas 1000 veces en relación con el producto de la proteasa NS3.

24. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho sustrato de NS3 está basado en una secuencia consenso que incluye la secuencia (D o E)X)CXXC(A o S) donde X es cualquier aminoácido.

25. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 24, donde dicho sustrato de NS3 incluye un depsipéptido seleccionado de un grupo que consiste en: DEMEEC-ASH [Id. de Sec. Nº 6] y DDIVCC-SMSYTW [Id. de Sec. Nº 7].

26. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 24, donde dicho sustrato de NS3 consiste esencialmente en: Ac-DED(EDANS)EE-Abu-[C(O)-O]ASK(DABCIL)-NH₂ tal y como se define en la Id. de Sec. Nº 10.

FIGURA 1

Ensayo de la proteasa NS2/3 basado en la actividad proteasa NS3

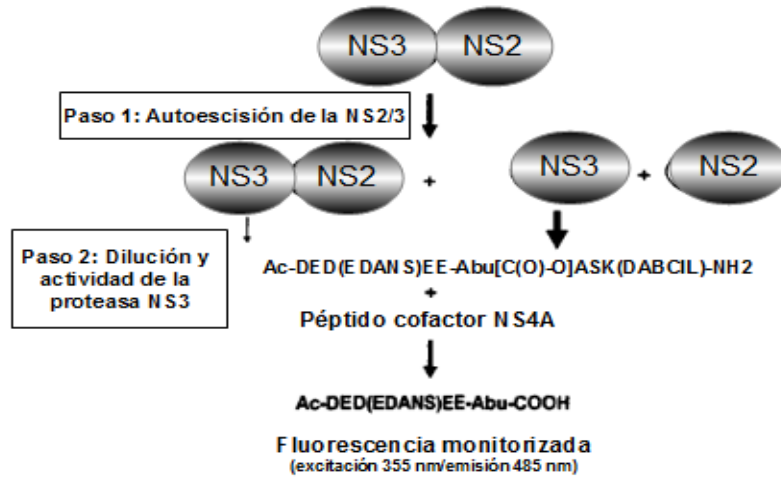


FIGURA 2

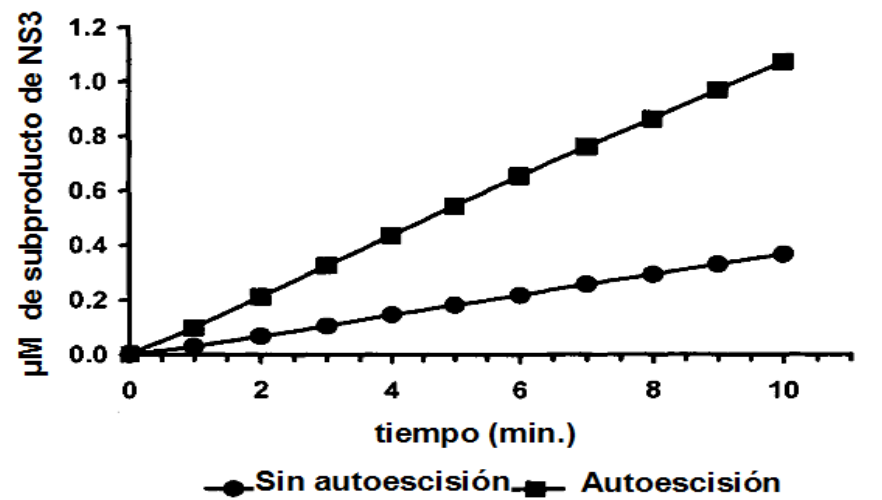
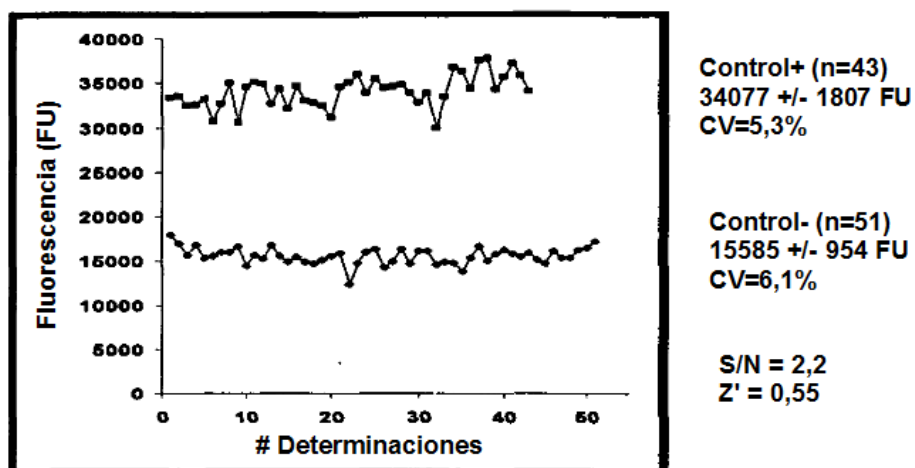


FIGURA 3

Ensayo de la proteasa NS2/3 basado en la determinación Z' de la actividad de la proteasa NS3



Ensayo de la proteasa NS2/3 basado en la curva CI_{50} de la actividad proteasa NS3

Ensayo de la actividad de la proteasa NS2/3 del VHC para el compuesto A

$$CI_{50}: Fit(\mu M) = 55,1246 \pm 3,0398$$

$$I_{max} (\%) = 109,2 \pm 5,82$$

$$N = 3,167 \pm 0,42 \quad R^2 = 0,99542$$

