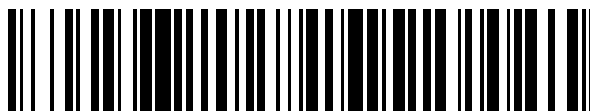


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 150**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2011 PCT/US2011/040920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11160043**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11796527 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2583099**

54 Título: **PLA2G16 como diana para compuestos antivirales**

30 Prioridad:

18.06.2010 US 356426 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.05.2017

73 Titular/es:

**THE WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL
RESEARCH (100.0%)
Nine Cambridge Center
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**BRUMMELKAMP, THIJN, R. y
CARETTE, JAN, E.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 611 150 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

PLA2G16 como diana para compuestos antivirales

5 **Antecedentes de la invención**

Los virus son causas importantes de enfermedad y muerte en todo el mundo. Aunque las vacunas y las medidas de salud pública han reducido enormemente la frecuencia de ciertas infecciones virales, tales enfoques han sido menos satisfactorios en enfrentarse a muchos virus de importancia médica y/o veterinaria significativa. Incluso si existiera una vacuna generalmente protectora, es exigente lograr la vacunación de todos los individuos. Además, pueden surgir obstáculos para una inmunización eficaz debido a factores tales como senescencia inmunitaria y tratamiento con medicaciones inmunosupresoras. Se han desarrollado terapias farmacológicas contra algunos virus, siendo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) un ejemplo notable. Sin embargo, todavía hay relativamente pocas enfermedades virales para las que están disponibles fármacos eficaces. Existe la necesidad de nuevos compuestos antivirales y de nuevos enfoques para identificar tales compuestos.

Sumario de la invención

La invención se refiere al menos en parte a la identificación de una diana para el descubrimiento de fármacos antivirales. En un aspecto, la divulgación proporciona un método de inhibición de infección viral de una célula que comprende poner en contacto la célula con un inhibidor de PLA2G16. En algunas realizaciones, el virus es un picornavirus. En algunas realizaciones, la célula es una célula de vertebrado. En algunas realizaciones, la célula de vertebrado es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 inhibe la expresión de PLA2G16. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 inhibe la actividad enzimática de PLA2G16.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de una infección viral en un sujeto, comprendiendo el método administrar un inhibidor de PLA2G16 a un sujeto en necesidad de tratamiento para una infección viral. En algunas realizaciones, la infección viral es una infección por picornavirus. En algunas realizaciones, el sujeto es un vertebrado. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 inhibe la expresión de PLA2G16. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 inhibe la actividad enzimática de PLA2G16.

En otro aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* de identificación de un compuesto antiviral candidato útil para inhibir la infección viral por un picornavirus que comprende las etapas de: (a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido PLA2G16 y un compuesto de ensayo; (b) determinar si el compuesto de ensayo inhibe el polipéptido PLA2G16, en el que si el compuesto inhibe el polipéptido PLA2G16, el compuesto se identifica como un compuesto antiviral candidato. En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende determinar si el compuesto de ensayo inhibe la expresión del polipéptido PLA2G16. En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende determinar si el compuesto de ensayo inhibe una actividad enzimática del polipéptido PLA2G16. En algunas realizaciones, la actividad enzimática es actividad de fosfolipasa A2. En algunas realizaciones, la composición de la etapa (a) es una composición acelular que comprende PLA2G16 purificado; y la etapa (b) comprende determinar si el compuesto de ensayo inhibe la actividad enzimática de PLA2G16. En algunas realizaciones, la composición de la etapa (a) comprende una célula que expresa un polipéptido PLA2G16, y en la que la etapa (b) comprende determinar si el compuesto de ensayo inhibe la expresión o actividad enzimática de PLA2G16. Si los compuestos inhiben el polipéptido PLA2G16, el compuesto se identifica como un compuesto antiviral candidato útil para inhibir la infección viral por un picornavirus. En algunas realizaciones, el método comprende además evaluar la capacidad del compuesto para inhibir la infección viral de una célula o sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de poner en contacto una célula con el compuesto y un virus, en el que la célula sería susceptible al virus en ausencia del compuesto. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de administrar el compuesto a un sujeto, en el que el sujeto sería susceptible a infección por el virus en ausencia del compuesto. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de poner en contacto una célula que está infectada por el virus con el compuesto.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de validación *in vitro* de un compuesto antiviral candidato que comprende las etapas de: (a) proporcionar un compuesto antiviral candidato identificado según un método que comprende identificar o seleccionar un compuesto que inhibe PLA2G16; y (b) determinar si el compuesto inhibe la infección de una célula u organismo por un virus, en el que si el compuesto inhibe la infección de una célula u organismo por el virus, el compuesto está validado como un compuesto antiviral. El virus es un picornavirus.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende: (a) un inhibidor de PLA2G16; (b) un virus; y (c) una población de células. En algunas realizaciones, el virus está presente a una multiplicidad de infección (MOI, *Multiplicity of Infection*) de al menos 0,01. En algunas realizaciones, el virus es un picornavirus. En algunas realizaciones, las células están en cultivo. En algunas realizaciones, las células son células de vertebrado. En algunas realizaciones, las células son células de mamífero, por ejemplo, células humanas. En algunas realizaciones, la población de células comprende al menos 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 o más células. En algunas realizaciones, las

células son células humanas. En algunas realizaciones, al menos algunas de las células están infectadas por el virus. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 se une a PLA2G16. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 inhibe la expresión de PLA2G16. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 inhibe una actividad enzimática de PLA2G16. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 está presente en una cantidad suficiente para inhibir detectablemente la infección de las células por el virus.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende un inhibidor de PLA2G16, en la que la composición es útil para tratar una infección viral en un sujeto. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 se une a PLA2G16. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 inhibe la expresión de PLA2G16. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 inhibe una actividad enzimática de PLA2G16. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, la infección viral es una infección por picornavirus. En algunas realizaciones, el sujeto es un vertebrado. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula de mamífero casi haploide no humana que tiene una mutación en un gen que codifica PLA2G16. En algunas realizaciones, la célula expresa una forma mutante de PLA2G16. En algunas realizaciones, la célula expresa una forma mutante de PLA2G16, en la que la forma mutante tiene actividad catalítica reducida en comparación con la forma no mutante.

En otro aspecto, la invención como se define en las reivindicaciones, proporciona un método de identificación de un organismo pluricelular no humano, por ejemplo, un animal vertebrado, que tiene elevada resistencia a infección viral, comprendiendo el método identificar un organismo pluricelular que tiene PLA2G16 funcional reducido o ausente. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de identificación de un organismo pluricelular no humano con elevada resistencia a infección por un virus, comprendiendo el método determinar si el organismo tiene expresión o actividad de PLA2G16 reducida, en el que si el organismo tiene expresión o actividad de PLA2G16 reducida, el organismo tiene elevada resistencia a infección por un virus. En algunas realizaciones, el método comprende además proporcionar o usar un organismo pluricelular no humano genéticamente modificado con PLA2G16 reducido o ausente en agricultura y/o ganadería. En algunas realizaciones, un animal resistente a virus es de una especie no domesticada. Opcionalmente, la especie está en peligro de extinción. En algunas realizaciones, el organismo es un animal vertebrado importante desde el punto de vista comercial. El virus es un picornavirus.

En otro aspecto, la invención proporciona un animal de granja que tiene PLA2G16 funcional reducida o ausente, en el que el animal tiene elevada resistencia a infección por un picornavirus. El animal está genéticamente modificado.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, el picornavirus es un enterovirus (miembro del género *Enterovirus*). En ciertas realizaciones, el enterovirus es un enterovirus humano, por ejemplo, un virus clasificado dentro de las especies *Enterovirus humano A*, *Enterovirus humano B*, *Enterovirus humano C*, *Enterovirus humano D*, *Rinovirus humano A*, *Rinovirus humano B* o *Rinovirus humano C*. En algunas realizaciones, el enterovirus humano es el virus de la poliomielitis 1, 2 o 3 o cualquiera de los enterovirus humanos 68-107, por ejemplo, EV-71. En ciertas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, el picornavirus es un hepatovirus, por ejemplo, virus de la hepatitis A humana. En ciertas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, el picornavirus es un virus de Coxsackie. En ciertas realizaciones, el virus de Coxsackie es un virus de Coxsackie humano, por ejemplo, cualquier virus de Coxsackie A1-A22, A24, o B1-B5. En ciertas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, el picornavirus es un rinovirus (miembro de las especies *Rinovirus humano A*, *Rinovirus humano B* o *Rinovirus humano C*), por ejemplo, cualquiera de los rinovirus humanos 1-100. En ciertas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, el picornavirus es un ecovirus. En ciertas realizaciones de cualquiera de los diversos aspectos de la invención, el virus es un virus de la glosopeda, por ejemplo, uno de los siete serotipos del virus de la glosopeda: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1.

La práctica de la presente invención normalmente empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, tecnología de ácidos nucleicos recombinantes (por ejemplo, ADN), inmunología e interferencia por ARN (iARN) que están dentro de la experiencia de la materia. Descripciones no limitantes de ciertas de estas técnicas se encuentran en las siguientes publicaciones: Ausubel, F., et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols in Immunology*, *Current Protocols in Protein Science* y *Current Protocols in Cell Biology*, todos de John Wiley & Sons, N.Y., edición de diciembre de 2008; Sambrook, Russell and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988; Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique", 5ª ed., John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2005. Información no limitante referente a los virus se encuentra en, por ejemplo, Knipe, DM and Howley, PM (eds.) *Fields Virology*, Volúmenes I y II. 5ª ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2007; Büchen-Osmond, C. (Ed), (2006) *Index to ICTVdB virus descriptions*. En: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, versión 4. *ICTVdB Management*, Mailman School of Public Health, Columbia University, New York, NY, USA; y "ICTVdB - The Universal Virus Database", versión 4 de abril de 2006. <http://www.ictvdb.org/Ictv/ICTVindex.htm> e *ICTVdb Virus Descriptions* (<http://www.ictvdb.org/ICTVdB/index.htm>). (Se indica que la base de datos en línea está siendo actualmente reescrita). El informe más reciente del Comité

Internacional sobre la Taxonomía de virus (ICTV) de la Unión Internacional de Sociedades microbiológicas: "Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", 2005, C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball (Eds), Elsevier Academic Press, se considera la referencia estándar y definitiva para la taxonomía de los virus (clasificación y nomenclatura), ya que se complementa por propuestas taxonómicas posteriormente autorizadas por el ICTV (disponibles como actualizaciones en la página web del ICTV como http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/default.aspx) (véase también Carstens, EB and Ball, L. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology, Volumen 154, Número 7, 2008, y Carstens, E. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009) Archives of Virology, Volumen 155, Número 1, 2009). The Virus Taxonomy: 2009 Release v4 (20 de marzo de 2010) (disponible en la página web del ICTV en <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>) representa la taxonomía más reciente.

Información no limitante referente a agentes terapéuticos y a enfermedades humanas se encuentra en Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11ª Ed., McGraw Hill, 2005, Katzung, B. (ed.) Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange; 10ª ed. (2006) o 11ª edición (julio de 2009). En el presente documento se utilizan significados de términos estándar aceptados en la técnica, a menos que se indique lo contrario. En el presente documento se utilizan abreviaturas estándar para diversos términos.

20 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. A. Plan esquemático de la integración del vector de trampa génica en un gen endógeno. B. Visión general esquemática del cribado genético haploide para genes críticos para la replicación del virus de la poliomielitis.

25 Figura 2. El cribado genético haploide identifica PLA2G16 como crítico para la infección por el virus de la poliomielitis. Se pusieron en contacto células haploides mutagenizadas con el virus de la poliomielitis y se dejaron crecer colonias resistentes. Se determinaron los sitios de inserción de la trampa génica utilizando PCR inversa y secuenciación masivamente paralela. El diagrama muestra las posiciones sobre el cromosoma humano con el que se mapearon las mutaciones de la trampa génica individuales en el eje x y la inversa de la distancia de una mutación particular a sus vecinos en el eje y. Las mutaciones están altamente enriquecidas en el cromosoma 19 en el receptor del virus de la poliomielitis (PVR) conocido y en el cromosoma 11 en la fosfolipasa PLA2G16 que contenía 42 inserciones de trampas génicas independientes.

35 Figura 3. Análisis de transferencia Western para la expresión de PLA2G16 en células haploides no mutantes (WT; carril 1), células que contienen una inserción de la trampa génica en el gen PLA2G16 (PLA2G16^{GT}; carril 2), células que contienen una trampa génica en PLA2G16 y que expresan PLA2G16 marcado con FLAG (carril 3); células que contienen una trampa génica en PLA2G16 que expresan PLA2G16 mutante marcada con FLAG (carril 4); células que contienen una trampa génica en PLA2G16 y que expresan PLA2G16 sin marcar (carril 5); células que contienen una trampa génica en PLA2G16 y que expresan PLA2G16 mutante sin marcar (carril 6).

40 Figura 4. Células haploides que contienen una inserción de trampa génica en PLA2G16 son resistentes a infección por el virus de la poliomielitis. La complementación de PLA2G16 por expresión en exceso retroviral restaura la sensibilidad de estas células al virus de la poliomielitis. Esto requiere la actividad catalítica de PLA2G16 debido a que la complementación con un sitio catalítico mutante (C113A) no restaura la sensibilidad.

45 Figura 5. Células que contienen una inserción de trampa génica en PLA2G16 son resistentes al virus de Coxsackie, B1. Se sembraron células en placas de 24 pocillos y se añadieron a las monocapas virus a las MOI indicadas. Cuatro días después de la infección viable, las células adherentes se tiñeron utilizando cristal violeta. Las células mutantes para PLA2G16 no fueron afectadas por las altas concentraciones de virus de Coxsackie B1. La complementación de PLA2G16 por expresión en exceso retroviral restaura la sensibilidad de estas células al virus de Coxsackie B1. Esto requiere actividad catalítica de PLA2G16 debido a que la complementación con un sitio catalítico mutante (C113A) no restaura la sensibilidad.

50 Figura 6. (A) Sensibilidad de células no mutantes y mutantes de la trampa génica al virus de la poliomielitis. (B) Sensibilidad de células no mutantes y mutantes de la trampa génica al virus de Coxsackie B1. Se añadió virus de la poliomielitis a células a las MOI indicadas (eje x) y se midió la viabilidad tres días después utilizando un ensayo con MTT. HAP1: Células HAP1 no mutantes (sin trampa génica)

55 PLA2G16: células HAP1 que contienen inserción de trampa génica en el gen PLA2G16 (PLA2G16^{GT})
 PLA2G16+PM2G16WT: células HAP1 PLA2G16^{GT} infectadas con retrovirus que codifican PLA2G16 no mutante
 60 PLA2G16+PM2G16MUT: células HAP1 PLA2G16^{GT} infectadas con retrovirus que codifica PLA2G16 mutante catalíticamente inactivo (con mutación C113A)

PVR: células HAP1 con inserción de trampa génica en el receptor del virus de la poliomielitis.

65 Figura 7. La inactivación de PLA2G16 en células Hela produce elevada resistencia a los rinovirus humanos HRV-2 y HRV-14.

Figura 8. Secuencias de PLA2G16 a modo de ejemplo. En negrita se muestra el dominio transmembrana predicho

en la secuencia humana.

Descripción detallada de ciertas realizaciones de la invención

5 I. Definiciones

El término "anticuerpo" engloba inmunoglobulinas y derivados de las mismas que contienen un dominio de inmunoglobulina capaz de unirse a un antígeno. Un anticuerpo puede originarse a partir de una especie de mamífero o de ave, por ejemplo, ser humano, roedor (por ejemplo, ratón, conejo), cabra, pollo, etc., o puede generarse *ex vivo* utilizando una técnica tal como la de presentación en fagos. Los anticuerpos incluyen miembros de las diversas clases de inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, o subclases de las mismas tales como IgG1, IgG2, etc. En diversas realizaciones de la invención, "anticuerpo" se refiere a un fragmento de anticuerpo o molécula tal como un Fab', F(ab')₂, scFv (variable monocatenario) que conserva un sitio de unión al antígeno y engloba moléculas recombinantes que comprenden uno o más dominios variables (VH o VL). Un anticuerpo puede ser monovalente, bivalente o multivalente en diversas realizaciones. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o "humanizado". Un anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, aunque pueden preferirse anticuerpos monoclonales. En algunos aspectos, un anticuerpo es un intracuerpo, que puede expresarse intracelularmente. En algunas realizaciones, un compuesto comprende un anticuerpo monocatenario y un dominio de transducción de proteínas (por ejemplo, como un polipéptido de fusión).

Una "cantidad eficaz" o "dosis eficaz" de un compuesto u otro agente (o composición que contiene tal compuesto o agente) se refiere a la cantidad suficiente para lograr un efecto biológico y/o farmacológico deseado, por ejemplo, cuando se administra a una célula o a un organismo, según una forma, vía y/o programa de administración que se seleccione. Como apreciarán los expertos habituales en esta técnica, la cantidad absoluta de un compuesto, agente o composición particular que es eficaz, puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico o farmacológico deseado, el agente que va a administrarse, el tejido diana, etc. Los expertos habituales en la materia también entenderán que una "cantidad eficaz" puede ponerse en contacto con células o administrarse en una dosis única, o el efecto deseado puede lograrse con el uso de múltiples dosis. Una cantidad eficaz de un compuesto antiviral puede ser una cantidad suficiente para lograr uno o más de los siguientes: (i) reducir la replicación del virus (por ejemplo, reducir la producción de virus de progenie) en cultivo celular y/o *in vivo*; (ii) reducir la gravedad de o prevenir uno o más síntomas o signos de una infección viral; (iii) reducir significativamente el riesgo de reaparición de una infección viral (por ejemplo, reducir el riesgo de recaída); (iv) reducir significativamente el riesgo de una infección clínicamente significativa en un sujeto que se ha expuesto a un agente infeccioso, etc.

La "identidad" o "porcentaje de identidad" es una medida del grado de similitud de secuencia de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos. El porcentaje de identidad entre una secuencia de interés A y una segunda secuencia B puede calcularse alineando las secuencias, permitiendo la introducción de huecos para maximizar la identidad, determinando el número de restos (nucleótidos o aminoácidos) que son opuestos a un resto idéntico, dividiendo entre el mínimo de TG_A y TG_B (en este caso TG_A y TG_B son la suma del número de restos y posiciones de hueco internas en las secuencias A y B en el alineamiento) y multiplicando por 100. Cuando se calcula el número de restos idénticos necesarios para lograr un porcentaje de identidad particular, las fracciones deben redondearse al número entero más próximo. Las secuencias pueden alinearse usando diversos programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, programas informáticos tales como BLAST2, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST, etc., generan alineamientos. El algoritmo de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:22264-2268, 1990) modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993, está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al. (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). En algunas realizaciones, para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (Altschul, et al. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997). Si se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos. Véase la página web que tiene URL www.ncbi.nlm.nih.gov. Otros programas adecuados incluyen CLUSTALW (Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Nuc Ac Res, 22:4673-4680, 1994) y GAP (GCG Versión 9.1; que implementa el algoritmo de Needleman & Wunsch, 1970 (Needleman SB, Wunsch CD, J Mol Biol, 48:443-453, 1970).)

"Infección" se refiere a la colonización (frecuentemente perjudicial) de una célula (algunas veces denominada "célula huésped" o "huésped") u organismo pluricelular (algunas veces denominado "huésped") por un microorganismo tal como un virus. El proceso de infección engloba la entrada del virus en una o más células (invasión) y, si la infección avanza, etapas posteriores en el ciclo de vida viral, que normalmente producen multiplicación del virus y, frecuentemente en el caso de virus de importancia médica o veterinaria, efectos perjudiciales del virus sobre el huésped. Una infección viral puede ser cualquier situación en la que la presencia de una o más población (poblaciones) de virus sea dañina para una célula huésped u organismo. El término "infección" engloba replicación excesiva de virus que normalmente están presentes en o sobre el cuerpo de un vertebrado, por ejemplo, mamífero, u otro organismo, o la presencia y, opcionalmente, replicación, de virus que normalmente no están presentes en o sobre el cuerpo de un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, u otro organismo.

65

"Inhibir" puede usarse indistintamente con términos tales como "suprimir", "disminuir", y similares, según convenga en el contexto. Se entenderá que el grado de inhibición puede variar. Por ejemplo, la inhibición puede referirse a una reducción de al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %.

5 "Aislado" se refiere a una sustancia que se separa de al menos algunas otras sustancias con las que normalmente se encuentra en la naturaleza, normalmente por un proceso que implica la mano del hombre, o se produce artificialmente, por ejemplo, se sintetiza químicamente, o está presente en un entorno artificial.

10 "Ácido nucleico" se utiliza indistintamente con "polinucleótido" y engloba polímeros que existen de forma natural de nucleósidos, tales como ADN y ARN, normalmente unidos por enlaces fosfodiéster, y polímeros que no existen de forma natural de nucleósidos o análogos de nucleósidos. En algunas realizaciones, un ácido nucleico comprende nucleótidos estándar (abreviados A, G, C, T, U). En otras realizaciones, un ácido nucleico comprende uno o más nucleótidos no estándar. En algunas realizaciones, uno o más nucleótidos son nucleótidos o análogos de nucleótidos que no existen de forma natural. Un ácido nucleico puede comprender bases químicamente o biológicamente modificadas (por ejemplo, bases metiladas), azúcares modificados (2'-fluororribosa, arabinosa o hexosa), grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos o enlaces 5'-N-fosforamidito), ácidos nucleicos bloqueados, o morfolinós. En algunas realizaciones, un ácido nucleico comprende nucleósidos que están unidos por enlaces fosfodiéster. En algunas realizaciones, al menos algunos nucleósidos están unidos por un enlace no fosfodiéster. Un ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario, o parcialmente bicatenario. Un ácido nucleico al menos parcialmente bicatenario puede tener uno o más nucleótidos protuberantes, por ejemplo, nucleótido(s) protuberante(s) en 5' y/o 3'. Modificaciones de ácidos nucleicos (por ejemplo, modificaciones de nucleósidos y/o del esqueleto), nucleótidos no estándar, vehículos de administración y enfoques, etc., conocidos en la técnica por ser útiles en el contexto de la interferencia por ARN (iARN), aptámero, o moléculas basadas en antisentido para investigación o fines terapéuticos, se contemplan para su uso en diversas realizaciones de la presente invención. Véase, por ejemplo, Crooke, ST (ed.) *Antisense drug technology: principles, strategies, and applications*, Boca Raton: CRC Press, 2008; Kurreck, J. (ed.) *Therapeutic oligonucleotides*, RSC biomolecular sciences. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008. Un ácido nucleico puede comprender una marca detectable, por ejemplo, un colorante fluorescente, átomo radiactivo, etc. "Oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico relativamente corto, por ejemplo, normalmente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 60 nucleótidos de longitud.

Un "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Una proteína es una molécula que comprende uno o más polipéptidos. Un péptido es un polipéptido relativamente corto, normalmente entre aproximadamente 2 y 60 aminoácidos de longitud. Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" pueden usarse indistintamente. Los polipéptidos de interés en el presente documento frecuentemente contienen aminoácidos estándar (los 20 L-aminoácidos que son los más comúnmente encontrados en la naturaleza en las proteínas). Sin embargo, pueden usarse otros aminoácidos y/o análogos de aminoácidos conocidos en la técnica en ciertas realizaciones de la invención. Puede modificarse uno o más de los aminoácidos en un polipéptido (por ejemplo, en el extremo N o C o en una cadena lateral), por ejemplo, mediante adición, por ejemplo, enlace covalente, de un resto tal como un grupo alquilo, grupo hidrato de carbono, un grupo fosfato, un halógeno, un conector para conjugación, etc. Una secuencia de polipéptidos presentada en el presente documento se presenta en una dirección del extremo N al extremo C, a menos que se indique lo contrario. "Dominio de polipéptido" se refiere a un segmento de aminoácidos dentro de un polipéptido más largo. Un dominio de polipéptido puede presentar una o más propiedades de unión o funcionales discretas, por ejemplo, una actividad catalítica. Frecuentemente, un dominio es reconocible por su conservación entre polipéptidos encontrados en múltiples especies diferentes.

Como se usa en el presente documento, el término "purificado" se refiere a agentes o entidades (por ejemplo, compuestos) que han sido separados de la mayoría de los componentes con los que están asociados en la naturaleza o cuando se generaron originalmente. En general, tal purificación implica la acción de la mano del hombre. Los agentes o entidades purificados pueden estar parcialmente purificados, sustancialmente purificados, o ser puros. Tales agentes o entidades pueden ser, por ejemplo, al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más del 99 % puros. En algunas realizaciones, un ácido nucleico o polipéptido se purifica de forma que constituya al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más, del material de ácido nucleico o polipéptido total, respectivamente, presente en una preparación. La pureza puede basarse en, por ejemplo, el peso seco, tamaño de picos en un trazado de cromatografía, abundancia molecular, intensidad de bandas sobre un gel, o intensidad de cualquier señal que se correlaciona con la abundancia molecular, o cualquier método de cuantificación aceptado en la técnica. En algunas realizaciones, agua, tampones, iones y/o moléculas pequeñas (por ejemplo, precursores tales como nucleótidos o aminoácidos), pueden estar opcionalmente presentes en una preparación purificada. Puede prepararse una molécula purificada separándola de otras sustancias (por ejemplo, otros materiales celulares), o produciéndola de tal manera que se logre un grado deseado de pureza. En algunas realizaciones, una molécula o composición purificada se refiere a una molécula o composición que se prepara utilizando cualquier método de purificación aceptado en la materia. En algunas realizaciones, "parcialmente purificado" significa que una molécula producida por una célula ya no está presente dentro de la célula, por ejemplo, la célula ha sido lisada y, opcionalmente, se ha eliminado al menos algo del material celular (por ejemplo, pared celular, membrana(s) celular(es), orgánulo(s) celular(es)).

"Interferencia por ARN" (iARN) engloba procesos en los que un complejo molecular endógeno, conocido como un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), silencia la expresión génica en un modo específico de secuencia. El RISC contiene una hebra de ARN corta que dirige o "guía" la degradación específica de secuencia o represión traduccional de ARNm con el que tiene complementariedad. La complementariedad entre el ARN corto y el ARNm no necesita ser perfecta (100 %). Por ejemplo, el grado de complementariedad y/o las características de la estructura formada por hibridación del ARNm y la hebra de ARN corto puede ser tal que la hebra pueda (i) guiar la escisión del ARNm en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y/o (ii) producir represión traduccional del ARNm por el RISC. Se apreciará que pueden ser toleradas una o más discordancias entre la hebra guía y el ARNm diana, especialmente fuera de la región semilla (los nucleótidos en las posiciones 2-7 o 2-8) de la hebra de guía. Un ARN corto que guía el silenciamiento frecuentemente llega inicialmente a asociarse a componentes de RISC (en un complejo algunas veces denominado complejo de carga de RISC) como parte de un ARN bicatenario corto (ARNbc). Frecuentemente para inactivar un gen diana se utiliza iARN. "Inactivación" se refiere normalmente a una reducción en la expresión, que puede producirse, por ejemplo, al nivel de transcripción, estabilidad de ARNm, traducción, o estabilidad de proteínas. La reducción puede ser completa (por ejemplo, la cantidad de producto génico se reduce a niveles de fondo) o inferior a completa. Por ejemplo, el nivel de ARNm y/o de proteína puede reducirse el 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o más.

Para inhibir la expresión en células eucariotas, por ejemplo, células de vertebrado, puede emplearse iARN en una variedad de formas como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, un ácido nucleico bicatenario corto se introduce en células. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que se procesa intracelularmente (por ejemplo, por una o más enzimas de la familia de RNasa III Dicer) dando ARNbc corto, se introduce en o se expresa en células. Como se usa en el presente documento, el término "agente de iARN" engloba ácidos nucleicos que pueden usarse para lograr iARN en células eucariotas. Agentes de iARN a modo de ejemplo son ARN interferente pequeño (ARNip) y ARN de horquilla corta (ARNhc). Como se conoce en la técnica, los ARNip normalmente comprenden dos hebras separadas de ácido nucleico que se hibridan entre sí para formar un dúplex. Pueden sintetizarse *in vitro*, por ejemplo, utilizando técnicas de síntesis de ácidos nucleicos estándar o por escisión de un ARNbc más largo, por ejemplo, por una RNasa III o una enzima similar a RNasa III tal como Dicer. En ciertas realizaciones, un ARNip o ARNhc comprende una porción de dúplex de aproximadamente 15-29 nucleótidos (nt) de largo, por ejemplo, entre 17-25 nt de largo, por ejemplo, entre 19-23 nt de largo, en el que cualquiera o ambas hebras tiene opcionalmente un nucleótido protuberante en 3' de 1-5 nucleótidos de largo (por ejemplo, 2 nucleótidos), que puede estar compuesto de desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, las hebras son perfectamente complementarias dentro de la porción del dúplex, mientras que en otras realizaciones, la porción de dúplex podría contener uno o más pares o bultos de nucleótidos desapareados. En algunas realizaciones, cada hebra de un ARNip tiene entre 15-29 nucleótidos de longitud, por ejemplo, entre 19-25 nt de largo, por ejemplo, 21-23 nt de largo. Los ARNhp comprenden una única hebra de ácido nucleico que contiene dos porciones complementarias separadas por una región predominantemente no auto-complementaria. Las porciones complementarias se hibridan para formar una estructura de dúplex y la región no auto-complementaria forma un bucle que conecta el extremo 3' de una hebra del dúplex y el extremo 5' de la otra hebra. Los ARNhp pueden experimentar procesamiento intracelular para generar ARNip.

Los agentes de iARN también incluyen microARN (miARN) y precursores de miARN. Los términos "miARN" y "precursor de miARN" se utilizan frecuentemente en la materia para referirse a ARN codificados endógenamente. Como se usa en el presente documento, "ARNm" y "precursor de ARNm" engloban ácidos nucleicos diseñados artificialmente que funcionan de una manera análoga a los miARNs endógenos.

En ciertas realizaciones, un agente de iARN es un vector que comprende un molde para la transcripción de un ARNip (por ejemplo, como dos hebras separadas que pueden hibridarse entre sí), ARNhp, o precursor de miARN. Tales vectores pueden usarse para introducir el molde en células de vertebrado, por ejemplo, células de mamífero, y producir la expresión transitoria o estable del ARNip, ARNhp o precursor de miARN.

Una "molécula pequeña", como se usa en el presente documento, es una molécula orgánica que es inferior a aproximadamente 2 kilodaltons (KDa) de masa. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es inferior a aproximadamente 1,5 KDa, o inferior a aproximadamente 1 KDa. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es inferior a aproximadamente 800 daltons (Da), 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da o 100 Da. Frecuentemente, una molécula pequeña tiene una masa de al menos 50 Da. En algunas realizaciones, una molécula pequeña es no polimérica. En algunas realizaciones, una molécula pequeña no es un aminoácido. En algunas realizaciones, una molécula pequeña no es un nucleótido. En algunas realizaciones, una molécula pequeña no es un sacárido. En algunas realizaciones, una molécula pequeña contiene múltiples enlaces carbono-carbono y puede comprender uno o más heteroátomos y/o uno o más grupos funcionales importantes para la interacción estructural con proteínas (por ejemplo, enlace de hidrógeno), por ejemplo, un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, y en algunas realizaciones al menos dos grupos funcionales. Las moléculas pequeñas frecuentemente comprenden una o más estructuras de carbono, cíclicas o heterocíclicas, y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas, opcionalmente sustituidas con uno o más de los grupos anteriormente funcionales.

Un "sujeto" puede ser cualquier organismo pluricelular, por ejemplo, un organismo pluricelular que es susceptible a infección por un virus o está infectado o puede infectarse por un virus. Frecuentemente, al menos algunas de las

células del sujeto expresan cantidades detectables de PLA2G16. En algunas realizaciones un sujeto es un animal, por ejemplo, un vertebrado, por ejemplo, un mamífero o un ave. Como ejemplos de mamíferos se incluyen, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo), ungulados (por ejemplo, especies ovina, bovina, equina, caprina), caninos y felinos. En algunas realizaciones, el animal es un mamífero de importancia económica, tal como una vaca, un caballo, un cerdo, una cabra o una oveja. Frecuentemente, un sujeto es un individuo al que va a administrarse un compuesto, por ejemplo, con fines experimentales, de diagnóstico y/o terapéuticos o del que se obtiene una muestra o en el que se realiza un procedimiento de diagnóstico (por ejemplo, una muestra o procedimiento que se utilizará para determinar si el sujeto tiene una infección viral o está en riesgo de tener una infección viral).

"Tratan", "tratar" y términos similares se refieren a proporcionar tratamiento médico y/o quirúrgico de un sujeto. El tratamiento puede incluir, pero no se limita a, administrar un compuesto o composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) a un sujeto. El tratamiento normalmente se realiza en un esfuerzo por alterar la evolución de una enfermedad, trastorno o afección no deseable de un modo beneficioso al sujeto. El efecto del tratamiento puede generalmente incluir invertir, aliviar, reducir la gravedad de, retrasar la aparición de, curar, inhibir la progresión de, y/o reducir la probabilidad de la manifestación o reaparición de la enfermedad, trastorno o afección al que se aplica el término, o uno o más síntomas o manifestaciones de tal enfermedad, trastorno o afección. Una composición de la presente divulgación puede administrarse a un sujeto que ha desarrollado una infección o está en riesgo elevado de desarrollar una infección con respecto a un miembro de la población general. Una composición de la presente divulgación puede administrarse profilácticamente, es decir, antes del desarrollo de cualquier síntoma o manifestación de una afección. Normalmente, en este caso, el sujeto estará en riesgo de desarrollar la afección. Por ejemplo, una composición desvelada puede administrarse antes de la exposición del sujeto al agente de infección o antes de la aparición de un evento patógeno. "Prevenir" puede referirse a administrar un compuesto o composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) a un sujeto que no ha desarrollado una enfermedad o afección, para reducir la probabilidad de que la enfermedad o afección se produzca o para reducir la gravedad de la enfermedad o afección en caso de que se produzca. El sujeto puede identificarse como en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección (por ejemplo, en riesgo elevado con respecto a la mayoría de los otros miembros de la población o como que tiene un factor de riesgo que aumenta la probabilidad de desarrollar la enfermedad).

II. Visión general

La presente invención se refiere en parte a la identificación de fosfolipasa A2, Grupo XVI (PLA2G16), como una nueva diana molecular de uso para la identificación y/o caracterización de compuestos antivirales. PLA2G16 es una fosfolipasa que se expresa ampliamente o de forma ubicua en tejidos de mamífero. Se ha descubierto ahora que el polipéptido PLA2G16 es un factor de célula huésped que desempeña una función importante en la infección de células de vertebrado, por ejemplo, células de mamífero, por virus de la familia picornavirus. La invención como se define por las reivindicaciones engloba el reconocimiento de que inhibir PLA2G16 inhibe la infección viral. Como se describe en más detalle en los ejemplos, utilizando una estrategia de mutagénesis de trampa génica en una línea celular de mamífero casi haploide (la línea celular HASP1), se mostró que las inserciones en el gen *PLA2G16* (localizado en el cromosoma 11 en células humanas) convirtieron las células en resistentes a infección por el virus de la poliomielitis y el virus de Cocksackie B1. El restaurar la función de PLA2G16 no mutante expresando PLA2G16 no mutante en las células restauró la susceptibilidad a la infección, pero no la expresión de una versión mutante catalíticamente inactiva de PLA2G16. Además, la inactivación de la expresión de PLA2G16 endógena en una línea celular sensible a rinovirus (células HeLa) utilizando ARN interferente pequeño (ARNip) convirtió estas células en resistentes a infección por rinovirus. Los descubrimientos descritos en el presente documento indican que se requiere PLA2G16 para la infección de células de vertebrado por una amplia gama de virus.

La divulgación proporciona composiciones y métodos de inhibición de la infección viral. La divulgación proporciona además composiciones y métodos útiles para identificar compuestos candidatos para inhibir la infección viral. En algunos aspectos, las composiciones y métodos se refieren al uso del gen *PLA2G16* y/o polipéptido PLA2G16 como dianas para la identificación de compuestos antivirales (es decir, compuestos que inhiben la infección viral). Ciertos de los métodos inventivos comprenden identificar o proporcionar un compuesto que inhibe PLA2G16. Según ciertas realizaciones de la invención, un compuesto que inhibe PLA2G16 es un compuesto antiviral candidato. Ciertos de los métodos inventivos comprenden (i) identificar o proporcionar un compuesto que inhibe PLA2G16; y (ii) determinar si el compuesto inhibe la infección viral de una célula u organismo pluricelular, en los que si el compuesto inhibe la infección viral de una célula o organismo pluricelular, el compuesto es un compuesto antiviral. En algunas realizaciones, un compuesto que inhibe PLA2G16 inhibe la expresión de PLA2G16. En algunas realizaciones, un compuesto que inhibe PLA2G16 inhibe una función molecular de PLA2G16, por ejemplo, el compuesto inhibe la actividad catalítica de PLA2G16. El virus es un picornavirus.

Inhibir la infección viral puede comprender intervenciones que inhiben una o más etapas del ciclo de vida viral de manera que, por ejemplo, se reduzca la entrada de virus en células, se reduzca la producción de producto(s) génico(s) viral(es) (ARN y/o proteínas virales), se reduzca la producción de virus de progenie, se reduzca la liberación de virus de progenie y/o se reduzca la diseminación de virus dentro de una población de células (por ejemplo, en cultivo celular o en un organismo multicelular) en comparación con un nivel de referencia apropiado, por ejemplo, el nivel que existiría en ausencia de la intervención. La inhibición de la infección viral puede evaluarse

basándose en cualquiera de una variedad de indicadores adecuados. En algunas realizaciones, la inhibición de un indicador de infección viral es completa o sustancialmente completa, por ejemplo, se reduce un indicador de infección viral tal como la producción de un producto génico viral, producción de virus de progenie, infección de células adicionales, a nivel de fondo o indetectable, por ejemplo, un nivel que se esperaría en ausencia del virus. En algunas realizaciones, la inhibición no es completa. En algunas realizaciones, la inhibición de la infección viral puede referirse a una reducción de aproximadamente un factor de al menos 10, al menos 10^2 , al menos 10^3 , al menos 10^4 , o más, por ejemplo, en la producción de virus de progenie o de un producto génico viral.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos de inhibición de la infección viral de una célula. En algunos aspectos, los métodos comprenden inhibir PLA2G16 en una célula, inhibiendo así la infección viral de la célula. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una célula con un compuesto que inhibe PLA2G16, de manera que se inhiba la infección viral de la célula. En algunas realizaciones, la célula es una célula de animal, por ejemplo, una célula de vertebrado. En algunas realizaciones, la célula de vertebrado es una célula de mamífero. En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos de inhibición de la infección viral de un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un vertebrado. En algunos aspectos, los métodos comprenden inhibir PLA2G16 en al menos algunas células del organismo, por ejemplo, al menos algunas células que están infectadas por un virus o son susceptibles a infección por un virus. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar un compuesto que inhibe PLA2G16 al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal, por ejemplo, un vertebrado. En algunas realizaciones, el vertebrado es un mamífero.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos de disminución de la susceptibilidad (o aumento de la resistencia) de una célula o sujeto a un virus, comprendiendo los métodos inhibir PLA2G16 en una célula o en al menos algunas células del sujeto. Así, la divulgación proporciona métodos de reducción de la vulnerabilidad o propensión de una célula o sujeto a ser infectado y/o a experimentar efectos adversos debido a un virus. "Resistencia" a un virus normalmente se refiere a la capacidad de defender contra la infección. Para fines de descripción, la invención se describirá principalmente en términos de inhibir la infección por virus. Sin embargo, se entenderá que, a menos que se indique lo contrario, los métodos desvelados para inhibir la infección por virus de una célula o sujeto podrían describirse como inhibir la susceptibilidad de la célula o sujeto a infección por virus o aumentar la resistencia de la célula o sujeto a infección por virus.

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos de selección de un agente terapéutico para un sujeto, comprendiendo el método (a) determinar si el sujeto está infectado por un virus para el que PLA2G16 es un factor de célula huésped; y (b) seleccionar un compuesto que inhibe PLA2G16 como agente terapéutico para el sujeto si el sujeto está infectado por un virus para el que PLA2G16 es un factor de célula huésped. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además administrar un compuesto que inhibe PLA2G16 al sujeto.

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos de determinación de si un sujeto es un candidato para el tratamiento con un compuesto que inhibe PLA2G16. En algunas realizaciones, el método comprende determinar si el sujeto está infectado por, o en riesgo de infección por, un virus para el que PLA2G16 es un factor de célula huésped, en el que si el sujeto está infectado por un virus para el que PLA2G16 es un factor de célula huésped, el sujeto es un candidato para el tratamiento con un compuesto que inhibe PLA2G16. En algunas realizaciones, el método comprende determinar si el sujeto está infectado por, o en riesgo de infección por, un picornavirus, en el que si el sujeto está infectado con un picornavirus el sujeto es un candidato para el tratamiento con un compuesto que inhibe PLA2G16. En algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además administrar un compuesto que inhibe PLA2G16 al sujeto.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto en necesidad de tratamiento para una infección viral. En algunas realizaciones, los métodos comprenden seleccionar un compuesto que inhibe PLA2G16 como agente terapéutico para el sujeto. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar un compuesto que inhibe PLA2G16 al sujeto. En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento comprenden proporcionar un sujeto en necesidad de tratamiento para una infección viral. En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento comprenden diagnosticar que un sujeto está infectado con un virus. El sujeto puede tener uno o más síntomas o signos de una infección viral, por ejemplo, uno o más síntomas o signos asociados a un estado patológico resultante de infección por un virus. En algunas realizaciones, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende el compuesto al sujeto. "Administración" puede comprender administración directa o administración indirecta. La administración "indirecta" comprende actividades tales como proporcionar, recetar, dirigir otro individuo para administrar, o hacer de algún modo que un compuesto esté disponible para un sujeto.

60 III. Virus y enfermedades virales

En algunos aspectos, la invención se refiere a inhibir la infección de una célula o sujeto por un virus, en la que PLA2G16 promueve o desempeña una función en una o más etapas del ciclo de vida del virus. El virus es un picornavirus.

- En algunas realizaciones, el virus puede infectar células de una o más especies de animales, por ejemplo, una o más especies de vertebrado, por ejemplo, especies de mamífero o de aves, en las que las células expresan PLA2G16. En diversas realizaciones, la invención puede aplicarse a cualquier virus cuya capacidad para infectar una célula, por ejemplo, una célula de animal, se reduzca si se inhibe PLA2G16. Aunque la invención se describe en el presente documento principalmente en referencia a ciertos virus de interés, las realizaciones de la invención pueden aplicarse a cualquier virus en el que la expresión de un polipéptido PLA2G16 en la célula promueva o desempeñe una función en una o más etapas del ciclo de vida viral. En algunas realizaciones, el virus es de importancia médica, por ejemplo, es reconocido en la técnica médica como un agente causante de una o más enfermedades que afectan a los seres humanos. En algunas realizaciones, el virus es de importancia veterinaria, por ejemplo, es reconocido en la técnica veterinaria como un agente causante de una o más enfermedades que afectan a animales no humanos. Véase, por ejemplo, Knipe & Howley, citado anteriormente; Büchen-Osmond, C. citado anteriormente, y Virus Descriptions en "ICTVdB - The Universal Virus Database", citado anteriormente, para discusión de diversas familias de virus, que incluyen virus de importancia médica y/o veterinaria.
- El virus tiene un genoma de ARN monocatenario (ARNmc). El virus de genoma de ARNmc es de hebra positiva. El virus es un virus no envuelto y/o tiene una morfología de virión icosaédrico o de nucleocápside. El virus es un miembro de la superfamilia de tipo picornavirus (tales virus también se denominan "virus tipo picorna" en el presente documento). Los virus de la superfamilia tipo picornavirus son virus de ARNmc de sentido positivo que se caracterizan por un conjunto parcialmente conservado de genes que consiste en una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), una proteasa tipo quimotripsina (3CPro), una helicasa de la superfamilia 3 (S3H) y una proteína unida a genoma (proteína viral, unida a genoma, VPg). La superfamilia tipo picornavirus engloba el orden propuesto Picornavirales (tratado más adelante), además de diversos géneros de virus y familias que se encuentran fuera del orden propuesto, que incluyen, por ejemplo, *Caliciviridae* y *Astroviridae*. Véase, por ejemplo, Koonin, EV, et al., Nature Reviews Microbiology, 6:925-939, 2008.
- El virus es un miembro del orden propuesto *Picornavirales*. Este orden incluye virus que infectan eucariotas y que comparten las siguientes propiedades: (i) un genoma de ARN de sentido positivo, normalmente con una VPg unida a 5' y poliadenilada en 3', (ii) traducción de genoma en poliproteína(s) autoproteolíticamente procesada(s), (iii) proteínas de la cápside organizadas en un módulo que contiene tres dominios de rollo de gelatina relacionados que forman partículas no envueltas icosaédricas pequeñas con una simetría pseudo-T = 3, y (iv) un módulo de tridominio que contiene una helicasa de la superfamilia III, una (cisteína) proteinasa con un pliegue tipo quimotripsina y una ARN polimerasa dependiente de ARN. Según estos criterios, el orden *Picornavirales* incluye las familias *Picornaviridae*, *Comoviridae*, *Dicistroviridae*, *Marnaviridae*, *Sequiviridae* y los géneros *Cheravirus*, *Iflavirus* y *Sadwavirus*. Otros taxos de virus "tipo picorna", por ejemplo *Potyviridae*, *Caliciviridae*, *Hipoviridae*, no se adaptan a varios de los criterios anteriores y están más remotamente relacionados. La familia *Caliciviridae* está compuesta por pequeños (27-40 nm) virus icosaédricos no envueltos e incluyen los cuatro géneros *Norovirus*, *Sapovirus*, *Vesivirus* y *Lagovirus*. Los principales patógenos de importancia médica son los norovirus, que son una causa importante de gastroenteritis aguda. Patógenos veterinarios importantes incluyen vesivirus tales como calicivirus felino (FCV) y virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV). La familia *Astroviridae* incluye astrovirus humanos y animales que tienen morfología icosaédrica y una superficie de tipo estrella característica cuando se observan con microscopía electrónica. Son agentes importantes de la gastroenteritis y la diarrea en los seres humanos, además de en diversos animales, que incluyen mamíferos (por ejemplo, cerdos) y aves.
- La invención se refiere a inhibir la infección por virus que son miembros de la familia *Picornaviridae* (también denominados "picornavirus" o "Picornavirus" en el presente documento). Los picornavirus (al igual que otros miembros de la superfamilia tipo picornavirus) son virus no envueltos con un genoma monocatenario de polaridad positiva. Comparten una organización genómica común con una región no traducida (UTR, *untranslated region*) 5' larga (por ejemplo, al menos aproximadamente 500 nucleótidos (nt) hasta aproximadamente 1200 nt de largo) que contiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, *internal ribosome entry site*), un único marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) que codifica una poliproteína que se procesa proteolíticamente, y una UTR 3' corta, seguida de una cola de poliA (Knipe & Howley, citado anteriormente). Las principales características diferenciadoras entre los diferentes picornavirus incluyen, entre otras, la estructura secundaria de las UTR 5' y el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).
- La familia de los picornavirus incluye doce géneros: *Aphthovirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobovirus*, *Parechovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* y *Tremovirus* (véase, "ICTVdB - The Universal Virus Database", Virus Taxonomy: 2009 Edición v4, citado anteriormente). Un virus que es un miembro de uno de estos géneros puede denominarse un aftovirus, avihepatovirus, cardiovirus, enterovirus, erbovirus, hepatovirus, kobovirus, parechovirus, rinovirus, sapelovirus, senecavirus, teschovirus o tremovirus, respectivamente. Estos géneros incluyen numerosos virus que infectan vertebrados, y varios de ellos contienen miembros que son causas importantes de enfermedad en seres humanos y/o en animales no humanos. Por ejemplo, los aftovirus incluyen virus de la glosopeda, que infectan a animales de pezuña hendida tales como ganado vacuno, cabras, cerdos y ovejas. Los cardiovirus incluyen dos agrupaciones distintas, incluyendo la primera el virus de la encefalomiocarditis e incluyendo el segundo el virus de la encefalomielititis murina de Theiler y virus relacionados, que incluyen algunos que infectan seres humanos.

Los enterovirus humanos son causas comunes de síntomas leves de las vías respiratorias superiores y enfermedades tipo gripe, entre otras. Menos comúnmente, pueden producir afecciones más graves tales como meningitis viral, miocarditis, o afecciones del sistema nervioso central tales como encefalitis. El género *Enterovirus* incluye las 10 siguientes especies, como se exponen por el ICTV en su edición de 2009 (disponible en <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>): *Enterovirus humano A*, *Enterovirus humano B*, *Enterovirus humano C*, *Enterovirus humano D*, *Enterovirus simio A*, *Enterovirus bovino*, *Enterovirus porcino B*, *Rinovirus humano A*, *Rinovirus humano B* y *Rinovirus humano C*. Muchas de estas especies engloban múltiples serotipos, que pueden a su vez incluir múltiples cepas. Las especies de *Enterovirus humanos* engloban conjuntamente virus de la poliomielitis, virus de Coxsackie, ecovirus, y numerosos otros enterovirus que infectan a los seres humanos. El género *Enterovirus* también engloba numerosos virus entéricos no humanos. Los serotipos de los virus de la poliomielitis, los virus de la poliomielitis (PV)-1, PV-2 y PV-3, están incluidos dentro de la especie de *Enterovirus humano C*. Aunque los virus de la poliomielitis han sido ampliamente erradicados mediante el uso generalizado de vacunas eficaces, otros virus dentro del género *Enterovirus* son causas frecuentes de enfermedades humanas agudas y crónicas.

Los virus de Coxsackie se dividen en los virus de grupo A y grupo B basándose en observaciones previas de su patogenicidad en ratones. Los virus de Coxsackie están asociados a una serie de enfermedades en el ser humano que incluyen meningitis aséptica, enfermedad de manos-pies-boca, herpangina, miocarditis (que algunas veces conduce a cardiomiopatía) y pancreatitis, y pueden ser un factor etiológico en la diabetes de tipo I (véanse, por ejemplo, los artículos en *Curr Top Microbiol Immunol*. Vol. 323, 2008). Los virus de Coxsackie se clasifican entre las especies de *Enterovirus humano A*, *Enterovirus humano B* y *Enterovirus humano C*. Virus de Coxsackie a modo de ejemplo incluyen los serotipos CV-A2, CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-B6, CV-A9, CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A9, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24.

Las especies de *Enterovirus humano A*, *Enterovirus humano B*, *Enterovirus humano C* y *Enterovirus humano D* incluyen enterovirus adicionales tales como los serotipos EV-71, EV-76, EV-89, EV-90, EV-91, EV-92, EV-69, EV-73, EV-74, EV-75, EV-77, EV-78, EV-79, EV-80, EV-81, EV-82, EV-83, EV-84, EV-85, EV-86, EV-87, EV-88, EV-93, EV-97, EV-98, EV-100, EV-101, EV-106, EV-107, EV-95, EV-96, EV-99, EV-102, EV-104, EV-105, EV-109, EV-68, EV-70 y EV-94. Por ejemplo, el enterovirus 71 (EV-71) es un serotipo de enterovirus patógeno que produce brotes recurrentes en diferentes partes del mundo. Puede infectar el sistema nervioso central y puede producir muerte y secuelas neurológicas a largo plazo en seres humanos, especialmente lactantes y niños pequeños (Lin, Y-W., et al., *Journal of Virology*, 83(13): 6477-6483, 2009, y referencias en su interior). EV-71 también puede producir diarrea, urticaria y enfermedad de manos, pies y boca.

Los miembros de las especies de *Rinovirus humano A* y *Rinovirus humano B* ("rinovirus") se replican en la nasofaringe y algunas veces en las vías respiratorias inferiores. Estos virus (de los que existen más de 100 serotipos) son agentes etiológicos importantes del resfriado común en los seres humanos y también pueden producir enfermedad más grave, particularmente en individuos susceptibles.

El género *Teschovirus* incluye teschovirus porcino, que produce polioencefalitis en cerdos. Los hepatovirus incluyen virus de la hepatitis A (VHA) humana, que producen hepatitis A, una infección aguda del hígado.

Continúan siendo descubiertos picornavirus adicionales. Véase, por ejemplo, Kapoor, A., et al., A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(51):20482-7, 2008, que describe miembros del género cosavirus propuesto. Más recientemente, se descubrió un novedoso virus que se ha designado klassevirus utilizando secuenciación de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Greninger, A, et al., The complete genome of klassevirus - a novel picornavirus in pediatric stool, *Virology*, 6:82- 2009).

Los expertos en la materia apreciarán que la taxonomía y la clasificación de virus continúan desarrollándose y que los virus pueden reclasificarse, por ejemplo, ya que virus adicionales se descubren o estudian, por ejemplo, a medida que se secuencian genes virales, y/o a medida que son más evidentes las relaciones entre virus. Así, ciertos virus pueden haber sido reclasificados por el ICTV posteriormente a la publicación de ciertas referencias citadas en el presente documento y/o pueden ser reclasificados en el futuro. Además, los expertos en la materia apreciarán que muchas publicaciones y referencias referentes a virus no se adhieren a los convenios establecidos por el ICTV, pueden haber precedido al establecimiento de estos convenios, y/o pueden emplear nomenclatura coloquial formal y/o informal. El identificar características de virus (y cepas y variantes de las mismas) está bien establecido y es conocido en la técnica. Muestras de referencia caracterizadas de numerosos virus están depositadas en y normalmente están disponibles de diversos centros de recursos biológicos internacionalmente reconocidos o colecciones de cultivo tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, VA; <http://www.atcc.org/>), Colección Nacional de Virus Patógenos (NCPV) de las Colecciones de Cultivos de la Agencia de Protección de la Salud de la Agencia de Protección de la Salud del Reino Unido (Porton Down, Salisbury, RU; <http://www.hpacultures.org.uk/aboutus/ncpv.jsp>) y/o grupos especializados internacionalmente reconocidos, ya que son reactivos de uso para identificar y/o caracterizar virus. La caracterización y/o clasificación pueden basarse en propiedades tales como secuencias de ácidos nucleicos y/o de polipéptidos, reactividad con reactivos inmunológicos (por ejemplo, antisueros), etc. Están públicamente disponibles secuencias del genoma de numerosos enterovirus,

que incluyen aquellos de numerosos enterovirus humanos, por ejemplo, en la página web del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/>), Centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y en la bibliografía científica.

5 Se ha estudiado ampliamente la estructura y ciclo de vida de los Picornavirus (véase, por ejemplo, Knipe & Howley, citado anteriormente). Brevemente, la cápside del picornavirus normalmente está compuesta por cuatro proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 (los Parechovirus solo contienen VP1, VP2 y VP0, el precursor sin escindir de VP2+VP4). El elemento estructural básico de la cápside del picornavirus, denominado promotor, contiene una copia de VP1, VP2, VP3 y VP4. VP1, VP2 y VP3 forman una vaina con VP4 sobre su superficie interna. Diferencias en las
10 secuencias de aminoácidos de ciertas porciones de VP1, VP2 y VP3 dan morfologías y antigenicidades distintas de diferentes picornavirus.

La replicación de picornavirus se produce en el citoplasma de la célula. Los picornavirus inician la infección uniéndose a un receptor sobre la membrana de la célula huésped, que va seguido de desnudado y entrada del
15 genoma viral en el citoplasma. El receptor del virus de la poliomielitis (PVR, CD155) y el rinovirus del grupo principal (ICAM-1) se identificaron en 1989, y desde entonces se han identificado receptores para varios otros picornavirus. Algunos picornavirus normalmente requieren co-receptores para la infección. Por ejemplo, muchos enterovirus se unen al factor acelerador del decaimiento (DAF; CD55), pero la infección normalmente requiere la presencia de una molécula adicional, por ejemplo, ICAM-1 o un miembro de la familia de las integrinas. El genoma de ARN se traduce
20 tras la entrada en el citoplasma en una única poliproteína que se escinde durante la traducción por proteasas codificadas por virus (principalmente 2Apro y C3pro o 3CDpro) para producir todas las proteínas virales necesarias para la replicación viral. Algunos de los precursores sin escindir también tienen funciones durante la replicación viral. Entre las proteínas virales sintetizadas están la ARN polimerasa dependiente de ARN viral y proteínas accesorias requeridas para la replicación del genoma y síntesis de ARNm. La primera etapa de replicación del genoma es la
25 copia del ARN de hebra positiva para generar un producto intermedio de hebra negativa, que se utiliza como molde para la síntesis de hebras positivas adicionales. La encapsidación empieza una vez se han acumulado suficientes proteínas de la cápside.

Muchos picornavirus producen cambios morfológicos característicos, denominados "efectos citopáticos", en células infectadas. Los efectos citopáticos pueden incluir la condensación de cromatina, la vesiculación nuclear, la
30 proliferación de vesículas membranosas, la filtración de contenido intracelular y la deshidratación de toda la célula. En el caso de muchas especies de picornavirus, los viriones se liberan de células infectadas como consecuencia de la lisis celular. Otros picornavirus (por ejemplo, virus de la hepatitis A) se liberan de las células sin lisis celular. En algunas realizaciones de la invención, el (los) efecto(s) citopático(s) y/o la liberación de viriones se evalúa para
35 determinar si una célula o un sujeto está infectado con un virus. En algunas realizaciones, el (los) efecto(s) citopático(s) y/o la liberación de viriones se evalúa para determinar si un compuesto inhibe una infección por virus.

IV. Polipéptidos PLA2G16

40 PLA2G16 es una proteína de ~18 kilodalton que se expresa a niveles muy altos en tejido adiposo de vertebrados (especialmente tejido adiposo blanco) y también se expresa a niveles más bajos en una amplia variedad de tejidos de vertebrado y líneas celulares cultivadas. PLA2G16 también se conoce como fosfolipasa A2 específica de tejido adiposo (AdPLA), supresor 3 tipo HRAS (HRASLA3), y por varios otros nombres. Un experto en la materia será
45 fácilmente capaz de obtener secuencias de ARN genómico y de ARNm de *PLA2G16* y la proteína PLA2G16 de bases de datos públicamente disponibles. El gen humano que codifica PLA2G16 ha sido asignado con GeneID: 11145 en la base de datos de genes del centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov). Los genes que codifican PLA2G16 de ratón y rata han sido asignados con los siguientes Gene IDs: Gene ID: 225845 (*Mus musculus*); Gene ID: 24913 (*Rattus norvegicus*). Un experto en la materia será
50 fácilmente capaz de obtener las secuencias de ARNm de PLA2G16 y proteína a partir de estas y otras especies. Por ejemplo, los números de acceso para las secuencias de referencia de ARN de PLA2G16 humano y de proteínas disponibles en el NCBI son las siguientes: NM_001128203 (variante 2 de transcrito) y NP_001121675 (proteína). NM_007069.3 (variante 1 de transcrito) y NP_009000.2 (proteína). La variante 1 de transcrito representa el transcrito más largo. Las variantes 1 y 2 codifican la misma isoforma, pero se diferencian en la región no traducida (UTR) 5'.

55 PLA2G16 tiene actividad de fosfolipasa y actividad de lisofosfolipasa significativamente más baja, pero detectable (Duncan, RE, et al., J Biol Chem., 283(37):25428-36, 2008). Las proteínas PLEA₂ son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace *sn*-2 de fosfolípidos (Schaloske, RH y Dennis, EA, Biochim. Acta 1761, 1246-1259, 2006). Se mostró que PLA2G16 generaba el ácido graso libre y lisofosfolípido a partir de fosfatidilcolina, con una preferencia para la hidrólisis en la posición *sn*-2, sugiriendo que la proteína es una PLA₂ (Duncan, citado
60 anteriormente). Se encontró PLA2G16 en asociación con membranas intracelulares y tiene un dominio que abarca la supuesta membrana del extremo C cuya delección causó una pérdida de actividad. El análisis mutacional mostró que ciertos aminoácidos muy conservados, que incluyen His-23, Cys-113, Gln-129 y Asn-112, fueron esenciales para la catálisis, pero que la mutación de Asp-30 o His-80 a alanina no tuvo efecto. Así, parece que PLA2G16 contiene restos catalíticos activos de His y Cys en vez de una diada catalítica His/Asp o una tríada catalítica Ser/His/Asp
65 como se encuentra en algunas otras PLA₂s. Se encontró que el calcio activaba PLA2G16, pero no es esencial para la actividad. Como PLA2G16 no se ajusta claramente en ninguno de los 15 grupos principales previamente

identificados de PLA₂, se propuso que era el primer miembro de un grupo distinto de fosfolipasa A₂s dependiente de calcio (Grupo XVI) (Duncan, citado anteriormente).

5 PLA2G16 también se conoce en la técnica como la fosfolipasa de adipocito A2 (AdPLA) (Jaworski, K., et al. Nat Med., 15(2): 159-68, 2009). Es la principal PLA₂ en tejido adiposo y desempeña una función importante en la regulación de la lipólisis de adipocitos. Los ratones nulos para PLA2G16 fueron viables y tuvieron peso normal en el destete, pero ganaron peso más lentamente que los compañeros de camada no mutantes, a pesar de tener consumos de alimento equivalentes (Jaworski, K., citado anteriormente). Por análisis de patologías estándar, los ratones nulos para PLA2G16 no mostraron evidencia de ninguna anomalía macroscópica, microscópica o funcional, aparte de adiposidad reducida. No cambiaron el perfil de células sanguíneas ni los parámetros inmunológicos en suero y tejido adiposo en estos ratones en comparación con los ratones no mutantes. Estos resultados sugieren que es probable que los métodos de la presente divulgación que comprenden inhibir PLA2G16 con el fin de inhibir la infección viral sean bien tolerados en células aisladas y en sujetos de interés, por ejemplo, seres humanos y otros vertebrados.

15 En algunas realizaciones, un "polipéptido PLA2G16" es un polipéptido cuya secuencia comprende o consiste en la secuencia de un polipéptido PLA2G16 de un organismo pluricelular (por ejemplo, un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano, ratón, rata, bovino, etc.). Un polipéptido PLA2G16 que existe de forma natural o un polipéptido idéntico en secuencia a un polipéptido PLA2G16 que existe de forma natural se denomina un "polipéptido PLA2G16 nativo" o simplemente "PLA2G16" en el presente documento. Polipéptidos PLA2G16 nativos a modo de ejemplo se representan en la Figura 8 y con los números de acceso mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, un polipéptido PLA2G16 es una variante de PLA2G16 ("variante de PLA2G16"). Las variantes de PLA2G16 incluyen polipéptidos que se diferencian en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos con respecto a PLA2G16. Una adición puede ser una inserción dentro del polipéptido o una adición en el extremo N o C. En algunas realizaciones, el número de aminoácidos sustituido, delecionado o añadido puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, por ejemplo, aproximadamente 1 a 20, por ejemplo, aproximadamente 1 a 10, por ejemplo, aproximadamente 1 a 5, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, una variante de PLA2G16 comprende un polipéptido cuya secuencia es homóloga a la secuencia de PLA2G16 durante al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, o durante la longitud completa de PLA2G16 (pero no es idéntica en secuencia a PLA2G16 nativa). En algunas realizaciones, una variante de PLA2G16 comprende un polipéptido al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más idéntico a PLA2G16 (por ejemplo, de ser humano, ratón, rata, perro, vaca) durante al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de PLA2G16. En algunas realizaciones, una variante de PLA2G16 comprende un polipéptido al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntico a al menos los aminoácidos 23-113 de PLA2G16 humana o de ratón. En algunas realizaciones, un polipéptido PLA2G16 comprende un polipéptido al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntico a al menos los aminoácidos 23-129 de PLA2G16 humana o de ratón.

40 En algunas realizaciones, un polipéptido PLA2G16 comprende o consiste en un fragmento de PLA2G16. Un fragmento de PLA2G16 es un polipéptido que es más corto que PLA2G16 y es idéntico a PLA2G16 durante la longitud del polipéptido más corto. En algunas realizaciones, un fragmento de PLA2G16 es al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % tan largo como PLA2G16 nativa. En algunas realizaciones, un fragmento consiste en los aminoácidos 23-113 o 23-129 de PLA2G16 humana o de ratón. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos en el extremo C están delecionados. Por ejemplo, en algunas realizaciones al menos el dominio que abarca la membrana en el extremo C está delecionado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos los 30 aminoácidos del extremo C están delecionados. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos en el extremo N están delecionados.

50 En algunas realizaciones, un polipéptido PLA2G16 comprende una porción de polipéptido heterólogo. La porción heteróloga frecuentemente tiene una secuencia que no está presente en o es homóloga a PLA2G16 nativa. Una porción heteróloga puede tener, por ejemplo, entre 5 y aproximadamente 5.000 aminoácidos de longitud, o ser más larga. Frecuentemente tiene entre 5 y aproximadamente 1.000 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, una porción heteróloga comprende una secuencia que se encuentra en un polipéptido diferente, por ejemplo, un dominio funcional. En algunas realizaciones, una porción heteróloga comprende una secuencia útil para purificar, expresar, solubilizar y/o detectar el polipéptido. En algunas realizaciones, una porción heteróloga comprende una "marca" de polipéptido, por ejemplo, una marca de afinidad o marca de epítipo. Por ejemplo, la marca puede ser una marca de afinidad (por ejemplo, HA, TAP, Myc, 6XHis, Flag, GST), proteína fluorescente o luminiscente (por ejemplo, EGFP, ECFP, EYFP, Cerulean, DsRed, mCherry), marca potenciadora de la solubilidad (por ejemplo, una marca SUMO, marca NUS A, marca SNUT, o un mutante monomérico de la proteína Ocr de bacteriófago T7). Véase, por ejemplo, Esposito D y Chatterjee DK. Curr Opin Biotechnol.; 17(4):353-8 (2006). En algunas realizaciones, una marca puede servir para múltiples funciones. Una marca es frecuentemente relativamente pequeña, por ejemplo, que oscila de algunos aminoácidos hasta aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, una marca tiene más de 100 aminoácidos de longitud, por ejemplo, hasta aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, o más. En algunas realizaciones, un polipéptido PLA2G16 tiene una marca localizada en el extremo N o C, por ejemplo, como una fusión del extremo N o C. El polipéptido podría comprender múltiples marcas. En algunas realizaciones, están presentes una marca 6X His y una marca NUS, por ejemplo, en el extremo

N. En algunas realizaciones, una marca es escindible, de manera que puede eliminarse del polipéptido, por ejemplo, por una proteasa. En algunas realizaciones, esto se logra incluyendo una secuencia que codifica un sitio de escisión de proteasa entre la secuencia que codifica la porción homóloga a PLA2G16 y la marca. Proteasas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, trombina, proteasa TEV, factor Xa, proteasa PreScission, etc. En algunas realizaciones, se utiliza una marca "auto-escindible". Véase, por ejemplo, el documento PCT/US05/05763. Las secuencias que codifican una marca pueden estar localizadas 5' o 3' con respecto a un polinucleótido que codifica el polipéptido (o ambos). En algunas realizaciones, una marca u otra secuencia heteróloga se separa del resto del polipéptido por un conector polipeptídico. Por ejemplo, un conector puede ser un polipéptido corto (por ejemplo, 15-25 aminoácidos). Frecuentemente, un conector está compuesto por pequeños restos de aminoácidos tales como serina, glicina y/o alanina. Un dominio heterólogo comprendería un dominio transmembrana, un dominio de señal de secreción, etc.

En algunas realizaciones, una variante de PLA2G16 es una variante funcional, es decir, la variante conserva al menos en parte al menos una actividad biológica de PLA2G16. En algunas realizaciones, una variante funcional conserva actividad suficiente para ser distinguible de una proteína no homóloga o polipéptido PLA2G16 catalíticamente inactivo (por ejemplo, un polipéptido PLA2G16 que tiene una sustitución C113A) cuando se utiliza en un ensayo de la presente invención. En algunas realizaciones, la actividad es actividad de fosfolipasa A2, por ejemplo, como se mide por la capacidad para catalizar la hidrólisis del enlace *sn*-2 de fosfolípidos. En algunas realizaciones, la actividad es actividad de lisofosfolipasa. En algunas realizaciones, una variante de PLA2G16 conserva la capacidad de PLA2G16 nativa para servir de factor de célula huésped para un virus. Por ejemplo, la variante de PLA2G16 tiene actividad suficiente de manera que expresándola en una célula de vertebrado que es resistente a infección viral debido a que el gen PLA2G16 de la célula está inhabilitado (por ejemplo, por una inserción de trampa génica) convierte la célula en sensible a la infección viral. En algunas realizaciones, una variante de PLA2G16 funcional conserva al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de la actividad de PLA2G16, por ejemplo, actividad aproximadamente igual. En algunas realizaciones, una variante funcional puede tener mayor actividad que PLA2G16.

Un experto en la materia puede generar fácilmente variantes de PLA2G16 funcionales o fragmentos. Como se trata anteriormente, está disponible información considerable referente a PLA2G16, que incluye identificación de diversos restos importantes para la actividad y diversos restos que pueden alterarse sin disminuir significativamente la actividad, además de alineamientos con otros polipéptidos de PLA2 (véase, por ejemplo, Duncan, et al., citado anteriormente). En algunas realizaciones, una variante de PLA2G16 comprende una o más sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a PLA2G16. Pueden hacerse sustituciones conservativas basándose en la similitud en el tamaño de la cadena lateral, polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos implicados. Como se sabe en la técnica, es más probable que tales sustituciones, en general, produzcan una variante que conserve la actividad en comparación con sustituciones no conservativas. En una realización, los aminoácidos se clasifican del siguiente modo:

Especiales: C

Neutros y pequeños: A, G, P, S, T

Polares y relativamente pequeños: N, D, Q, E

Polares y relativamente grandes: R, H, K

No polares y relativamente pequeños: I, L, M, V

No polares y relativamente grandes: F, W, Y

Especiales: C

Véase, por ejemplo, Zhang, J. J. Mol. Evol. 50:56-68, 2000). En algunas realizaciones, se considera que la prolina (P) está en su propio grupo como un segundo aminoácido especial. Dentro de un grupo particular, ciertas sustituciones pueden ser de interés particular, por ejemplo, sustituciones de leucina por isoleucina (o viceversa), serina por treonina (o viceversa), o alanina por glicina (o viceversa). Por supuesto, las sustituciones no conservativas también son frecuentemente compatibles con la retención de función. En algunas realizaciones, una sustitución o delección no altera o deleciona un aminoácido importante para la actividad, por ejemplo, el aminoácido His-23, Cys-113, Gln-129 o Asn-112. En algunas realizaciones, una delección no elimina todo o una porción sustancial de los 36 aminoácidos del extremo C. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una delección no elimina el dominio transmembrana. En algunas realizaciones, una alteración es en un aminoácido que se diferencia entre PLA2G16 de diferentes especies. En algunas realizaciones, una sustitución altera un aminoácido al presente en una posición correspondiente en una especie diferente. En algunas realizaciones, una variante de PLA2G16 funcional comprende un polipéptido al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % idéntico a PLA2G16, por ejemplo, sobre al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % o el 100 % de la longitud completa de PLA2G16. En algunas realizaciones, una variante de PLA2G16 funcional comprende un polipéptido al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % idéntico a PLA2G16, por ejemplo, sobre al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % o el 100 % de la longitud completa de PLA2G16, y comprende una marca en el extremo N y/o extremo C. Para evaluar su actividad, podrían ensayarse variantes de PLA2G16 en ensayos acelulares y/o en ensayos basados en células.

En algunas realizaciones, una variante o fragmento de PLA2G16 que tiene actividad sustancialmente reducida en comparación con la actividad de PLA2G16 nativa (por ejemplo, menos del 10 % de la actividad de PLA2G16 nativa) es útil como inhibidor de PLA2G16 o compuesto antiviral. Por ejemplo, tal polipéptido podría interferir con la función de PLA2G16 nativa en la infección viral, por ejemplo, compitiendo con PLA2G16 nativa. En algunas realizaciones, una variante o fragmento de PLA2G16 que tiene actividad sustancialmente reducida en comparación con la actividad de PLA2G16 nativa es útil como control o como inmunógeno o para estudios de cristalización o de unión.

Un polipéptido PLA2G16, por ejemplo, un polipéptido PLA2G16 nativo o una variante de PLA2G16 puede producirse utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales. Un ácido nucleico que codifica PLA2G16 puede obtenerse fácilmente, por ejemplo, a partir de células que expresan PLA2G16 (por ejemplo, por PCR u otros métodos de amplificación o clonando) o por síntesis basadas en una secuencia de ADNc o de polipéptidos PLA2G16. Un experto en la materia sabría que debido a la degeneración del código genético, numerosas secuencias de ácidos nucleicos diferentes codificarían el polipéptido deseado. Opcionalmente, una secuencia está optimizada en los codones para la expresión en una célula huésped de elección. Puede generarse fácilmente un nucleico que codifica una variante de PLA2G16, por ejemplo, modificando PLA2G16 nativa utilizando, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, o por otros métodos convencionales.

Un ácido nucleico que codifica el polipéptido deseado, operativamente unido a elementos de control de la expresión apropiados, normalmente en un vector tal como un plásmido o virus (por ejemplo, como parte del genoma viral), se introduce en células procariotas o eucariotas. En otras realizaciones, un polipéptido PLA2G16 se produce utilizando traducción *in vitro*. Células a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*), células de insecto, células de mamífero, células vegetales, células fúngicas (por ejemplo, levadura). Un experto en la materia conocerá elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, promotores). Los promotores pueden ser constitutivos o regulables, por ejemplo, inducibles o represibles. Promotores adecuados a modo de ejemplo para su uso en células bacterianas incluyen, por ejemplo, Lac, Trp, Tac, araBAD (por ejemplo, en un vector pBAD), promotores de fago tales como T7 o T3. Secuencias de control de la expresión a modo de ejemplo útiles para dirigir la expresión en células de mamífero incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío del SV40, promotor temprano inmediato del adenovirus o del citomegalovirus, o secuencias de promotor / potenciador viral, LTRs retrovirales, promotores o promotor/potenciadores de genes de mamífero, por ejemplo, actina, EF-1 alfa, metalotioneína, etc. El promotor de la polihedrina del sistema de baculovirus es de uso para expresar proteínas en células de insecto. Un experto en la materia conocerá numerosos vectores de expresión que contienen elemento(s) de control de la expresión, marcadores de selección, sitios de clonación, apropiados etc., y pueden utilizarse convenientemente para expresar un polipéptido de interés. Opcionalmente, tales vectores incluyen secuencias que codifican una marca, para permitir la producción conveniente de un polipéptido que comprende una marca. Métodos adecuados para introducir vectores en células de bacteria, levadura, planta o de animal (por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación, etc.), y, si se desea, seleccionar células que han captado el vector y que derivan de líneas celulares estables. Podrían producirse animales transgénicos o plantas que expresan el polipéptido utilizando métodos conocidos en la técnica.

Para producir un polipéptido PLA2G16, las células se mantienen en cultivo durante un periodo de tiempo adecuado, y el polipéptido se aísla y purifica opcionalmente adicionalmente (por supuesto, un polipéptido PLA2G16 también podría aislarse de células o tejidos obtenidos directamente de un organismo que lo expresa). Pueden usarse técnicas de aislamiento/purificación de proteínas estándar. En algunas realizaciones, se utilizan métodos basados en afinidad. Por ejemplo, puede emplearse un anticuerpo para PLA2G16. En el caso de polipéptidos PLA2G16 marcados, puede seleccionarse un método de aislamiento apropiado dependiendo de la marca particular usada.

V. Composiciones y métodos de inhibición de PLA2G16

El término "inhibidor de PLA2G16" se refiere a un compuesto que inhibe la expresión de PLA2G16 y/o inhibe una o más actividades de PLA2G16. Por ejemplo, un compuesto es "inhibidor de PLA2G16" si una o más actividades de PLA2G16 se reducen en presencia del compuesto en comparación con su ausencia y/o si el nivel o cantidad de proteína PLA2G16 o producto génico se reducen en presencia del compuesto en comparación con su ausencia. En ciertas realizaciones, los inhibidores de PLA2G16 actúan directamente sobre PLA2G16 en el sentido en que interactúan físicamente con PLA2G16. En otras realizaciones, los inhibidores actúan indirectamente sobre PLA2G16. Un inhibidor de PLA2G16 puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, ácido nucleico, oligonucleótido, polipéptido, péptido, lípido, fosfolípido, etc. En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 es un agente de iARN, oligonucleótido antisentido, aptámero o anticuerpo. En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 es una molécula pequeña.

La divulgación proporciona varios métodos diferentes de inhibición de PLA2G16. Como se usa en el presente documento, métodos de inhibición de PLA2G16 engloba métodos que producen una cantidad reducida de polipéptido PLA2G16 y métodos que interfieren con la función molecular de PLA2G16. En algunas realizaciones, PLA2G16 se inhibe inhibiendo o interfiriendo con la expresión de PLA2G16, de manera que se produzca una cantidad reducida de polipéptido PLA2G16. Como se usa en el presente documento, "expresión" engloba los procesos celulares implicados en la producción de un polipéptido e incluyen transcripción, procesamiento de ARNm y transporte (en el caso de células eucariotas), y traducción de ARNm. Pueden aplicarse una variedad de métodos

útiles para inhibir o interferir con la expresión en realizaciones de la presente divulgación. En general, tales métodos producen una reducción de la síntesis de polipéptido PLA2G16 y, como resultado, una reducción del nivel total de actividad funcional molecular de PLA2G16 presente.

5 En algunas realizaciones, la expresión de PLA2G16 se inhibe utilizando interferencia por ARN (iARN). Secuencias a modo de ejemplo para agentes de ARN (por ejemplo, ARNip) que inhiben la expresión de PLA2G16 se proporcionan en los ejemplos. Pueden seleccionarse secuencias adicionales utilizando diversos enfoques conocidos en la técnica que incluyen. Si se desea, tales secuencias pueden seleccionarse para minimizar los efectos "inespecíficos". En algunas realizaciones, se utiliza modificación química específica de posición para reducir los posibles efectos inespecíficos. En algunas realizaciones, se utilizan al menos dos ARNip diferentes dirigidos al gen PLA2G16 (por ejemplo, en combinación). La iARN se utiliza en el presente documento para una variedad de fines. Por ejemplo, puede usarse un agente de iARN como inhibidor de PLA2G16, por ejemplo, para fines terapéuticos o de investigación. Un agente de iARN que inhibe PLA2G16 puede ser útil para confirmar que el efecto de un segundo compuesto, por ejemplo, una molécula pequeña, es debido a un efecto sobre PLA2G16 (en vez de sobre otra proteína). Por ejemplo, puede esperarse que una molécula pequeña que es un supuesto inhibidor de PLA2G16 específico no tenga un efecto en una célula en la que la expresión de PLA2G16 se inhibe por iARN. En otros aspectos, se utiliza iARN para inhibir la expresión de una PLA2 distinta de PLA2G16, que puede ser expresada por una célula. El inhibir otras enzimas PLA2 puede facilitar la identificación de compuestos que inhiben PLA2G16.

20 En algunas realizaciones de la divulgación, la expresión de PLA2G16 se inhibe utilizando un enfoque antisentido en el que uno o más oligonucleótidos complementarios a ARNm que codifica PLA2G16 se administran a células y se hibridan con el ARNm de PLA2G16, produciendo, por ejemplo, la degradación del ARNm por RNasa H o el bloqueo de la traducción por impedimento estérico.

25 En algunas realizaciones de la divulgación, un inhibidor de PLA2G16 inhibe al menos una función molecular de PLA2G16. En algunas realizaciones, la función molecular es una actividad catalítica, por ejemplo, actividad de fosfolipasa y/o actividad de lisofosfolipasa. Por ejemplo, la actividad puede ser actividad de fosfolipasa A2, es decir, la capacidad para catalizar la hidrólisis del enlace sn-2 de fosfolípidos. En algunas realizaciones, un compuesto inhibe directamente una función molecular de PLA2G16. "Inhibición directa" se refiere a una interacción física (unión) con una diana que inhibe una función molecular de la diana. Por ejemplo, la unión de un inhibidor de PLA2G16 a PLA2G16 puede interferir con la capacidad de la enzima para catalizar una reacción y/o prevenir que un sustrato entre en el sitio activo. Puede usarse una variedad de compuestos para inhibir directamente la función molecular de PLA2G16. Compuestos a modo de ejemplo que inhiben directamente PLA2G16 puede ser, por ejemplo, moléculas pequeñas, anticuerpos o aptámeros. En algunas realizaciones, un inhibidor directo es un análogo de sustrato (por ejemplo, un análogo de fosfolípido) o un análogo del estado de transición.

En algunas realizaciones, un inhibidor es un inhibidor irreversible. La mayoría de los inhibidores enzimáticos irreversibles reaccionan con la enzima y la cambian químicamente, tal como modificando el (los) resto(s) de aminoácido que se necesitan para la actividad enzimática. Por ejemplo, un inhibidor irreversible puede comprender uno o más grupos funcionales reactivos tales como un aldehído, haloalcano, alqueno, fluorofosfonato (por ejemplo, fluorofosfonato de alquilo), aceptor de Michael, sulfonato de metilo, metilcetona, por ejemplo, una metilcetona halogenada o diazometilcetona, fluorofosfonato, éster vinílico, vinilsulfona o vinilsulfonamida. En algunas realizaciones, un inhibidor irreversible de PLA2G16 comprende un grupo electrófilo que reacciona con una cadena lateral de aminoácido de PLA2G16. Por ejemplo, el grupo electrófilo puede reaccionar con una cadena lateral de aminoácido que contiene un nucleófilo tal como un grupo hidroxilo o sulfhidrilo. Por ejemplo, el aminoácido puede ser cisteína, serina o treonina. En otra realización, un inhibidor irreversible reacciona con una histidina. Pueden usarse en diversas realizaciones restos algunas veces referidos en la materia como "trampas de cisteína". En algunas realizaciones un resto reactivo con cisteína es una maleimida, isotiazolinona, tetrazol, lactama o carbamato. Un grupo funcional reactivo puede incorporarse en un análogo de sustrato u otra molécula compatible con la unión a la enzima, por ejemplo, en o cerca del sitio activo.

En otras realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 es un inhibidor reversible. Los inhibidores reversibles se unen no covalentemente y pueden unirse a la enzima, el complejo enzima-sustrato, o ambos. La inhibición por un inhibidor reversible puede clasificarse como inhibición competitiva, inhibición acompetitiva, inhibición mixta, inhibición no competitiva. Véase, por ejemplo, Berg J.M, et al., *Biochemistry*, 6^a ed., W. H. Freeman and Company, 2007. En algunas realizaciones, un inhibidor reversible se une al sitio activo de PLA2G16 y/o compite con el (los) sustrato(s) por el acceso al sitio activo de PLA2G16. En algunas realizaciones, un inhibidor reversible es un análogo de sustrato no hidrolizable.

60 En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 es un análogo de un ácido graso, en el que el análogo comprende una cadena de alquilo entre 4 y aproximadamente 30 carbonos de largo, por ejemplo, entre 12 y 20 carbonos de largo. En algunas realizaciones, el grupo alquilo está saturado. En algunas realizaciones, el grupo alquilo está insaturado. En algunas realizaciones, el grupo alquilo está sin ramificar. En algunas realizaciones, el grupo alquilo tiene la estructura de un grupo alquilo naturalmente encontrado en un ácido graso presente en células de vertebrado. Ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúxico,

ácido docosahexaenoico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido eicosanoico. En algunas realizaciones, el inhibidor de PLA2G16 es un análogo de ácido araquidónico o ácido linoleico. En algunas realizaciones, el análogo es un ácido graso metilado. En algunas realizaciones, el análogo de ácido araquidónico es un ácido eicosadienoico, tal como el ácido 7,7-dimetil-5,8-eicosadienoico.

5 En algunas realizaciones, el inhibidor comprende un análogo de un ácido graso, en el que el análogo comprende un grupo funcional reactivo. En algunas realizaciones, el análogo de ácido graso comprende un grupo metilcetona halogenado en lugar de un grupo carboxilo. Por ejemplo, el halógeno puede ser cloro, flúor, bromo o yodo en
10 diversas realizaciones. En algunas realizaciones, el grupo metilcetona halogenado es fluorometilcetona, trifluorometilcetona o clorometilcetona. En algunas realizaciones, el ácido graso es ácido araquidónico. En una
15 realización, el inhibidor es un análogo de trifluorometilcetona de ácido araquidónico en el que el grupo COOH se sustituye por COCF₃, es decir, el compuesto araquidonitruflorometilcetona (AACOCF₃). AACOCF₃ inhibe PLA2G16 y también inhibe cPLA₂ y sPLA₂ (Duncan, citado anteriormente). Se cree que AACOCF₃ se une en un
20 bolsillo hidrófobo de cPLA₂, y que el grupo carbonilo de AACOCF₃ forma un enlace covalente con la serina 228 en el sitio activo (Street et al., 1993; Trimble et al., 1993). Sin desear ceñirse a teoría alguna, AACOCF₃ puede reaccionar con la serina del sitio activo de PLA2G16. En otra realización, el inhibidor de PLA2G16 es metilaraquidonitruflorofosfato (MAFP) o un análogo del mismo (véase, por ejemplo, Martin, BR, et al., J. Pharm. Exp. Ther., 294 (3), 294:1209-1218, 2000). Se cree que MAFP inhibe la serina y cisteína hidrolasas uniéndose
25 covalentemente a la enzima. Inhibe PLA2G16, además de iPLA2 y cPLA2, pero no sPLA2 (Duncan, citado anteriormente). Sin desear ligarse a teoría alguna, PLA2G16 puede requerir un resto de cisteína activo (es decir, Cys-113) que se inactiva por MAFP.

Se han identificado una variedad de otros compuestos que inhiben una o más PLA2s del Grupo I-XV. Por ejemplo, la
25 publicación de patente de EE.UU. N.º 20080319065 desvela compuestos que contienen una 2-oxoamida con una cola de hidrocarburo y un conector de cuatro carbonos y se informa que inhibe PLA2, PLA2 del Grupo IVA c y/o iPLA2 del Grupo VIA y/o sPLA2 del Grupo V. Las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20030144282 y 20100029645 desvelan inhibidores de diversas enzimas PLA2. Otros compuestos que inhiben una o más enzimas
30 PLA2 incluyen piperazinas (véase, por ejemplo, el documento WO2003048139); compuestos de pirimidona, piridona, piridinona y pirimidina (véanse, por ejemplo, los documentos WO2002030904; WO 2001060805; WO 2000027824; WO 2003087088; WO 2003086400; WO 2003/042218; WO2003042206; WO2002030911; WO2003041712),
35 derivados de pirrolidina (véase, por ejemplo, el documento WO1998033797). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, al menos algunos de los compuestos que inhiben una o más enzimas PLA2 del Grupo I-XV también pueden inhibir PLA2G16. En algunas realizaciones, el principal mecanismo de acción contra tales otras PLA₂ del Grupo I-XV no implica específicamente la unión a un motivo de secuencia que está presente en tal otra PLA2, sino que está ausente en PLA2G16. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto no es aquel cuyo mecanismo principal
40 de acción implique la unión a un motivo consenso GX SXG o un motivo CCXXHDXC.

En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 comprende un péptido, por ejemplo, un péptido identificado
45 utilizando una técnica de presentación, tal como presentación en fagos o presentación en ribosomas. En algunas realizaciones, un péptido comprende uno o más aminoácidos no estándar. En algunas realizaciones, un péptido es cíclico. Por ejemplo, el péptido puede ciclarse mediante un enlace disulfuro o enlace covalente, por ejemplo, entre los aminoácidos del extremo N y C, entre el aminoácido del extremo N o C y un aminoácido interno, o entre dos aminoácidos internos.

50 En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 comprende un aptámero. En general, un aptámero es un oligonucleótido frecuentemente monocatenario (por ejemplo, ADN o ARN, que opcionalmente contiene uno o más nucleótidos no estándar o modificaciones tales como nucleótidos 2'-flúor, 2'-amino y/o 2'-metoxi) que se une a una molécula de interés particular. Los aptámeros normalmente derivan de un proceso de evolución y selección *in vitro* tal como SELEX. En la técnica se conocen métodos de obtención de aptámeros específicos para una proteína de interés. Véase, por ejemplo, Brody EN, Gold L. J Biotechnol., 74(1):5-13, 2000.

En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 comprende un anticuerpo o porción del mismo. En algunas
55 realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario, un diacuerpo, un triacuerpo o un minicuerpo. Para producir un anticuerpo pueden usarse métodos convencionales de producción de anticuerpos conocidos en la técnica, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, que se une a PLA2G16. En algunas realizaciones, un animal, por ejemplo, un ratón o un conejo se inmuniza con PLA2G16 o con una porción del mismo, se aíslan células productoras de anticuerpo, y utilizando tecnología de hibridomas se identifica un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el ratón es un ratón transgénico que comprende al menos algunas secuencias de genes no reordenadas de la inmunoglobulina humana y que tienen preferentemente una alteración elegida como diana de
60 secuencias murinas de la cadena pesada y ligera endógena. En algunas realizaciones, un anticuerpo se identifica o produce utilizando tecnología recombinante de ácidos nucleicos (por ejemplo, presentación en fagos o en levaduras). Véase, por ejemplo, Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. Curr Opin Immunol. 20(4):450-9, 2008.

65 En algunas realizaciones de la divulgación, un compuesto inhibe indirectamente PLA2G16. "Inhibición indirecta" se refiere a la inhibición de una diana (por ejemplo, PLA2G16) por un mecanismo que no requiere interacción física

entre el compuesto y la diana. Por ejemplo, el compuesto podría inhibir la expresión o actividad de un polipéptido que participa en la localización o modificación postraducciona de PLA2G16, en el que tal localización o modificación postraducciona es importante para la función molecular de PLA2G16.

- 5 En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 no es un compuesto que sea conocido o sugerido en la materia por tener actividad antiviral y/o por ser útil en el tratamiento de un sujeto en necesidad de tratamiento para una infección viral. En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 es un compuesto que es conocido o sugerido en la materia por tener actividad antiviral y/o por ser útil en el tratamiento de un sujeto en necesidad de tratamiento para una infección viral pero, opcionalmente, puede administrarse o usarse de otro modo en la presente divulgación
- 10 (i) para inhibir la infección por un virus diferente, por ejemplo, un virus contra el que no se sabe o sugiere que el compuesto tenga actividad antiviral; (ii) en una forma diferente (por ejemplo, más altamente purificada), en una cantidad o composición diferente, o en combinación con una o más sustancias diferentes; (iii) por una vía diferente o a un sujeto de una especie diferente; y/o (iv) explícitamente excluida de una cualquiera o más de las composiciones y/o métodos desvelados.

15

VI. Composiciones y métodos de identificación y/o compuestos de ensayo

La invención como se define en las reivindicaciones proporciona métodos de identificación de compuestos útiles para inhibir la infección viral y ensayar sistemas para realizar los métodos inventivos. En algunos aspectos, la invención proporciona un método de determinación de si un compuesto de ensayo es un compuesto antiviral candidato, comprendiendo el método la etapa determinar si el compuesto de ensayo inhibe el polipéptido PLA2G16, en el que si el compuesto inhibe PLA2G16, el compuesto es un compuesto antiviral candidato. En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método de identificación de un compuesto antiviral candidato que comprende las etapas de: (a) proporcionar un compuesto de ensayo; (b) determinar si el compuesto de ensayo inhibe PLA2G16, en el que si el compuesto inhibe PLA2G16, el compuesto es un compuesto antiviral candidato.

25

En algunas realizaciones, el método comprende determinar si el compuesto de ensayo inhibe la expresión de PLA2G16, en el que si el compuesto inhibe la expresión de PLA2G16 el compuesto es un compuesto antiviral candidato. En algunas realizaciones, el método comprende determinar si el compuesto inhibe una función molecular de PLA2G16, en el que si el compuesto inhibe una función molecular de PLA2G16 el compuesto es un compuesto antiviral candidato. En algunas realizaciones, la función molecular es una actividad enzimática, por ejemplo, actividad de fosfolipasa A2 o actividad de lisofosfolipasa.

30

En algunas realizaciones, se realiza un método utilizando un polipéptido PLA2G16 idéntico en secuencia a PLA2G16 que se expresa naturalmente por un organismo pluricelular, es decir, una PLA2G16 nativa. En algunas realizaciones, se realiza un método utilizando una variante de PLA2G16 funcional. En algunas realizaciones, la variante funcional usada en un ensayo inventivo conserva al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más de la actividad de fosfolipasa A2 de PLA2G16. En algunas realizaciones, una variante funcional conserva al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más de la actividad de lisofosfolipasa de PLA2G16. En algunas realizaciones, la variante funcional conserva al menos el 50 % o al menos el 75 % o tiene aproximadamente la misma actividad de fosfolipasa A2 y/o actividad de lisofosfolipasa que PLA2G16 nativa. Una variante de PLA2G16 puede tener propiedades que la hacen conveniente para su uso en un método de cribado inventivo, tal como la presencia de una marca que facilita la producción o purificación de la proteína. Un compuesto identificado como un inhibidor utilizando una variante de PLA2G16 puede ensayarse adicionalmente utilizando PLA2G16 nativa para confirmar su capacidad para inhibir el polipéptido nativo.

35

40

En los métodos inventivos puede usarse una amplia variedad de compuestos de ensayo. Por ejemplo, un compuesto de ensayo puede ser una molécula pequeña, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, un oligonucleótido, un lípido, un hidrato de carbono o una molécula híbrida. Los compuestos pueden obtenerse de fuentes naturales o pueden producirse sintéticamente. Los compuestos pueden ser al menos parcialmente puros o pueden estar presentes en extractos u otros tipos de mezclas. Los extractos o fracciones de los mismos pueden producirse a partir de, por ejemplo, plantas, animales, microorganismos, organismos marinos, caldos de fermentación (por ejemplo, caldos de fermentación de tierra, bacterianos o fúngicos), etc. En algunas realizaciones, se ensaya una colección de compuestos ("biblioteca"). La biblioteca puede comprender, por ejemplo, entre 100 y 500.000 compuestos, o más. Los compuestos se presentan frecuentemente en placas multipocillo y pueden disolverse en un disolvente (por ejemplo, DMSO) o proporcionarse en forma deshidratada, por ejemplo, como un polvo o sólido. Pueden ensayarse colecciones de compuestos sintéticos, semi-sintéticos y/o que existen de forma natural. Las bibliotecas de compuestos pueden comprender compuestos estructuralmente relacionados, estructuralmente diversos, o estructuralmente no relacionados. Los compuestos pueden ser artificiales (que tienen una estructura inventada por el hombre y no encontrada en la naturaleza) o existir de forma natural. En algunas realizaciones, una biblioteca comprende al menos algunos compuestos que se han identificado como "aciertos" o "cabezas de serie" en otros programas de descubrimiento de fármacos y/o derivados de los mismos. Una biblioteca de compuestos puede comprender productos naturales y/o compuestos generados utilizando química orgánica sintética no dirigida o dirigida. Frecuentemente, una biblioteca de compuestos es una biblioteca de moléculas pequeñas. Otras bibliotecas de interés incluyen bibliotecas de péptidos (peptidotecas) o de peptoides, bibliotecas de ADNc y bibliotecas de oligonucleótidos.

55

60

65

Una biblioteca puede estar enfocada (por ejemplo, puede estar compuesta principalmente de compuestos que tienen la misma estructura de núcleo, derivados del mismo precursor, o que tienen al menos una actividad bioquímica en común). En algunas realizaciones, se ensayan compuestos que se han identificado como inhibidores de una o más enzimas PLA2 del Grupo I-XV. En algunas realizaciones, la CI_{50} de un compuesto identificado como inhibidor de PLA2G16 puede ser aproximadamente 2, 5, 10, 20, 50, 100, 250, 500 o 1000 veces más baja para PLA2G16 frente a una o varias de otras enzimas PLA2 (por ejemplo, una, más de una, o todas las otras enzimas PLA2 presentes en seres humanos y conocidas hasta ahora).

Se dispone de bibliotecas de compuestos de diversos proveedores comerciales tales como Tocris BioScience, Nanosyn, BioFocus, y de entidades gubernamentales. Por ejemplo, el Molecular Libraries Small Molecule Repository (MLSMR), un componente del Programa de Bibliotecas Moleculares de los Institutos Nacionales Estadounidenses de Salud (NIH), está diseñado para identificar, adquirir, mantener y distribuir una colección de >300.000 compuestos químicamente diversos con actividades biológicas conocidas y desconocidas para su uso, por ejemplo, en ensayo de cribado de alto rendimiento (HTS) (véase <https://mli.nih.gov/mli/>). La Colección Clínica de NIH (NCC) es una matriz en placa de aproximadamente 450 moléculas pequeñas que tienen una historia de uso en ensayos clínicos humanos. Estos compuestos son muy similares a fármacos con perfiles de seguridad conocidos. La colección de NCC se presenta en seis placas de 96 pocillos. Se suministran 50 μ l de cada compuesto, como una solución aproximadamente 10 mM en 100 % de DMSO. En algunas realizaciones, se prueba una colección de compuestos que comprende "fármacos humanos autorizados". Un "fármaco humano autorizado" es un compuesto que ha sido autorizado en el tratamiento de seres humanos por una agencia reguladora gubernamental tal como la Agencia estadounidense de Medicamento, Agencia europea de Evaluación de Medicamentos, o una agencia similar responsable de evaluar al menos la seguridad de agentes terapéuticos antes de permitir que sean comercializados. El compuesto de ensayo puede ser, por ejemplo, un fármaco antineoplásico, antibacteriano, antiviral, antifúngico, antiprotozoico, antiparasítico, antidepresivo, antipsicótico, anestésico, antianginoso, antihipertensor, antiarrítmico, antiinflamatorio, analgésico, antitrombótico, antiemético, inmunomodulador, antidiabético, hipolipemiente o hipocolesterolémante (por ejemplo, estatina), anticonvulsivo, anticoagulante, ansiolítico, hipnótico (inductor del sueño), hormonal o antihormonal, etc. En algunas realizaciones, un compuesto es uno que ha experimentado al menos algún desarrollo preclínico o clínico o se ha determinado o predicho que tiene propiedades "similares a fármaco". Por ejemplo, el compuesto de ensayo puede haber completado un ensayo clínico de fase I o al menos un estudio preclínico en animales no humanos y haber mostrado pruebas de seguridad y tolerabilidad. En algunas realizaciones, un compuesto de ensayo es sustancialmente no tóxico para las células de un organismo a las que el compuesto puede administrarse o células en las que el compuesto puede ensayarse, a la concentración que va a usarse o, en algunas realizaciones, a concentraciones hasta 10 veces, 100 veces o 1.000 veces superiores a la concentración que va a usarse. Por ejemplo, puede no tener efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad y/o proliferación celular, o la reducción en la viabilidad o proliferación puede ser no superior al 1 %, 5 % o 10 % en diversas realizaciones. La citotoxicidad y/o el efecto sobre la proliferación celular pueden evaluarse utilizando cualquiera de una variedad de ensayos (algunos de los cuales se han mencionado anteriormente). En algunas realizaciones, un compuesto de ensayo no es un compuesto que se encuentre en un medio de cultivo celular conocido o usado en la materia, por ejemplo, medio de cultivo adecuado para cultivar células de vertebrado, por ejemplo, de mamífero o, si el compuesto de ensayo es un compuesto que se encuentra en un medio de cultivo celular conocido o usado en la materia, el compuesto de ensayo se utiliza a una concentración diferente, por ejemplo, más alta, cuando se utiliza en un método de la presente invención.

En algunas realizaciones, un compuesto de ensayo es un compuesto que es reconocido en la materia por tener actividad antiviral contra uno o más virus, pero que no se sabe que es útil para inhibir la infección por un virus de interés, por ejemplo, un picornavirus. En algunas realizaciones, un compuesto de ensayo no es un compuesto que sea reconocido en la materia por tener actividad antiviral.

En algunas realizaciones, se prueban uno o más compuestos o mezclas de los mismos que tienen actividad antiviral conocida, en las que la diana molecular del compuesto o mezcla y/o mecanismo de actividad antiviral es desconocida. La prueba de tales compuestos o mezclas según la presente invención para determinar si inhiben PLA2G16 puede conducir a descubrir que PLA2G16 es la diana molecular. Tal descubrimiento puede facilitar la purificación de un componente activo de una mezcla, desarrollo de derivados más altamente activos del compuesto, y/o permitir de otro modo el desarrollo adicional del compuesto o mezcla como agente terapéutico.

La etapa de determinar si un compuesto de ensayo inhibe la expresión de PLA2G16 puede llevarse a cabo de diversas maneras. Los compuestos que inhiben la expresión de PLA2G16 pueden identificarse poniendo en contacto células con un compuesto de ensayo, manteniendo las células en cultivo durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, un tiempo suficiente para permitir la degradación de ARNm de PLA2G16 y/o proteína existente), y después midiendo el nivel de ARNm de PLA2G16 o de proteína. Para medir ARNm o proteínas pueden usarse métodos conocidos en la técnica. Se dispone de diversos métodos diferentes basados en hibridación o basados en amplificación para medir ARN. Como ejemplos se incluyen, transferencias Northern, micromatriz (por ejemplo, micromatriz de oligonucleótidos o ADNc), (RT)-PCR con transcripción inversa (por ejemplo, RT-PCR cuantitativa), o transcripción inversa seguido de secuenciación. El ensayo TaqMan® y el ensayo de PCR SYBR® Green son técnicas de PCR en tiempo real comúnmente usadas. Otros ensayos incluyen RT-PCR™ normalizada (Sta) (Gene Express, Inc., Toledo, OH) y QuantiGene® (Panomics, Inc., Fremont, CA). En algunas realizaciones, se mide el nivel

de ARNm de PLA2G16. En otras realizaciones se utiliza un sistema basado en indicador. En algunas realizaciones, un sistema basado en indicador comprende un ácido nucleico en el que los elementos de control de la expresión del gen PLA2G16 están operativamente unidos a una secuencia que codifica una molécula indicadora ("indicador"). Los indicadores son frecuentemente proteínas, pero podrían ser ácidos nucleicos. Los indicadores son moléculas frecuentemente fácilmente detectables, tales como proteínas que producen una señal fluorescente, luminiscente o colorimétrica, o son capaces de absorber luz de una longitud de onda particular. En algunas realizaciones, una molécula indicadora comprende una enzima que actúa sobre un sustrato para producir una señal fluorescente, luminiscente o colorimétrica. Moléculas indicadoras a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, proteínas fluorescentes verde, azul, zafiro, amarilla, roja, naranja y cian, y derivados de las mismas; proteína fluorescente roja monomérica y derivados tales como aquellos conocidos como "mFruits", por ejemplo, mCherry, mStrawberry, mTomato; luciferasa; beta-galactosidasa; peroxidasa de rábano picante; fosfatasa alcalina; etc. En algunas realizaciones, un indicador es una proteína secretada. En algunas realizaciones, un indicador está codificado por una secuencia que está optimizada en los codones para la expresión en una célula de un organismo de interés. Métodos para la evaluación de la eficacia de un agente de iARN para silenciar la expresión de un gen diana pueden implicar el uso de una secuencia en la que el ARNm diana de un ARNhp o ARNip (o una porción de la diana) se clona en la dirección 3' de una secuencia que codifica un indicador, de manera que se produce un transcrito de ARNm bicistrónico que codifica tanto la secuencia diana como el indicador. La inactivación del gen diana produce la degradación (o inhibición traduccional) del transcrito de ARNm, que produce una disminución proporcional en la expresión de la proteína indicadora.

Los compuestos que inhiben la función molecular de PLA2G16 pueden identificarse utilizando una variedad de diferentes ensayos acelulares o basados en células. Un ensayo acelular normalmente implica una molécula diana aislada. Por ejemplo, la molécula diana podría estar presente en un lisado de células o de tejido o fracción del mismo (por ejemplo, un lisado hecho de células que expresan la molécula diana) o podría ser una molécula diana al menos parcialmente purificada o sintetizada. Un lisado de tejido podría prepararse a partir de cualquier tejido que contuviera células que expresan PLA2G16. En algunas realizaciones, un lisado de tejido se obtiene a partir de tejido adiposo, por ejemplo, tejido adiposo blanco. Diversas células de las que un lisado celular podrían prepararse o a partir de las que podría purificarse un polipéptido PLA2G16 se mencionan más adelante en la discusión de ensayos basados en células. En algunas realizaciones, un polipéptido aislado es un polipéptido que ha sido sintetizado utilizando técnicas de ácido nucleico recombinantes o traducción *in vitro*. Con el fin de realizar el ensayo, un compuesto de ensayo se pone en contacto con la molécula diana, por ejemplo, preparando una composición que comprende el compuesto de ensayo y la molécula diana. Se miden uno o más parámetros, por ejemplo, unión, actividad enzimática, etc. La composición puede comprender otro(s) componente(s) necesario(s) o útil(es) para identificar un compuesto de interés. En algunas realizaciones, una composición para su uso en un ensayo de unión o ensayo de actividad comprende membranas celulares o componentes de la membrana celular. Tales membranas o componentes pueden existir de forma natural (por ejemplo, componentes presentes en la célula de membranas animales), artificial, o combinación de los mismos en diversas realizaciones. Por ejemplo, la composición puede contener una bicapa de membrana lipídica, vesículas de lípidos, etc. Opcionalmente, una bicapa lipídica se inmoviliza sobre una superficie. En algunas realizaciones, los lípidos comprenden fosfolípidos.

Para identificar compuestos que inhiben un polipéptido PLA2G16 puede realizarse una variedad de ensayos acelulares. En algunas realizaciones, un ensayo detecta si un compuesto de ensayo se une a un polipéptido PLA2G16 y/o cuantifica una o más características de tal unión. Se conocen numerosos formatos de ensayos de unión en la técnica. En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo sin marca, mientras que en otras realizaciones tanto el polipéptido PLA2G16 como el compuesto de ensayo marcados de manera detectable. En algunas realizaciones, un polipéptido PLA2G16 o un compuesto que va a ensayarse con respecto a la capacidad para unirse a y/o inhibir la actividad de un polipéptido PLA2G16 está unido a un soporte sólido. En algunas realizaciones, un soporte sólido es un artículo que tiene una superficie rígida o semi-rígida. En algunas realizaciones, al menos una superficie del soporte es sustancialmente plana. En otras realizaciones, un soporte es aproximadamente esférico. Un soporte puede estar compuesto de un material inorgánico u orgánico o combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un soporte está compuesto al menos en parte de un metal, cerámica, vidrio, plástico, gel, u otra matriz. Tales artículos pueden, por ejemplo, tomar la forma de placas (por ejemplo, placas multipocillo), portaobjetos, partículas (por ejemplo, "perlas", por ejemplo, perlas magnéticas), pellas, barras, varillas, agujas, discos, chips, filtros, u otra forma adecuada. En algunas realizaciones, un soporte comprende un sensor, por ejemplo, un sensor capaz de detectar cambios en la unión. Por ejemplo, el sensor podría detectar un cambio en el peso o una señal tal como la fluorescencia. En algunas realizaciones, el soporte comprende un electrodo. En algunas realizaciones, los compuestos están dispuestos como una micromatriz de moléculas pequeñas. Los compuestos podrían estar presentes en múltiples localizaciones sobre una superficie, en pocillos individuales o recipientes, etc. Véase, por ejemplo, Vegas AJ, et al., Chem Soc Rev. 37(7): 1385-94, 2008. En algunas realizaciones, un polipéptido PLA2G16 o compuesto está no covalentemente unido o covalentemente unido al soporte. La unión no covalente podría ser, por ejemplo, por adsorción del polipéptido o compuesto a la superficie (que puede recubrirse con una sustancia para facilitar tal adsorción), mediante un mecanismo basado en afinidad, u otros medios de inmovilización del polipéptido PLA2G16 o compuesto de ensayo de manera que siga físicamente asociado al soporte. En algunas realizaciones, un anticuerpo se utiliza para unir un polipéptido PLA2G16 o compuesto de ensayo a un soporte. En algunas realizaciones, un polipéptido PLA2G16 o compuesto de ensayo se une a un soporte mediante una interacción biotina-avidina u otra interacción de unión fuerte, en las que uno de los dos componentes de la unión se une

directamente o indirectamente al soporte y el otro componente de unión se une a la molécula que va a inmovilizarse.

En algunas realizaciones, los compuestos de ensayo se inmovilizan en múltiples localizaciones (por ejemplo, en un formato de matriz). El polipéptido PLA2G16 se añade y la composición se mantiene durante un periodo de tiempo adecuado para permitir que se produzca la unión. En algunas realizaciones, el material no unido se elimina lavando, y el polipéptido PLA2G16 se detecta utilizando un anticuerpo o, si el polipéptido está detectablemente marcado, detectando una señal. En otras realizaciones, no es necesaria una etapa de lavado. Por ejemplo, la unión puede detectarse midiendo un cambio en la polarización de fluorescencia, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o electroquimioluminiscencia. En otras realizaciones, el polipéptido PLA2G16 se inmoviliza, se añaden compuestos de ensayo, y se mide la unión utilizando enfoques similares.

En algunas realizaciones, se utiliza resonancia de plasmón superficial (SPR, *surface plasmon resonance*) para medir la cinética (constantes de asociación y/o disociación) y/o la intensidad de unión (afinidad) entre un compuesto de ensayo y un polipéptido PLA2G16. Por ejemplo, utilizando tecnología de SPR (por ejemplo, sistemas tales como los disponibles de Biacore, Life Sciences, GE Healthcare) puede medirse la unión y disociación de un compuesto de ensayo a una proteína inmovilizada sobre un chip, y compararse los valores medidos con aquellos obtenidos cuando una solución que no contiene el compuesto de ensayo se carga sobre el chip. Un compuesto de ensayo capaz de unirse a la proteína puede seleccionarse basándose en la constante de unión y de disociación y/o nivel de unión. Otros métodos útiles para detectar y/o cuantificar la unión incluyen el uso de un microscopio de cristal de cuarzo, viga óptica, resonador de microcanales, interferómetro de polarización doble, resonancia de plasmones de guía de onda acoplada, inmunoprecipitación u otros métodos de detección basados en anticuerpos, valoración isotérmica y calorimetría diferencial de barrido, electroforesis capilar, transferencia de energía por resonancia, electroquimioluminiscencia y análisis de correlación fluorescente.

En algunas realizaciones, un aptámero, péptido, análogo de sustrato no hidrolizable, o molécula pequeña que se sabe que se une a un polipéptido PLA2G16, se marca y se utiliza como herramienta para cribar compuestos de ensayo (por ejemplo, moléculas pequeñas) con respecto a su capacidad para unirse a y/o inhibir la actividad del polipéptido. La marca puede comprender, por ejemplo, un resto radiactivo, fluorescente, luminiscente, u otro resto fácilmente detectable. La capacidad de un compuesto de ensayo para competir con el aptámero marcado, péptido, análogo de sustrato no hidrolizable o molécula pequeña puede detectarse y sirve de indicador de la unión del compuesto de ensayo al polipéptido PLA2G16. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de proximidad de centelleo (SPA). En algunas realizaciones de un SPA para identificar compuestos que se unen a un polipéptido PLA2G16, el polipéptido PLA2G16 se une a perlas que contienen un material centelleante. Las perlas normalmente se localizan en pocillos u otros recipientes. En otra realización, un polipéptido PLA2G16 se une a un material centelleante que se incorpora directamente en los pocillos. Se añaden al pocillo un compuesto radiomarcado capaz de unirse al polipéptido PLA2G16 y un compuesto de ensayo. La unión del compuesto radiomarcado al polipéptido PLA2G16 produce una señal. La señal se reduce en presencia de un compuesto de ensayo que compite con el compuesto radiomarcado por la unión. Véase, por ejemplo, J. Fraser Glickman, et al., *Scintillation Proximity Assays in High-Throughput Screening. Assay and Drug Development Technologies*. 6(3): 433-455, 2008, para revisión de SPA. Pueden realizarse ensayos similares utilizando filtros.

En algunas realizaciones, se selecciona un compuesto que se une al polipéptido PLA2G16 con una K_d igual o inferior a aproximadamente 1 mM, 500 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M o 1 μ M. En algunas realizaciones, un compuesto se une a un polipéptido PLA2G16 con una K_d igual a o inferior a aproximadamente 500 nM, 100 nM, 50 nM o 10 nM. En algunas realizaciones, un compuesto se une a un polipéptido PLA2G16 con una K_d entre 0,1-10 nM. Compuestos que se unen a un polipéptido PLA2G16 pueden ensayarse adicionalmente, por ejemplo, en ensayos acelulares o basados en células, para determinar el grado al que inhiben la actividad de PLA2G16 (por ejemplo, actividad catalítica), por ejemplo, como se describe a continuación.

Para identificar y/o caracterizar compuestos que inhiben la actividad de PLA2G16 puede emplearse una variedad de ensayos diferentes. En algunas realizaciones, se evalúa la capacidad de un compuesto para inhibir la catálisis de una reacción química por polipéptido PLA2G16. En algunas realizaciones, la reacción química es la hidrólisis del enlace sn-2 de un fosfolípido. Se proporciona una composición que comprende un polipéptido PLA2G16, uno o más sustrato(s) de PLA2G16, y un compuesto de ensayo. El polipéptido PLA2G16, uno o más sustrato(s) de PLA2G16, y el compuesto de ensayo están normalmente en un medio líquido adecuado. En algunas realizaciones, el medio líquido es un medio acuoso que comprende al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de agua (v/v). En algunas realizaciones, el medio líquido puede comprender un disolvente orgánico tal como DMSO, por ejemplo, en una cantidad que no afecta significativamente la actividad del polipéptido PLA2G16 en comparación con la actividad en ausencia del disolvente orgánico. Un "sustrato" en este contexto es una molécula sobre la que actúa PLA2G16, es decir, una molécula se experimenta una reacción química que se cataliza por PLA2G16. Sustratos a modo de ejemplo se tratan más adelante. La concentración del sustrato y el polipéptido PLA2G16 pueden variar. En algunas realizaciones, el sustrato está presente a entre aproximadamente 1 μ M y 500 μ M, por ejemplo, entre aproximadamente 10 μ M y aproximadamente 50 μ M, 100 μ M o 200 μ M. En algunas realizaciones, el polipéptido PLA2G16 está presente a entre 1 μ g/ml y aproximadamente 100 μ g/ml. Se entenderá que la selección de concentraciones y cantidades puede depender al menos en parte del ensayo particular y está dentro de la experiencia en la materia. La composición se mantiene durante un periodo de tiempo adecuado en

condiciones que de otro modo (es decir, en ausencia de un compuesto que es un posible inhibidor de PLA2G16) serían apropiadas para el polipéptido PLA2G16 para catalizar una reacción en la que el (los) sustrato(s) se convierte/n en uno o más producto(s). La reacción puede detenerse después de un periodo de tiempo deseado, por ejemplo, mediante adición de (2:1) metanol:cloroformo. Las condiciones y otro(s) componente(s) presente(s) en la composición pueden variar dependiendo, por ejemplo, del ensayo particular. Condiciones adecuadas para un polipéptido PLA2G16 para actuar sobre un sustrato pueden incluir, por ejemplo, un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 9,5, por ejemplo, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0, por ejemplo, entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5, por ejemplo, aproximadamente 8,0. En algunas realizaciones, la temperatura es entre 10 °C y 40 °C, por ejemplo, entre 20 °C y 30 °C, por ejemplo, aproximadamente 25 °C. Pueden estar presentes otros componentes en la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende una sustancia tampón tal como Tris-HCl o borato de sodio, para ayudar a regular el pH. Otras sustancias tampón incluyen, por ejemplo, HEPES, MOPS, etc. En algunas realizaciones, la composición comprende un catión divalente, por ejemplo, calcio (Ca^{2+}). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición comprende calcio hasta aproximadamente 5 mM, por ejemplo, entre calcio aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 2,5 mM. En realizaciones a modo de ejemplo, la composición comprende calcio aproximadamente 1 mM o calcio aproximadamente 2 mM. En algunas realizaciones, la composición no comprende un quelante de calcio tal como EDTA. En algunas realizaciones, la composición comprende un quelante de calcio en una cantidad que no reduce la concentración de calcio libre por debajo de aproximadamente 1,0 mM. En algunas realizaciones, la composición comprende un detergente, por ejemplo, desoxicolato, por ejemplo, a entre 1-5 mM, por ejemplo, aproximadamente 2 mM o aproximadamente 3 mM.

En algunas realizaciones, se determina la cantidad de producto producida y/o la tasa de formación de producto. Se evalúa el efecto del compuesto de ensayo sobre la cantidad de producto producida y/o la tasa a la que se produce el producto, por ejemplo, comparando con un valor de referencia adecuado. Si la cantidad de producto o tasa de producción de producto es reducida en presencia del compuesto de ensayo en comparación con un valor de referencia adecuado, el compuesto de ensayo inhibe la capacidad del polipéptido PLA2G16 para catalizar una reacción en la que el sustrato se convierte en uno o más producto(s), es decir, el compuesto de ensayo es un inhibidor del polipéptido PLA2G16. En algunas realizaciones, se determina la tasa de consumo de sustrato o la cantidad de sustrato consumida. Equivalentemente, puede determinarse la cantidad de sustrato que queda. Si la cantidad de sustrato consumida o la tasa de consumo de sustrato es reducida en presencia del compuesto de ensayo en comparación con un valor de referencia adecuado, el compuesto de ensayo inhibe la capacidad del polipéptido PLA2G16 para catalizar una reacción en la que el sustrato se convierte en uno o más producto(s), es decir, el compuesto de ensayo es un inhibidor del polipéptido PLA2G16. Un valor de referencia en cualquiera de estos ensayos puede ser un valor medido en condiciones similares o idénticas en ausencia del compuesto de ensayo.

En algunas realizaciones, un sustrato de PLA2G16 es útil para medir actividad de fosfolipasa, por ejemplo, actividad de fosfolipasa A2. Por ejemplo, un sustrato de PLA2G16 puede ser un fosfolípido que existe de forma natural o artificial. Como se conoce en la técnica, la mayoría de los fosfolípidos están compuestos de 1,2-diacilglicerol y un grupo fosfato, y una molécula orgánica (frecuentemente una base nitrogenada). Un puente fosfodiéster une el esqueleto de glicerol con la base, que algunas veces se denomina "grupo de cabeza". Como ejemplos de grupos de cabeza se incluyen la colina, la etanolamina, el inositol y la serina. Por ejemplo, un sustrato puede ser una fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina. Las cadenas de hidrocarburo de los grupos acilo de una molécula de fosfolípido son frecuentemente diferentes, por ejemplo, derivan de moléculas de ácido graso con diferentes cadenas de hidrocarburo. En algunas realizaciones, las cadenas de hidrocarburo tienen entre 12 y 30 carbonos en longitud. En algunas realizaciones, un sustrato de PLA2G16 tiene la estructura de un fosfolípido que existe de forma natural, por ejemplo, un fosfolípido encontrado en células de vertebrado, por ejemplo, células de mamífero. Sustratos de PLA2G16 a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, 1-palmitoil-2-linoleoil-PC, dilinoleoil-PC, 1-palmitoil-2-linoleoil-PS, 1-palmitoil-2-linoleoil-PE, fosfatidilinositol, 1-palmitoil-2-araquidonil-PC (abreviaturas: PC: fosfatidilcolina PE: fosfatidiletanolamina; PS: fosfatidilserina). En algunas realizaciones, el sustrato comprende colina como grupo de cabeza. En algunas realizaciones, se utiliza un análogo de fosfolípido que contiene un enlace tioéster en lugar del éster sn-2. En algunas realizaciones, un sustrato de PLA2G16 es útil para medir la actividad de lisofosfolipasa. Por ejemplo, el sustrato puede ser una lisofosfatidilcolina, por ejemplo, 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicerol-3-fosfolina.

En algunas realizaciones, un sustrato comprende un resto que facilita la detección de un producto de una reacción bioquímica catalizada por un polipéptido PLA2G16. Por ejemplo, el sustrato puede comprender uno o más átomos radiactivos, marcas fluorescentes y/o extintores de la fluorescencia. En algunas realizaciones, la marca comprende ^{14}C , ^3H o ^{32}P . En algunas realizaciones, el sustrato comprende un resto que emite una señal tras la escisión del sustrato. En algunas realizaciones, el sustrato comprende un resto que puede ser fácilmente detectado tras liberarse del sustrato. Por ejemplo, el resto puede reaccionar con otro compuesto para producir una señal colorimétrica, fluorescente o luminiscente. Marcas incluyen, por ejemplo, materiales orgánicos (incluyendo fluoróforos colorante "tradicionales", extintores y polímeros); materiales inorgánicos tales como quelatos metálicos, nanocristales metálicos y semiconductores (por ejemplo, "puntos cuánticos", y fluoróforos de origen biológico tales como ciertos aminoácidos (por ejemplo, triptófano, tirosina); y compuestos que presentan luminiscencia tras la catálisis enzimática tales como luciferinas que existen de forma natural o sintéticas (por ejemplo, luciferina de luciérnaga o Renilla, coelenterazina). Colorantes fluorescentes incluyen, por ejemplo, colorantes de acridina; colorantes Alexa; BODIPY,

colorantes de cianina; colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina, y derivados de cualquiera de los anteriores. Véase, por ejemplo, *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10ª Edición (Invitrogen Corp.), que describe numerosas moléculas fluorescentes y de otro modo detectables y métodos de su uso y modificación. En otra realización, se utiliza un análogo de fosfolípido que contiene un enlace tioéster en lugar del éster sn-2 éster, y la hidrólisis del enlace tioéster en la posición sn-2 por PLA2 libera el tiol libre que puede detectarse por DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)).

En algunas realizaciones, un sustrato está presente en una vesícula o micela. Por ejemplo, pueden usarse micelas de lípido-detergente. En algunas realizaciones, se utiliza un detergente iónico tal como desoxicolato. Otros detergentes incluyen, por ejemplo, Triton X-100. En algunas realizaciones, se utiliza una composición que contiene 1-palmitoil-2-linoleoil-PC aproximadamente 100 µM con desoxicolato 2 mM y CaCl₂ 2 mM. Puede incorporarse un compuesto de ensayo en la vesícula o micela.

Puede usarse una variedad de ensayos para medir la actividad catalítica de PLA2. En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo que se ha usado en la materia para medir la actividad de una PLA2 del Grupo I-XV (por ejemplo, una PLA2 citosólica o secretada) o se modifica para su uso para medir la actividad catalítica de PLA2G16. En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo radiométrico, con un sustrato de fosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina) que contiene un ácido graso marcado con ¹⁴C o ³H en la posición sn-2. Los ácidos grasos liberados se separan del sustrato sin reaccionar y se cuantifican por recuento de centelleo líquido. En otras realizaciones, se utiliza un ensayo de desplazamiento de la fluorescencia. Puede detectarse una molécula fluorescente utilizando, por ejemplo, un espectrofotómetro. Un ensayo a modo de ejemplo implica el desplazamiento de una sonda de ácido graso fluorescente de albúmina o proteína de unión de ácido graso de hígado de rata por el ácido decanoico liberado como resultado de la hidrólisis catalizada por fosfolipasa A2 de didecanoil-fosfatidilcolina A.R. Kinkaid & D.C. Wilton, A continuous fluorescence displacement assay for phospholipase a2 using albumin and medium chain phospholipid substrates. *Anal. Biochem.* 212: 65-70, 1993; D.C. Wilton, A continuous fluorescence displacement assay for the measurement of phospholipase A2 and other lipases that release long-chain fatty acids. *Biochem. J.* 266: 435-439, 1990). Véase, por tanto, Huang, Z., et al., *Anal. Biochem.* 222: 110-115, 1994, que describe un ensayo para la actividad de cPLA2 basado en la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos de 7-hidroxicumarina por cPLA2, que produce el ácido graso libre y la 7-hidroxicumarina muy fluorescente. Otro ensayo es un ensayo fluorimétrico de fosfolipasa, que se basa en sustratos de liposomas polimerizados (Chu, W., et al., Fluorometric phospholipase assays based on polymerised liposome substrates. *Methods Mol. Biol.* 109: 7-17, 1999). En otra realización, como sustrato, se utiliza un análogo de fosfolípido que contiene un enlace tioéster en lugar del éster sn-2, para medir la actividad de fosfolipasa (Yu, L., et al. Carbonothioate phospholipids as substrate for a spectrophotometric assay of phospholipase A2. *Anal. Biochem.* 265: 35-41, 1998).

En otra realización, como sustrato de PLA2, se utiliza un ensayo espectrofotométrico acoplado utilizando dilinoleoil-fosfatidilcolina (DL-PC) y como enzima de acoplamiento se utiliza lipoxigenasa. Véase, por ejemplo, Jiménez, M., et al. A continuous spectrophotometric assay for phospholipase A(2) activity *Anal Biochem.*, 319(1):131-7, 2003, y referencias en su interior, y Duncan, citado anteriormente. En este ensayo, la lipoxigenasa (linoleato:oxígeno oxidoreductasa, EC 1.13.11.12) cataliza la adición de oxígeno molecular a ácidos grasos que contienen al menos un sistema de (Z,Z)-pentadieno para dar los hidroperóxidos correspondientes. La lipoxigenasa oxida el ácido linoleico liberado por la acción de fosfolipasa, cuya actividad puede después seguirse espectrofotométricamente registrando el aumento en la absorbancia a 234 nm debido a la formación del hidroperóxido correspondiente a partir del ácido linoleico por la acción de lipoxigenasa. Este método proporciona un registro continuo de la hidrólisis de fosfolípidos.

En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo de proximidad de centelleo (SPA, *scintillation proximity assay*). Por ejemplo, un sustrato de PLA2G16 radiomarcado puede unirse a perlas que contienen un material centelleante. Las perlas normalmente se localizan en pocillos u otros recipientes. En otra realización, el material centelleante se incorpora directamente en los pocillos. Un polipéptido PLA2G16 se añade al pocillo en una composición adecuada (que opcionalmente contiene calcio y/o un tampón). La hidrólisis del sustrato libera el resto radiactivo, produciendo una señal reducida. Véase, por ejemplo, J. Fraser Glickman, citado anteriormente, para la discusión de SPA.

En algunas realizaciones, una lectura de ensayo se basa en transferencia de energía por resonancia (RET), por ejemplo, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), transferencia de energía por resonancia de luminiscencia (LRET) o transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET). Puede implementarse una amplia variedad de ensayos basados en RET. En general, tales ensayos hacen uso de una interacción dependiente de la distancia que implica la transferencia de energía entre dos restos (algunas veces denominados donante y aceptor). Si ambos restos están presentes como parte de un sustrato de PLA2G16 y posicionados de manera que la escisión del sustrato libere uno de los restos, puede detectarse una señal (por ejemplo, un aumento o disminución en una señal). FRET es una interacción dependiente de la distancia entre los estados excitados electrónicos de dos restos en los que la excitación se transfiere de un resto de donante a un resto de aceptor sin emisión de un fotón, produciendo la emisión del aceptor de FRET. LRET tiene similitudes con FRET, pero usa un resto luminiscente, por ejemplo, un lantánido como donante de transferencia de energía. BRET es análogo a FRET, pero usa una biomolécula luminiscente o que genera luminiscencia tal como luciferasa, aecuorina, o un derivado de las mismas como donante de energía y un resto fluorescente, por ejemplo, una biomolécula tal

como proteína verde fluorescente (GFP) como aceptor, eliminando así la necesidad de una fuente de luz de excitación (revisado en Pfleger, K. an Eidne, K., Nature Methods, 3(3), 165-174, 2006).

Los ensayos de la invención pueden detectar emisión de aceptor, extinción del donante (emisión reducida del donante de RET), y/o una alteración en la vida de la fluorescencia del donante. Los ensayos de la invención pueden hacer uso de aumentos en la emisión del aceptor, disminución en la emisión del aceptor, extinción del donante, reducción en la extinción del donante y/o aumento o disminución en la vida de la fluorescencia del donante para detectar la escisión de un sustrato de PLA2G16. Son de uso aceptores no fluorescentes, también denominados extintores, e incluyen los colorantes Dabcyl y QSY. Tales moléculas son capaces de absorber la energía de una marca fluorescente excitada cuando está localizada en estrecha proximidad y de disipar esa energía sin la emisión de luz visible. Se conocen en la técnica numerosos pares de donante/aceptor adecuados. Véase, por ejemplo, The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10ª Edición (Invitrogen Corp.).

En algunas realizaciones de un ensayo basado en FRET, una primera cadena de acilo del sustrato de PLA2G16 tiene un extintor de fluorescencia unido y la segunda cadena de acilo tiene un fluoróforo unido. La FRET intramolecular del fluoróforo al extintor extingue la fluorescencia hasta la escisión del sustrato mediada por PLA2, cuando al menos un resto de ácido graso se separa del resto de la molécula, y la distancia intermolecular supera la requerida para la eficiente transferencia de energía. Un aumento en la señal de fluorescencia indica la escisión del sustrato. La presencia de un inhibidor producirá una reducción en la señal de fluorescencia con respecto a la que se observaría en ausencia del inhibidor. En algunas realizaciones, la cadena de acilo sn-1 de los fosfolípidos contiene un extintor de la fluorescencia unido (por ejemplo, Dabcyl, también conocido como rojo de p-metilo), y la cadena de acilo sn-2 contiene un fluoróforo BODIPY añadido. La FRET intramolecular (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) al grupo Dabcyl extingue la fluorescencia de BODIPY hasta la escisión del sustrato mediada por PLA. Véase, por ejemplo, Rose, TM & Prestwich, GD, ACS Chemical Biology, 1(2): 83-89, 2006, para una descripción de fosfolípidos que contienen Dabcyl y BODIPY DBPA, DBPC, DBPE y DBPG (abreviaturas: DB: Dabcyl-BODIPY; PG: fosfatidilglicerol).

Otro formato de ensayo que puede usarse para medir la actividad de PLA2 es un ensayo basado en fluorescencia en el que polielectrolitos conjugados catiónicos están soportados sobre microesferas de sílice (véase, por ejemplo, Chemburu S, et al. Conjugated polyelectrolyte supported bead based assays for phospholipase A2 activity, Phys Chem B., 112(46):14492-9, 2008, que describe un ensayo tal para PLA2 derivada de suero humano. Este ensayo puede modificarse para su uso para detectar compuestos que inhiben la actividad de un polipéptido PLA2G16). Las perlas recubiertas de polímero se recubren en exceso con un fosfolípido aniónico para proporcionar "lipoperlas" que sirven de sensor para PLA2. El lípido sirve a una función doble como sustrato para PLA2 y un agente para atenuar la extinción de la fluorescencia del polímero por el extintor de transferencia de electrones ácido 9,10-antraquinona-2,6-disulfónico (AQS). La extinción de la fluorescencia del polímero por AQS aumenta a medida que PLA2 digiere el lípido. El lípido también puede usarse él mismo como extintor y sustrato empleando una pequeña cantidad de lípido sustituido con extintor de transferencia de energía en el fosfolípido aniónico que recubre las perlas. En este caso, la fluorescencia del polímero se inactiva cuando la capa de lípido está intacta; a medida que la enzima digiere el lípido, se restaura la fluorescencia del polímero. La detección de la actividad de PLA2 puede realizarse monitorizando los cambios de fluorescencia en un lector de placa multipocillo y/o por citometría de flujo.

Un "ensayo basado en células" es un ensayo en el que células viables que expresan o contienen un polipéptido PLA2G16 se ponen en contacto con un compuesto de ensayo y se evalúa un parámetro de interés tal como la actividad de PLA2G16. Normalmente, las células se mantienen en cultivo celular y el compuesto de ensayo se añade al medio de cultivo. En algunas realizaciones, se evalúa el efecto del compuesto de ensayo sobre la capacidad del polipéptido PLA2G16 para actuar sobre un sustrato de PLA2G16. Por ejemplo, un sustrato de PLA2G16, por ejemplo, un sustrato detectablemente marcado, puede añadirse al medio de cultivo o ser sintetizado por la célula a partir de precursor marcado. La escisión del sustrato puede detectarse detectando un ácido graso libre o detectando un producto aguas abajo producido a partir de un ácido graso libre. Por ejemplo, el ácido araquidónico se modifica por ciclooxigenasas para formar eicosanoides (por ejemplo, prostaglandinas, leucotrienos). En algunas realizaciones, puede usarse una célula que carece sustancialmente de otras enzimas PLA2 que podrían actuar sobre el sustrato de PLA2G16. En algunas realizaciones, tales células se identifican por cribado de una variedad de líneas celulares para la expresión de enzimas PLA2 conocidas. En otras realizaciones, se genera una línea celular por delección o inserción diana en los genes que codifican una o más enzima(s) PLA2 o haciendo que la célula exprese ARNhp que inhibe la expresión de tal(es) otra(s) enzima(s) PLA2. En otras realizaciones, el ensayo se realiza en células que han sido puestas en contacto con ARNip específico para tal(es) otra(s) enzima(s) PLA2 para inactivar su expresión.

Un compuesto identificado como un inhibidor de un polipéptido PLA2G16 puede ensayarse en cultivo celular o en modelos animales ("*in vivo*") para determinar su capacidad para inhibir la infección viral. En algunas realizaciones, células huésped se ponen en contacto con un virus y un inhibidor de PLA2G16 en condiciones adecuadas para la infección de las células. Se evalúa la capacidad del compuesto de ensayo para inhibir la infección viral. Si el compuesto reduce detectablemente la infección viral, el compuesto se identifica como un compuesto antiviral. El virus puede ser, por ejemplo, cualquier virus que utilice el polipéptido PLA2G16, o un polipéptido tipo PLA2G16, en su ciclo de vida.

Puede usarse una amplia variedad de tipos de células en las realizaciones de los métodos inventivos. Normalmente, la célula expresa o contiene un polipéptido PLA2G16, bien naturalmente o bien como resultado de modificación por la mano del hombre, aunque células que no expresan una PLA2G16 pueden ser útiles, por ejemplo, para fines de control. Una célula podría originarse a partir de cualquier organismo de interés, por ejemplo, un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. En algunas realizaciones, una célula es una célula de primate, por ejemplo, una célula de mono o una célula humana. Una célula podría ser una célula primaria, célula inmortalizada, célula cancerosa, etc. Frecuentemente, una célula es un miembro de una población de células que está compuesta por células que son sustancialmente genéticamente idénticas, por ejemplo, una línea celular. Una línea celular puede provenir de una única célula o de múltiples células aisladas de un único individuo. Una célula puede originarse a partir de un tejido u órgano de interés o puede tener una propiedad de interés. En algunas realizaciones, una célula es una célula epitelial, fibroblasto, célula de riñón, rabdosarcoma o rabiomiosarcoma, célula de pulmón, o bronquial, pre-adipocito, o adipocito. En algunas realizaciones, una célula se origina de mama, vejiga, hueso, cerebro, bronquios, cuello uterino, colon, endometrio, esófago, laringe, hígado, pulmón, nervio, músculo, ovario, páncreas, próstata, estómago, riñón, piel, testículo o glándula tiroides. Se conocen en la técnica numerosos líneas celulares, muchas de las cuales pueden obtenerse a partir de depósitos tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Depósitos de Células de Coriell, Colección Europea de Cultivos Celulares, Colección Japonesa de Recursos Biológicos para la Investigación, o de una variedad de proveedores comerciales. En algunas realizaciones, un pre-adipocito es una célula 3T3-L1. En alguna realización, una célula es una célula COS, por ejemplo, una célula COS-1 o COS-7. En algunas realizaciones, una célula es una célula HeLa. En algunas realizaciones, una célula es una célula Vero, RD, CHO, HEK-293, HMEC, MDCK, NIH-3T3, HEp-2, A549 o BEAS-2B. En algunas realizaciones, una célula es una célula tumoral. En algunas realizaciones, una célula tumoral se origina de un carcinoma. En algunas realizaciones, una célula tumoral se origina de un sarcoma. En algunas realizaciones, una célula tumoral se origina de un tumor maligno hematológico, por ejemplo, un linfoma o leucemia o mieloma. En algunas realizaciones, una célula tumoral se origina de un cáncer de mama, vejiga, hueso, cerebro, cervical, colon, endometrial, esófago, cabeza y cuello, laringe, hígado, pulmón (células pequeñas o células no pequeñas), ovario, pancreático, próstata, estómago, renal, piel (por ejemplo, células basales, melanoma, células escamosas), testicular o de tiroides. La célula tumoral puede ser una célula de una línea de células tumorales establecida (por ejemplo, una de las líneas de células tumorales de NCI-60) u otra línea de células tumorales conocida en la técnica o recientemente establecida.

En algunas realizaciones, una célula es una célula hematopoyética. En algunas realizaciones, una célula es una célula KBM-7 o derivado de la misma, tal como una célula HAP1. En algunas realizaciones, una célula es una célula KBM-7 u otra célula que ha sido parcialmente reprogramada expresando al menos un "factor de reprogramación" en ella o exponiendo la célula a al menos un "agente de reprogramación" (por ejemplo, un agente que induce la expresión de un factor de reprogramación endógeno o sustituye un factor de reprogramación). Las células de reprogramación, por ejemplo, células de mamífero casi haploides, pueden facilitar su uso en identificar inhibidores de PLA2G16 y/o compuestos antivirales. Tal reprogramación puede convertir la célula KBM-7 (que normalmente crece en suspensión) en una célula adherente, tal como una célula HAP1. Como se conoce en la técnica, fibroblastos de ratón y humanos y diversos otros tipos somáticos normales de células pueden ser reprogramados *in vitro* a un estado pluripotente mediante la introducción mediada por retrovirus de combinaciones de factores de transcripción, por ejemplo, los cuatro factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (siendo c-Myc dispensable, aunque el omitir c-Myc redujo la eficiencia de reprogramación), o los cuatro factores de transcripción Oct4, Nanog, Sox2 y Lin28 (véase, por ejemplo, Meissner, A., et al., Nat Biotechnol., 25(10):1177-81 (2007); Yu, J., et al, Science, 318(5858):1917-20 (2007); y Nakagawa, M., et al., Nat Biotechnol., 26(1):101-6 (2008). Tales factores de transcripción se denominan frecuentemente "factores de reprogramación").

En algunas realizaciones, una célula expresa naturalmente PLA2G16. En algunas realizaciones, una célula se modifica de manera que exprese un polipéptido PLA2G16 a un nivel más alto que sería el caso en ausencia de la modificación. En algunas realizaciones, una célula expresa PLA2G16 a un nivel de al menos el 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, o aproximadamente el 100 % de hasta el nivel de expresión presente en una célula HAP1, célula HeLa, u otra célula capaz de servir de célula huésped para un virus de interés. El nivel de expresión puede normalizarse, por ejemplo, basándose en la expresión de un gen de "mantenimiento". Como genes de mantenimiento comúnmente utilizados se incluyen, por ejemplo, beta-actina, GAPDH, fosfoglicerato cinasa, etc. Pueden utilizarse métodos convencionales para expresar de manera transitoria o estable polipéptidos en células.

En algunas realizaciones, una célula es de un tipo que se conoce en la técnica por ser naturalmente susceptible a infección por un virus, por ejemplo, un picornavirus. Por ejemplo, la célula puede ser de un tipo que normalmente es una célula diana del virus *in vivo* o una línea celular que se ha usado en la materia como huésped para un virus en cultivo. Un compuesto puede ensayarse en células de múltiples tipos diferentes. Por ejemplo, un compuesto puede identificarse inicialmente como un inhibidor de PLA2G16 o compuesto antiviral en una célula que tiene propiedades convenientes para cribar o realizar pruebas para la inhibición de virus y después ensayarse posteriormente en una o más células que son dianas naturales de un virus de interés.

En algunas realizaciones, una célula que se usa en un método descrito en el presente documento, se modifica genéticamente o se selecciona para tener una propiedad que facilite su uso a los compuestos de ensayo. Por ejemplo, la célula puede modificarse genéticamente o seleccionarse para que tenga una expresión reducida o ausente de una o más bombas moleculares que pueden, de otro modo, transportar un compuesto de ensayo fuera

de la célula. En algunas realizaciones, la célula se modifica para facilitar la detección de infección viral. Por ejemplo, la célula podría comprender un gen indicador en el que un promotor u otro(s) elemento(s) de control de la expresión que se activan solo en presencia de proteína(s) viral(es), están unidos operativamente a un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido fácilmente detectable tal como una proteína fluorescente o enzima. En otra realización, una célula expresa una proteína que comprende un sitio de escisión para una proteasa viral, siendo detectable la escisión de la proteína. Por ejemplo, la proteína puede contener un par de FRET (por ejemplo, polipéptidos que son un par de donante y aceptor de FRET) separados por un dominio que contiene un sitio de escisión de proteasa. La escisión por la proteasa produce la separación de los miembros del par de FRET, produciendo una alteración de FRET, que puede detectarse y servir de indicador de infección viral. En otra realización, en las células se introduce un sustrato permeable a células para una proteasa viral. Puede ensayarse un compuesto antiviral candidato, por ejemplo, un compuesto que inhibe la actividad de PLA2G16, en tales células para confirmar que inhibe la infección viral.

Las células pueden ponerse en contacto con uno o más compuestos de ensayo y/o virus durante diversos periodos de tiempo. En ciertas realizaciones, las células se ponen en contacto con uno o más de ensayo y/o virus durante entre 1 hora y 20 días, por ejemplo, durante entre 12 y 48 horas, entre 48 horas y 5 días, por ejemplo, aproximadamente 3 días, entre 5 días y 10 días, o cualquier intervalo intermedio o valor particular. En algunas realizaciones, las células se ponen en contacto con un virus durante al menos un tiempo suficiente para que se completen una o más rondas de replicación viral y producción de virus de progenie. En algunas realizaciones, las células se ponen en contacto con un virus durante al menos un tiempo suficiente para la producción de placas que son detectables al microscopio óptico. Las células pueden ponerse en contacto con un compuesto de ensayo durante todo o parte de un periodo de cultivo. Si se desea, el compuesto de ensayo puede eliminarse antes de evaluar la actividad de PLA2G16 o infección viral. En algunas realizaciones, las células se ponen en contacto con un virus antes de poner en contacto las células con el compuesto de ensayo. En otras realizaciones, las células se ponen en contacto con el compuesto de ensayo antes de ponerlas en contacto con un virus. El número absoluto de virus y la multiplicidad de infección (MOI) puede variar. "Multiplicidad de infección" se refiere a la relación de agentes infecciosos (por ejemplo, virus) como respecto a dianas de infección (por ejemplo, células). En algunas realizaciones, se utiliza una MOI de entre 10^{-4} y 10^2 . Por ejemplo, puede usarse una MOI de entre 0,001 y 10, por ejemplo, entre 0,01 y 1. En algunas realizaciones, se utiliza una cantidad de virus adecuada para producir un cambio patológico en entre el 10 % y el 100 % de células. Un experto en la materia será capaz de determinar una cantidad adecuada de virus para usar de manera que sea capaz de detectar un efecto sobre la infección viral. Puede ensayarse un intervalo de diluciones de una reserva de virus para identificar una cantidad apropiada. Las células se mantienen en cultivo durante un periodo de tiempo adecuado después de ponerlas en contacto con el virus. Normalmente, el periodo de tiempo será suficiente para que el virus entre en las células y para que se produzca al menos un evento indicativo de infección viral. Tal evento puede ser un efecto detectable de un producto(s) génico(s) viral(es) sobre la célula y/o la síntesis o síntesis parcial de al menos un producto génico viral. En general, el periodo de tiempo será suficiente para detectar una diferencia entre el efecto del virus sobre las células en ausencia de un inhibidor de PLA2G16 frente a en presencia de un inhibidor de PLA2G16. Un efecto detectable de un virus sobre una célula podría ser una alteración (por ejemplo, una disminución) en la síntesis de alguna o la mayoría de los ARN(s) celular(es) o proteína(s), inducción de una respuesta antiviral (por ejemplo, inducción de gen(es) diana de interferón tal(es) como el gen que codifica 2'5'-oligoadenilato sintetasa), un efecto morfológico tal como la condensación de cromatina, vesiculación nuclear, proliferación de vesículas membranosas; fuga de contenidos intracelulares; citotoxicidad; escisión de un sustrato por una enzima específica de virus (por ejemplo, una proteasa), etc. La citotoxicidad puede evaluarse, por ejemplo, detectando la lisis celular (que puede ser evidente como áreas claras o "placas" en una monocapa de células) o utilizando cualquiera de una variedad de ensayos para la viabilidad y/o proliferación celular tales como un ensayo de integridad de la membrana celular, un ensayo de viabilidad celular basado en ATP, un ensayo de actividad de reductasa mitocondrial, un ensayo de incorporación de BrdU, EdU o H3-timidina, un ensayo de contenido de ADN utilizando un colorante de ácido nucleico, tal como Hoechst Dye, DAPI, actinomicina D, 7-aminoactinomicina D o yoduro de propidio, un ensayo de metabolismo celular tal como AlamarBlue, MTT, XTT y CellTitre Glo, etc. Los ensayos en placa son un medio bien establecido para evaluar el título viral y detectar el efecto de los compuestos sobre la infectividad viral. En algunas realizaciones, un ensayo en placa implica inocular una reserva de virus estándar en múltiples cultivos celulares idénticos, por ejemplo, cultivados en pocillos de una placa multipocillo. Para minimizar la diseminación del virus a través del medio de cultivo puede añadirse un agente de solidificación, por ejemplo, agarosa. El título viral de la reserva está normalmente predeterminado y se selecciona para dar un número contable de placas en cada pocillo. Se introducen diferentes concentraciones del compuesto de ensayo en una serie de pocillos. El efecto del compuesto puede expresarse como la concentración inhibidora al 50 % (CI_{50}), definida como la concentración más baja de compuesto que produce una disminución del 50 % en el número de placas virales en comparación con un pocillo de control que no contiene el compuesto. Si se desea, puede evaluarse una CI_{90} de un modo similar. Un compuesto que disminuye significativamente un efecto del virus es un inhibidor de la infección por el virus. Por ejemplo, un compuesto que disminuye significativamente el número y/o tamaño de placas virales producidas por una cantidad dada de virus es un inhibidor de la infección viral. Opcionalmente, se determina una CI_{50} o CI_{90} . En algunas realizaciones, se selecciona uno o más compuesto(s) con una CI_{50} o CI_{90} . En algunas realizaciones, una CI_{50} y/o CI_{90} es no superior a 100 mg/ml, por ejemplo, no superior a 10 mg/ml, por ejemplo, no superior a 1,0 mg/ml, por ejemplo, no superior a 100 µg/ml, por ejemplo, no superior a 10 µg/ml, por ejemplo, no superior a 5 µg/ml o no superior a 1 µg/ml. En algunas realizaciones, una CI_{50} y/o CI_{90} es inferior o igual a 500 µM. En algunas realizaciones, una CI_{50} y/o CI_{90} es

inferior o igual a 100 μM . En algunas realizaciones, una CI_{50} y/o CI_{90} es inferior o igual a 10 μM . En algunas realizaciones, una CI_{50} y/o CI_{90} está en el intervalo nanomolar, es decir, inferior o igual a 1 μM .

En algunas realizaciones, se realiza un cribado de alto rendimiento (HTS). Un cribado de alto rendimiento puede utilizar ensayos acelulares o basados en células. Los cribados de alto rendimiento frecuentemente implican ensayar grandes números de compuestos con alta eficiencia, por ejemplo, en paralelo. Por ejemplo, pueden cribarse rutinariamente decenas o cientos de miles de compuestos en cortos periodos de tiempo, por ejemplo, horas a días. Frecuentemente, tal cribado se realiza en placas multipocillo que contienen, por ejemplo, por ejemplo, 96, 384, 1536, 3456 o más pocillos (algunas veces denominados placas de micropocillo o de microtitulación o platos) u otros recipientes en los que múltiples cavidades físicamente separadas están presentes en un sustrato. Los cribados de alto rendimiento pueden implicar el uso de automatización, por ejemplo, para la manipulación de líquidos, obtención de imágenes, adquisición y procesamiento de datos, etc. Sin limitar la invención de ningún modo, ciertos principios y técnicas generales que pueden aplicarse en las realizaciones de un HTS de la presente invención se describen en Macarrón R & Hertzberg RP. Design and implementation of high-throughput screening assays. *Methods Mol Biol.*, 565:1-32, 2009 y/o An WF & Tolliday NJ., Introduction: cell-based assays for high-throughput screening. *Methods Mol Biol.* 486:1-12, 2009, y/o referencias en cualquiera de estos. Métodos a modo de ejemplo también se desvelan en *High Throughput Screening: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* por William P. Janzen (2002) y *High-Throughput Screening in Drug Discovery (Methods and Principles in Medicinal Chemistry)* (2006) por Jorg Hüser

En algunas realizaciones, se realiza un primer cribado para identificar compuestos que se unen a y/o inhiben el polipéptido PLA2G16, y después se evalúa la capacidad de tales compuestos para inhibir la infección viral. En algunas realizaciones, los compuestos de ensayo se ensayan primero en un ensayo basado en células para identificar uno o más compuestos que inhiben la infección viral y después se ensayan para determinar si inhiben PLA2G16.

La divulgación proporciona composiciones que comprenden componentes apropiados para realizar cualquiera de los métodos inventivos, por ejemplo, cualquiera de los métodos de identificación de un compuesto antiviral candidato. En algunas realizaciones, un sistema de ensayo comprende componentes adecuados para identificar un inhibidor de PLA2G16. En algunas realizaciones, una composición comprende componentes apropiados para realizar cualquiera de los métodos inventivos de validación de un compuesto antiviral candidato. En algunas realizaciones, la composición comprende componentes apropiados para confirmar que un compuesto antiviral candidato inhibe la infección viral en células cultivadas o *in vivo*. En un aspecto, una composición desvelada comprende (i) células aisladas que expresan un polipéptido PLA2G16; (ii) un virus capaz de infectar las células; y (iii) un compuesto de ensayo. En algunas realizaciones, el virus es un picornavirus, por ejemplo, un Picornavirus patógeno. El virus normalmente está presente en la composición en cantidades adecuadas para detectar la infección por virus por las células. Tales cantidades normalmente son mayores que las que podrían producirse por casualidad si las células cultivadas llegaran a exponerse a un entorno donde hay un individuo infectado por el virus. En algunas realizaciones, la relación de partículas virales (por ejemplo, partículas virales infecciosas) con respecto a células es al menos $1:10^6$, al menos $1:10^5$, por ejemplo, al menos $1:10^4$, al menos $1:10^3$, al menos $1:10^2$, al menos $1:10$, o al menos $1:1$. En algunas realizaciones, hay más partículas virales (por ejemplo, partículas virales infecciosas) que células. El compuesto de ensayo puede ser, por ejemplo, cualquiera de los compuestos tratados anteriormente. En algunas realizaciones, el compuesto de ensayo es un inhibidor de fosfolipasa A2, por ejemplo, un inhibidor de PLA2G16. En algunas realizaciones, el compuesto de ensayo es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, se ha determinado que el compuesto de ensayo se une a y/o inhibe PLA2G16 en al menos un ensayo acelular o basado en células.

Los compuestos identificados en ensayos acelulares y/o basados en células pueden ensayarse en sujetos (por ejemplo, vertebrados no humanos) para evaluar su capacidad para inhibir la infección viral *in vivo*. En la técnica se conocen modelos animales de infección viral. Un animal puede ser, por ejemplo, un roedor, un primate no humano, un perro, un gato, etc. En una realización, un modelo animal es un modelo murino de miocarditis inducida por virus de Coxsackie B3 (CVB3). Véase, por ejemplo, Szalay G, Ongoing coxsackievirus, myocarditis is associated with increased formation and activity of myocardial immunoproteasomes, *Am J Pathol.*, 168(5):1542-52, 2006, y referencias en su interior. En una realización, un modelo animal es un modelo de ratón para infección por EV71. Véase, por ejemplo Wang, Y. F., et al., A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection. *J. Virol.* 78:7916-7924, 2004, que describen un modelo animal en el que ratones se inoculan por vía oral con EV71. Los ratones pueden monitorizarse diariamente con respecto a signos de enfermedad y supervivencia. En otra realización, se utiliza un mengovirus atenuado en un modelo de roedor para infección por rinovirus. Véase, por ejemplo, Rosenthal LA, A rat model of picornavirus-induced airway infection and inflammation. *J. Virol.*, 6:122, 2009. Pueden recogerse tejidos o líquidos corporales después de la infección para determinar los títulos virales y/o para evaluar otros signos de infección viral. Por ejemplo, puede detectarse ARN o proteína viral utilizando métodos convencionales tales como RT-PCR (para ARN) o métodos inmunológicos para proteínas. Véase, por ejemplo, Li, Z. H., et al., Ribavirin reduces mortality in enterovirus 71-infected mice by decreasing viral replication. *J. Infect. Dis.* 197:854-857, 2008).

La divulgación proporciona además un sujeto no humano, por ejemplo, un vertebrado, en la que el sujeto no humano ha sido inoculado con o expuesto a un virus al que normalmente es susceptible, o que padece una infección viral, y en la que un inhibidor de PLA2G16 ha sido administrado al sujeto. "Inoculación" con un virus significa que el virus se ha introducido en el cuerpo del sujeto. La exposición puede implicar inocular un sujeto o poner el virus y sujeto en proximidad razonablemente estrecha para aumentar la probabilidad de que el sujeto encuentre el virus. La inoculación puede ser por cualquier vía adecuada. La inoculación o exposición normalmente implicará cantidad suficiente de virus para producir enfermedad evidente en al menos el 25 % de una población de esa especie en ausencia de un compuesto antiviral. El inhibidor de PLA2G16 puede ser, por ejemplo, cualquiera de los compuestos tratados anteriormente o identificados según un método inventivo. En algunas realizaciones, el compuesto de ensayo es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, se ha determinado que el compuesto de ensayo se une a y/o inhibe PLA2G16 en al menos un ensayo acelular o basado en células. El sujeto no humano puede monitorizarse, por ejemplo, para evaluar la seguridad, tolerabilidad y/o eficacia del compuesto como agente antiviral. El evaluar el efecto de un inhibidor de PLA2G16 en un sujeto infectado con un virus es un aspecto de la divulgación.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una célula casi haploide que tiene una inserción en el locus PLA2G16 o carece de otro modo de la expresión de PLA2G16. La célula casi haploide es de una especie, por ejemplo, un mamífero, cuyas células somáticas normalmente son diploides. En algunas realizaciones, la invención proporciona una célula casi haploide que expresa un polipéptido PLA2G16 mutante catalíticamente inactivo, en las que opcionalmente la línea de células mutantes casi haploides tiene una inserción en el gen PLA2G16 endógeno. En algunas realizaciones, la invención proporciona una célula casi haploide que expresa un polipéptido PLA2G16 funcional marcado, en las que opcionalmente la línea de células mutantes casi haploides tiene una inserción en el gen PLA2G16 endógeno. Una célula de mamífero casi haploide, como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de mamífero en la que no más de 5 cromosomas están presentes en dos o más copias. En algunas realizaciones, una célula de mamífero casi haploide tiene no más de 1, 2, 3 o 4 cromosomas presentes en dos o más copias. Debe entenderse que la célula "casi haploide" incluye células haploides. Adicionalmente se proporcionan líneas celulares derivada de células que carecen de expresión de PLA2G16 funcional, por ejemplo, líneas celulares compuestas de células que tienen una inserción en el gen PLA2G16. En algunas realizaciones, una línea celular expresa un polipéptido PLA2G16 mutante catalíticamente inactivo, que está marcado en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, una línea celular casi haploide gana cromosomas con el tiempo durante el cultivo de manera que ya no es casi haploide. En algunas realizaciones, la línea celular puede llegar a ser casi diploide o diploide.

La divulgación proporciona además kits que comprenden uno o más componentes de cualquiera de las composiciones y/o componentes inventivos adecuados para realizar cualquiera de los métodos inventivos. Los componentes pueden envasarse individualmente, por ejemplo, en recipientes individuales, que pueden proporcionarse dentro de un recipiente más grande. Un kit puede contener instrucciones para usar el contenido para realizar cualquiera de los métodos, por ejemplo, para identificar o caracterizar un compuesto antiviral.

En algunas realizaciones, se emplean enfoques computacionales para identificar y/o caracterizar compuestos que inhiben PLA2G16. Por ejemplo, puede determinarse una estructura tridimensional de un polipéptido PLA2G16 o una estructura aproximada generada utilizando, por ejemplo, resonancia magnética nuclear, modelado de homología y/o cristalografía de rayos X. Opcionalmente, se determina la estructura del polipéptido con un ligando (por ejemplo, un inhibidor) unido a él. En algunas realizaciones, se utiliza un enfoque computacional en la identificación inicial de inhibidores de PLA2G16 candidatos (algunas veces denominado "cribado virtual"). Las estructuras de compuestos candidatos pueden cribarse para la capacidad para unirse al polipéptido PLA2G16, por ejemplo, a una región (por ejemplo, un "bolsillo") accesible al compuesto. La región podrían ser un sitio activo conocido o potencial o cualquier región accesible al compuesto, por ejemplo, una región cóncava sobre la superficie o una hendidura. Se han desarrollado una variedad de algoritmos de enlace y basados en farmacóforos, y están disponibles programas informáticos que implementan tales algoritmos. Como programas comúnmente utilizados se incluyen Gold, Dock, Glide, FlexX, Fred y LigandFit (incluyendo las ediciones más recientes de los mismos). Véase, por ejemplo, Ghosh, S., et al., *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(3): 194-2-2, 2006; McInnes C., *Current Opinion in Chemical Biology*; 11 (5): 494-502, 2007, y referencias en cualquiera de los artículos anteriores. En algunas realizaciones, un algoritmo de cribado virtual implica dos fases importantes: búsqueda (también denominada "enlace") y puntuación. Durante la primera fase, el programa genera automáticamente un conjunto de complejos candidatos de dos moléculas (compuesto de ensayo y molécula diana) y determina la energía de interacción de los complejos candidatos. La fase de puntuación asigna puntuaciones a los complejos candidatos y selecciona una estructura que muestra interacciones favorables basándose al menos en parte en la energía. Para realizar el cribado virtual, este proceso se repite con un gran número de compuestos de ensayo para identificar aquellos que muestran las interacciones más favorables con la diana. En algunas realizaciones, se identifican modos de unión de baja energía de una molécula pequeña dentro de un sitio activo o posible sitio activo. Las variaciones pueden incluir el uso de algoritmos de enlace rígido o flexible y/o que incluyen la posible unión de moléculas de agua.

Están disponibles numerosas estructuras de molécula pequeña y pueden usarse para el cribado virtual. Por ejemplo, CINC es una base de datos públicamente disponible que contiene estructuras de millones de compuestos disponibles en el comercio que pueden usarse para el cribado virtual (<http://cinc.docking.org/>; Shoichet, J. *Chem. Inf. Model.*, 45(1):177-82, 2005). Una base de datos que contiene aproximadamente 250.000 estructuras de molécula

pequeña está disponible en la página web del Instituto Nacional del Cáncer (EE.UU.) (en <http://129.43.27.140/ncidb2/>). En algunas realizaciones, se criban múltiples moléculas pequeñas, por ejemplo, hasta 50.000; 100.000; 250.000; 500.000, o hasta 1 millón, 2 millones, 5 millones, 10 millones, o más. Los compuestos pueden puntuarse y, opcionalmente, clasificarse por su potencial para unirse a la diana. Pueden ensayarse compuestos identificados en cribados virtuales en ensayos acelulares o basados en células o en modelos animales para confirmar su capacidad para inhibir la actividad de PLA2G16 y/o infección viral.

Para predecir una o más propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de compuestos identificados en cribados reales o virtuales pueden usarse enfoques computacionales. Por ejemplo, pueden predecirse parámetros de absorción, distribución, de metabolismo y de eliminación (ADME). Tal información puede usarse, por ejemplo, para seleccionar aciertos para pruebas adicionales o modificación. Por ejemplo, pueden seleccionarse moléculas pequeñas que tienen características típicas de moléculas "similares a fármaco" y/o pueden evitarse moléculas pequeñas que tienen una o más características no deseadas. En una realización, se seleccionan compuestos que cumplen al menos algunos de los criterios de la "regla de cinco" de Lipinski.

En un aspecto, la divulgación proporciona un medio legible por ordenador en el que se almacenan los resultados de un cribado para identificar compuestos que inhiben PLA2G16. Los resultados pueden almacenarse en una base de datos y pueden incluir cualquier protocolo de cribado, resultados obtenidos del cribado o de cribados adicionales, y/o protocolos de o resultados obtenidos de ensayos realizados en compuestos identificados en el cribado (por ejemplo, ensayos en modelos animales de infección viral).

Puede identificarse o diseñarse compuestos adicionales que inhiben PLA2G16 basándose en los compuestos iniciales ("aciertos") identificados en un cribado real o virtual tales como aquellos descritos anteriormente. Tales compuestos adicionales y métodos de diseño o síntesis son un aspecto de la divulgación. En algunas realizaciones, las estructuras de compuestos acierto se examinan para identificar un farmacóforo, que puede usarse para diseñar compuestos adicionales ("derivados").

Un compuesto adicional puede tener, por ejemplo, una o más propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas mejoradas (es decir, más deseables) en comparación con un acierto inicial o puede simplemente tener una estructura diferente. Por ejemplo, un compuesto puede tener afinidad más alta por la diana molecular de interés (por ejemplo, PLA2G16), afinidad más baja por una molécula no diana, mayor solubilidad (por ejemplo, elevada solubilidad acuosa), elevada estabilidad, elevada biodisponibilidad y/o efecto(s) secundario(s) reducido(s), etc. La optimización puede llevarse a cabo por modificación empírica de la estructura del acierto (por ejemplo, sintetizando compuestos con estructuras relacionadas y ensayándolos en ensayos acelulares o basados en células o en animales no humanos) y/o utilizando enfoques computacionales. Tal modificación puede hacer uso de principios establecidos de química medicinal para alterar predeciblemente una o más propiedades.

En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 se modifica o incorpora un resto que potencia la captación celular, estabilidad (por ejemplo, en suero), aumenta la semivida, reduce la toxicidad o inmunogenicidad, o confiere de otro modo una propiedad deseable al compuesto. En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 comprende un dominio de transducción de proteína (PTD). Un PTD o péptido que penetra en célula (CPP) es un péptido o peptoide que puede atravesar la membrana plasmática de muchas, si no todas, las células de mamífero. Un PTD puede potenciar la captación de un resto con el que está unido o en el que está presente. Frecuentemente, tales péptidos son ricos en arginina. Por ejemplo, se ha estudiado y usado ampliamente el PTD de la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2) para transportar cargas en células de mamífero. Véanse, por ejemplo, Fonseca SB, et al., *Adv Drug Deliv Rev.*, 61(11):953-64,2009; Heitz F, et al., *Br J Pharmacol.*, 157(2): 195-206, 2009, y referencias en cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, se utiliza un PTD para potenciar la captación de células de una molécula pequeña, ARNip, aptámero, o polipéptido que inhibe PLA2G16.

En algunas realizaciones, un compuesto produce una disminución en el nivel o actividad catalítica de PLA2G16 de al menos el 50 %, cuando se utiliza en un ensayo acelular o basado en células, a una concentración igual o inferior a aproximadamente 1 mM, 500 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M o 1 μ M. En algunas realizaciones, un compuesto produce una disminución en la actividad de PLA2G16 de al menos el 50 % (es decir, una disminución al 50 % o menos de la actividad que cabría esperar en ausencia del compuesto) cuando se utiliza en un ensayo sin células o basado en células a concentraciones más bajas, por ejemplo, iguales o inferiores a aproximadamente 500 nM, 100 nM, 50 nM o 10 nM o menos. En algunas realizaciones, un compuesto produce una disminución en la actividad de PLA2G16 de al menos el 50 % cuando se utiliza a una concentración entre 0,1-10 nM. Anteriormente se han mencionado diversos métodos adecuados para evaluar el nivel o actividad de PLA2G16. En algunas realizaciones, un compuesto produce una disminución en la producción o virus de progenie de al menos el 50 % (es decir, una disminución al 50 % o menos del número de virus de progenie que cabría esperar en ausencia del compuesto) o una disminución en el efecto citopático de al menos el 50 % cuando se utiliza en un sistema celular de cultivo adecuado a una concentración igual o inferior a aproximadamente 1 mM, 500 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, o 1 μ M. En algunas realizaciones, un compuesto produce una disminución en la producción o virus de progenie o efecto citopático de al menos el 50 % cuando se utiliza en un sistema de cultivo celular adecuado a concentraciones más bajas, por ejemplo, iguales o inferiores a aproximadamente 500 nM, 100 nM, 50 nM o 10 μ M o menos. En algunas

realizaciones, un compuesto produce una disminución en la producción o virus de progenie de al menos el 50 % cuando se utiliza en un sistema de cultivo celular adecuado cuando se utiliza a una concentración entre 0,1-10 nM. Anteriormente se han mencionado diversos métodos adecuados para evaluar la producción de virus o el efecto citopático. En otros aspectos, un compuesto produce una disminución de al menos el 25 %, o al menos el 75 %, o al menos el 90 %, en el nivel de PLA2G16, actividad catalítica y/o producción de virus de progenie o efecto citopático.

Se observa que, en general, los inhibidores de PLA2G16 y métodos de uso de los mismos no dependen de, y no están limitados por, la forma en la que un inhibidor se identificó o generó o los componentes se utilizaron para identificar o generar el inhibidor de PLA2G16. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la divulgación, se utiliza un inhibidor de PLA216 identificado utilizando un polipéptido PLA2G16 humano y/o utilizando células humanas para tratar seres humanos. En ciertas realizaciones de la divulgación, se utiliza un inhibidor de PLA216 identificado utilizando un polipéptido PLA2G16 humano y/o utilizando células humanas para tratar animales no humanos, por ejemplo, animales vertebrados no humanos. En algunas realizaciones, se utiliza un inhibidor de PLA216 identificado utilizando un polipéptido PLA2G16 de un animal no humano y/o utilizando células derivadas de un animal no humano para tratar animales no humanos de esas especies, especies de animales no humanos diferentes y/o seres humanos. Podría usarse un inhibidor de PLA216 que inhibe la infección por un virus que infecta células humanas para tratar seres humanos, animales no humanos, o ambos, en diversas realizaciones de la divulgación. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un inhibidor de PLA216 que inhibe la infección por un virus que infecta células humanas se utiliza para inhibir la infección por un virus que principalmente o solo infecta células de un animal no humano.

VII. Composiciones farmacéuticas, métodos de tratamiento y otras aplicaciones

Un compuesto identificado, seleccionado o diseñado según un método descrito en el presente documento puede tener una variedad de usos. En algunas realizaciones, un compuesto es útil para fines terapéuticos, por ejemplo, como un agente terapéutico para un sujeto en necesidad de tratamiento para una infección viral.

En algunas realizaciones, un sujeto "padece" una infección viral cuando excesivos números de una población viral están presentes en o sobre el cuerpo del organismo y/o cuando los efectos de la presencia de una población (poblaciones) de virus están dañando las células u otro tejido de un organismo. Un sujeto puede estar "en necesidad de tratamiento para" una infección viral si, por ejemplo, el sujeto padece una infección viral o está en riesgo elevado de desarrollar una infección viral en comparación con (i) la mayoría de los miembros de la población general; y/o (ii) el nivel de riesgo que el sujeto normalmente experimenta.

La divulgación contempla el tratamiento de una amplia variedad de infecciones virales en sujetos humanos y/o animales, por ejemplo, infección debida a cualquiera de los virus tratados en el presente documento. Según la invención, el virus es un picornavirus, por ejemplo, un cardiovirus, ecovirus, enterovirus (por ejemplo, un virus de Coxsackie, rinovirus o ecovirus), o hepatovirus, o rinovirus. En algunas realizaciones, el virus se agrupa filogenéticamente dentro del género enterovirus. En algunas realizaciones, el picornavirus se clasifica con una especie seleccionada del grupo que consiste en: *Enterovirus humano A*, *Enterovirus humano B*, *Enterovirus humano C*, *Enterovirus humano D*, *Enterovirus simio A*, *Enterovirus bovino*, *Enterovirus porcino B*, *Rinovirus humano A*, *Rinovirus humano B* y *Rinovirus humano C*. En algunas realizaciones, el picornavirus se clasifica con una especie seleccionada del grupo que consiste en: *Enterovirus humano A*, *Enterovirus humano B*, *Enterovirus humano C*, *Enterovirus humano D*, *Rinovirus humano A*, *Rinovirus humano B* y *Rinovirus humano C*. En algunas realizaciones, el virus es de un serotipo que se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) o la Colección Nacional de Virus patógenos (NCPV) de la Agencia de Protección de la Salud del RU y, opcionalmente, está disponible para distribución.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento de enfermedades y afecciones médicas resultantes de infección viral, por ejemplo, por un picornavirus. Enfermedades y afecciones a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, exacerbación del asma, bronquiolitis, colitis, resfriado común, exacerbación de EPOC, encefalitis, encefalomielititis, enterocolitis, glosopeda, enfermedad de manos-pies y boca, gastroenteritis, herpangina, hepatitis, meningitis, meningoencefalitis, miocarditis, pancreatitis, poliomielititis y neumonía. En algunos aspectos, la divulgación contempla usos *ex vivo* de los inhibidores de PLA2G16. Por ejemplo, órganos, tejidos o células previstos para su uso en trasplante (por ejemplo, xenotrasplante o trasplante en un individuo de la misma especie) pueden ponerse en contacto *ex vivo* con un inhibidor de PLA2G16, por ejemplo, para reducir la probabilidad de transmitir una infección viral al receptor. En otra realización, los receptores de un trasplante de órgano, tejido o células pueden tratarse con un inhibidor de PLA2G16, por ejemplo, para reducir la probabilidad de contraer una infección viral de las células, tejidos u órgano(s) trasplantados. Tal tratamiento podría comenzar antes de, durante, o después del procedimiento de trasplante.

En algunas realizaciones, el virus es uno para el que no existe una vacuna eficaz, no está en uso comercial, o no se utiliza ampliamente. Por ejemplo, el virus de Coxsackie B3 está extendido en la población humana y produce graves enfermedades tales como miocarditis o pancreatitis. El virus de Coxsackie B4 puede producir un amplio intervalo de enfermedades tales como meningitis aséptica, meningoencefalitis, miocarditis, hepatitis, pancreatitis, gastroenteritis, enterocolitis necrotizantes y neumonía. Sin embargo, a pesar de la importancia clínica de estos virus, no hay vacuna profiláctica disponible en el comercio y clínicamente aplicable. El enterovirus 71 es otro virus de importancia médica

significativa para el que no está disponible una vacuna.

En algunas realizaciones, el virus es uno para el que una vacuna eficaz está en uso comercial y/o está disponible. Sin limitación, los métodos desvelados pueden encontrar uso para tratar sujetos que no están vacunados o no son inmunes de otro modo, para tratar sujetos infectados con una cepa de virus contra la que una vacuna no puede proporcionar inmunidad suficiente, etc. En algunas realizaciones, el individuo se infecta con una cepa de vacuna, por ejemplo, una cepa atenuada. En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos de tratamiento de sujetos humanos que pueden haber sido expuestos a o infectados por un virus de la poliomielitis, por ejemplo, individuos no vacunados o que no son inmunes de otro modo (por ejemplo, individuos inmunodeprimidos), en el marco de un brote de la poliomielitis, individuos que viajan a o desde una región donde la poliomielitis no ha sido erradicada, etc. En algunas realizaciones, la invención contempla tratar ganado en necesidad de tratamiento para el virus de la glosopeda, por ejemplo, en el marco de un brote de la glosopeda.

En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16, por ejemplo, un inhibidor de PLA2G16 identificado según la presente invención, puede tener uno o más usos terapéuticos además de, o en lugar de, tratar una infección viral. En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 es útil como agente terapéutico para un sujeto en necesidad de tratamiento para el exceso de grasa corporal, una enfermedad asociada a exceso de grasa corporal, o un trastorno metabólico. El exceso de grasa corporal puede ser una afección de tener más grasa corporal que la deseada por el sujeto o tener una cantidad de grasa corporal que dentro del criterio médico sensato se considera que contribuye a una enfermedad o que confiere un aumento del riesgo de enfermedad. En algunas realizaciones, un compuesto es útil para tratar aterosclerosis o enfermedad vascular (por ejemplo, enfermedad cardiovascular o cerebrovascular). En algunas realizaciones, el compuesto es útil para tratar obesidad, por ejemplo, en un sujeto que tiene un índice de masa corporal (IMC) superior o igual a 30. En algunas realizaciones, un compuesto es útil para tratar un trastorno metabólico, por ejemplo, diabetes (por ejemplo, diabetes de tipo II, también denominada diabetes mellitus), intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, deficiencia de leptina o hipertrigliceridemia.

Métodos desvelados de tratamiento pueden incluir una etapa de identificar un sujeto que padece o está en riesgo de una infección viral, una etapa de identificar un virus que se sospecha que causa una infección, una etapa de seleccionar un agente terapéutico o combinación de agentes basándose al menos en parte en la identidad o identidad sospechada del virus y/o la localización o características de la infección, y/o una etapa de recetar, proporcionar o administrar un agente seleccionado al sujeto. En ciertas realizaciones de la divulgación, el método incluye determinar que un sujeto tiene una probabilidad significativa (por ejemplo, al menos del 5 %) de padecer o estar en riesgo de infección por un virus, por ejemplo, un picornavirus. Un sujeto puede estar "en riesgo de una infección" en cualquiera de una variedad de circunstancias. "En riesgo de" implica en riesgo elevado de, con respecto al riesgo que tal sujeto tendría en ausencia de una o más circunstancias, afecciones o atributos de ese sujeto, y/o con respecto al riesgo que un miembro sano promedio de la población tendría y/o con respecto al riesgo que el sujeto tenía en un momento anterior. La población normalmente es un grupo de sujetos de la misma especie. Ejemplos de afecciones que ponen a un sujeto "en riesgo" incluyen, pero no se limitan a, inmunodeficiencias (por ejemplo, inmunodeficiencias genéticas); tratamiento previo con agente(s) antibiótico(s) que pueden tener flora microbiana normal reducida o eliminada; tratamiento con agente(s) que suprimen el sistema inmunitario (por ejemplo, quimioterapia para el cáncer, agentes inmunosupresores); exposición a agentes que dañan el sistema inmunitario; enfermedades crónicas tales como diabetes, EPOC, o fibrosis quística; infección bacteriana o fúngica coexistente o precedente; cirugía u otro traumatismo; infancia o vejez; ocupaciones, eventos o condiciones de vida que conllevan la exposición a virus patógenos, etc., o cualquier otra afección que dentro del juicio y habilidad del personal sanitario del sujeto ponga al sujeto en riesgo elevado. En algunas realizaciones, el sujeto puede estar en riesgo elevado de desarrollar una infección viral si el sujeto se ha expuesto recientemente a un virus patógeno, por ejemplo, el sujeto ha tenido contacto con un individuo que se sabe o se cree que padece una infección viral (por ejemplo, exposición en el plazo de las 1, 2, 3, o 4 semanas precedentes o en el plazo del "periodo de incubación" del virus). En una realización, un periodo de incubación se refiere al intervalo de tiempos tras la exposición a un virus durante el que lo harían el 10 % -90 % de los individuos que desarrollan infección sintomática.

Puede emplearse cualquiera de una variedad de métodos para identificar un sujeto en necesidad de tratamiento (por ejemplo, un sujeto en riesgo de o que padece una infección viral) según la presente invención. Por ejemplo, tales métodos incluyen diagnóstico clínico basado al menos en parte en síntomas, historia médica (si está disponible), examen físico, pruebas de laboratorio, estudios de obtención de imágenes, ensayos de inmunodiagnóstico, diagnósticos basados en ácidos nucleicos, y/o aislamiento y cultivo de virus posiblemente causantes de muestras, tales como sangre, orina, esputo, saliva, secreciones nasales, heces, fluido sinovial, líquido cefalorraquídeo, lavado bronquioalveolar, pus, o cualquier muestra de líquido corporal, células o tejido. En algunas realizaciones, el diagnóstico puede basarse al menos en parte en la serología (por ejemplo, detección de un anticuerpo que reacciona específicamente con el virus). En algunas realizaciones, el diagnóstico puede basarse al menos en parte en aislar el virus y/o un genoma viral o producto génico del sujeto. En alguna realización, la muestra se prueba para un genoma viral o producto génico. Por ejemplo, pueden usarse PCR u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos para amplificar ADN o ARN viral, que puede detectarse en una variedad de formas tales como métodos basados en hibridación. Son útiles PCR múltiple u otros métodos de amplificación. Los ensayos de amplificación de señales incluyen ensayos de ADN de cadena ramificada y ensayos de captura de híbridos. Puede usarse amplificación basada en transcripción y amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA). Pueden

usarse micromatrices, por ejemplo, micromatrices de oligonucleótidos. Una micromatriz puede ser una matriz de fase sólida o en suspensión (por ejemplo, un enfoque basado en microesferas tal como la plataforma Luminex). Pueden usarse métodos inmunológicos (por ejemplo, ELISA o aglutinación de partículas) para detectar antígenos virales, por ejemplo, polipéptidos. Pueden usarse compuestos marcados que se unen específicamente a un componente viral. En algunas realizaciones, un virus se cultiva en cultivo celular y se identifica. La identificación puede basarse en la morfología, efecto sobre las células cultivadas y/o la detección de ácidos nucleicos y/o polipéptidos específicos de virus. En algunas realizaciones, no se identifica un virus específico, mientras que en otras realizaciones se identifica un virus específico.

Los compuestos y composiciones desvelados en el presente documento y/o identificados o validados utilizando un método descrito en el presente documento pueden administrarse por cualquier medio adecuado tal como por vía oral, intranasal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarterial, parenteral, intraperitoneal, intratecal, intratraqueal, ocular, sublingual, vaginal, rectal, dérmica, o por inhalación, por ejemplo, como un aerosol. Dependiendo del tipo de afección (por ejemplo, infección viral) que vaya a tratarse, los compuestos de la divulgación pueden, por ejemplo, ser inhalados, ingeridos o administrados por vías sistémicas. Así, están disponibles una variedad de modos de administración, o vías. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del compuesto particular seleccionado, la afección particular que esté tratándose y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de la presente divulgación, en términos generales, pueden ponerse en práctica utilizando cualquier modo de administración que sea médica o veterinariamente aceptable, que significa cualquier modo que produzca niveles aceptables de eficacia sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables (por ejemplo, médica o veterinariamente inaceptable). El término "parenteral" incluye inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intraósea e intraesternal, o técnicas de infusión. En algunas realizaciones, una vía de administración es parenteral u oral. Opcionalmente, una vía o localización de la administración se selecciona basándose al menos en parte en la infección viral particular y/o localización de tejido infectado. Por ejemplo, puede administrarse un compuesto en o cerca de un tejido infectado. En algunas realizaciones, se utilizan medicaciones inhaladas. Tal administración permite la administración directa al pulmón, por ejemplo, en sujetos con una infección respiratoria, aunque también podría usarse para lograr administración sistémica. Regularmente se utilizan varios tipos de inhaladores de dosis medidas para administración por inhalación. Estos tipos de dispositivos incluyen inhaladores de dosis medidas (MDI), MDI activados por la respiración, inhalador de polvo seco (DPI), espaciador/cámaras de contención en combinación con MDI, y nebulizadores. En otras realizaciones, puede usarse administración intratecal, por ejemplo, en un sujeto con una infección viral del sistema nervioso central. Otras vías y dispositivos apropiados para administrar agentes terapéuticos serán evidentes para un experto habitual en la materia.

Pueden combinarse preparaciones adecuadas, por ejemplo, preparaciones sustancialmente puras, de un inhibidor de PLA2G16, con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, etc., para producir una composición farmacéutica apropiada. La divulgación proporciona una variedad de composiciones farmacéuticamente aceptables para administración a un sujeto que comprenden (i) un inhibidor de PLA2G16; y (ii) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo (ese término engloba vehículos, medios, diluyentes, disolventes, vehículos, etc.) o excipiente que no interfiere significativamente con la actividad biológica o eficacia del (de los) principio(s) activo(s) de una composición y que no es excesivamente tóxico para el huésped a las concentraciones a las que se utiliza o administra. Otros componentes farmacéuticamente aceptables también pueden estar presentes en la composición. Sustancias adecuadas y su uso para la formulación de compuestos farmacéuticamente activos es muy conocido en la técnica (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", E. W. Martin, 19ª Ed., 1995, Mack Publishing Co.: Easton, PA, y ediciones o versiones más recientes del mismo, tales como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición. Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins, 2005, para discusión adicional de sustancias farmacéuticamente aceptables y métodos de preparación de composiciones farmacéuticas de diversos tipos).

Una composición farmacéutica normalmente se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Por ejemplo, preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados, por ejemplo, disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; conservantes, por ejemplo, agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Tales preparaciones parenterales pueden estar encerradas en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico. Composiciones farmacéuticas y compuestos para su uso en tales composiciones pueden fabricarse en condiciones que cumplan los patrones o criterios prescritos por una agencia reguladora. Por ejemplo, tales composiciones y compuestos pueden fabricarse según las buenas prácticas de fabricación (GMP) y/o someterse a procedimientos de control de calidad apropiados para agentes farmacéuticos que van a administrarse a los seres humanos.

Para administración por vía oral, los compuestos pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten formular los compuestos de la divulgación como comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto que va a tratarse.

5 Excipientes adecuados para formas de dosificación oral son, por ejemplo, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

10 Opcionalmente, las formulaciones orales también pueden formularse en solución salina o tampones para neutralizar condiciones ácidas internas o pueden administrarse sin ningún vehículo. Se proporcionan núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar con recubrimientos adecuados. Para este fin, pueden usarse disoluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca, y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse tintes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de comprimidos recubiertos de azúcar para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, además de cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. También pueden usarse microesferas formuladas para administración por vía oral. Tales microesferas han sido bien definidas en la materia.

Las formulaciones para administración oral pueden incorporar agentes para mejorar la estabilidad en el tubo gastrointestinal y/o para potenciar la absorción.

30 Para administración por inhalación, las composiciones desveladas pueden administrarse en forma de un espray de aerosol de un recipiente a presión o dispensador que contiene un propulsor apropiado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, un fluorocarbono o un nebulizador. Puede usarse aerosol líquido o seco (por ejemplo, polvos secos, partículas porosas grandes, etc.). La presente divulgación también contempla la administración de composiciones utilizando un espray nasal u otras formas de administración nasal.

35 Para administraciones tópicas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada, loción, gel o crema adecuada que contiene los componentes activos suspensos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en tal composición.

40 Para administración local al ojo, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse como disoluciones o suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotópica de pH ajustado, por ejemplo, para su uso en colirios, o en una pomada.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración transmucosa o transdérmica. Para transdérmica transmucosa o administración, en la formulación pueden usarse penetrantes apropiados a la barrera que va a atravesarse. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Pueden formularse composiciones farmacéuticas desveladas como supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o como enemas de retención para administración rectal.

50 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica incluye uno o más agentes previstos para proteger el (los) agente(s) activo(s) contra la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, implantes, sistema de administración microencapsulada, etc. Los compuestos pueden encapsularse o incorporarse en partículas, por ejemplo, micropartículas o nanopartículas. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, PLGA, colágeno, poliortoésteres, poliéteres y ácido poliláctico. Métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, y sin limitación, en la técnica se conocen varios sistemas de administración basados en partículas para la administración de ARNip. La divulgación contempla el uso de tales composiciones. También pueden usarse liposomas u otras partículas basadas en lípidos como vehículos farmacéuticamente aceptables.

60 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un derivado farmacéuticamente aceptable de un inhibidor de PLA2G16, por ejemplo, un inhibidor de PLA2G16 descrito en el presente documento o identificado o validado según un método inventivo. Según la presente divulgación, un derivado farmacéuticamente aceptable de un compuesto particular incluye, pero no se limita a, sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, sales de tales ésteres, o cualquier otro aducto o derivado que tras la administración a un sujeto en necesidad del mismo sea capaz de proporcionar el compuesto, directamente o indirectamente. Así, derivados farmacéuticamente aceptables pueden

65

- 5 incluir sales, profármacos y/o metabolitos activos. El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que, dentro del alcance del criterio médico sensato, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y/o animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, y que son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Una amplia variedad de sales farmacéuticamente aceptables apropiadas son muy conocidas en la técnica. Como sales farmacéuticamente aceptables se incluyen, pero sin limitación, las derivadas de bases y ácidos inorgánicos y orgánicos adecuados. Un derivado farmacéuticamente aceptable de un inhibidor de PLA2G16 puede formularse y, en general, usarse para el (los) mismo(s) fin(es).
- 10 Cuando las composiciones farmacéuticas de la divulgación se administran a un sujeto, se administran preferentemente durante un tiempo y en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o afección para la que se administran, por ejemplo, una infección viral. La eficacia terapéutica y la toxicidad de los agentes activos pueden evaluarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales. Pueden usarse los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales en la formulación de un intervalo de dosificaciones adecuado para su uso en seres humanos o en otros sujetos. Adicionalmente, pueden ensayarse diferentes dosis para administración humana en ensayos clínicos realizados en seres humanos, como se sabe en la técnica. La dosis usada puede ser la máxima dosis tolerada o una dosis más baja. Una dosis terapéuticamente eficaz de un agente activo en una composición farmacéutica puede estar dentro de un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg. Otras dosis a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg). En algunas realizaciones, se administra una dosis única, mientras que en otras realizaciones se administran múltiples dosis. Los expertos habituales en la materia apreciarán que las dosis apropiadas en cualquier circunstancia particular dependen de la fuerza del (de los) agente(s) utilizado(s), y pueden adaptarse opcionalmente al receptor particular. El nivel de dosis específico para un sujeto puede depender de una variedad de factores que incluyen la actividad del (de los) agente(s) específico(s) empleados, la gravedad de la enfermedad o trastorno, la edad, peso corporal, salud general del sujeto, etc.
- 30 Puede desearse formular composiciones farmacéuticas, particularmente aquellas para composiciones orales o parenterales, en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria, como ese término se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que va a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de agente(s) activo(s) calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado. La divulgación proporciona una forma de dosificación unitaria farmacéuticamente aceptable que contiene una cantidad predeterminada de un inhibidor de PLA2G16, siendo tal cantidad apropiada para tratar un sujeto en necesidad de tratamiento para una infección viral.
- 40 Se entenderá que una pauta terapéutica puede incluir la administración de múltiples formas de dosificación unitaria durante un periodo de tiempo. En algunas realizaciones, un sujeto se trata durante entre 1-7 días. En algunas realizaciones, un sujeto se trata durante entre 7-14 días. En algunas realizaciones, un sujeto se trata durante entre 14-28 días. En otras realizaciones, se administra un ciclo más largo de terapia, por ejemplo, durante entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 semanas. En algunas realizaciones, un sujeto se trata al menos hasta que al menos un síntoma o signo de la infección viral haya empezado a reducirse en gravedad o haya disminuido significativamente en gravedad o hasta que un sujeto ya no esté en riesgo de infección viral. En algunas realizaciones, el tratamiento puede continuarse indefinidamente, por ejemplo, con el fin de lograr la profilaxis. Por ejemplo, un sujeto en riesgo de infección viral recurrente o que quiere evitar la infección viral puede tratarse durante cualquier periodo durante el que existe tal riesgo o el sujeto desea evitar la infección viral. Un sujeto puede recibir una o más dosis al día, o puede recibir dosis cada dos días o menos frecuentemente, dentro de un periodo de tratamiento.
- 50 En algunas realizaciones, se administran dos o más inhibidores de PLA2G16 diferentes. En algunas realizaciones, un inhibidor de PLA2G16 se administra en combinación con un segundo compuesto útil para tratar una infección viral. La expresión "en combinación", como se usa en el presente documento con respecto al tratamiento de combinación, significa con respecto a la administración del primer y segundo compuestos, administración realizada de forma que (i) una dosis del segundo compuesto se administre antes de que más del 90 % de la dosis más recientemente administrada del primer agente haya sido metabolizada a una forma inactiva o eliminada del cuerpo; o (ii) la dosis del primer y segundo compuesto se administren en el plazo de 48 horas el uno del otro, o (iii) los agentes se administren durante periodos de tiempo que se solapan (por ejemplo, por infusión continua o intermitente); o (iv) cualquier combinación de los anteriores. Los compuestos pueden, pero no necesitan ser, administrados juntos como componentes de una única composición. En algunas realizaciones, pueden administrarse individualmente en sustancialmente el mismo momento (por lo que se indica en el plazo de menos de 10 minutos entre sí). En algunas realizaciones pueden administrarse individualmente en el plazo de un corto tiempo entre sí (por lo que se indica menos de 3 horas, algunas veces menos de 1 hora, separados). Los compuestos pueden, pero no necesitan, ser administrados por la misma vía de administración. Cuando se administra en combinación con un segundo compuesto, la cantidad eficaz de un primer compuesto necesaria para provocar una respuesta biológica particular

- puede ser menos o superior a la cantidad eficaz del primer compuesto cuando se administra en ausencia del segundo compuesto (o viceversa), permitiendo así un ajuste de la dosis de cantidad de cualquiera o ambos agente(s) con respecto a la cantidad que se necesitaría si un compuesto se administrara en ausencia del otro. Por ejemplo, cuando los compuestos de la divulgación se administran en combinación (por ejemplo, un inhibidor de PLA2G16 y un segundo compuesto antiviral), puede usarse una dosificación sub-terapéutica de cualquiera de los compuestos, o una dosificación sub-terapéutica de ambos, en el tratamiento de un sujeto en necesidad de tratamiento para una infección viral. En algunas realizaciones, los dos compuestos se utilizan en combinación, el segundo compuesto antiviral puede en algunas realizaciones administrarse a una cantidad sub-terapéutica para producir un resultado terapéutico deseable. Una "cantidad sub-terapéutica", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que es inferior a la cantidad que se esperaría que produjera un resultado terapéutico en el sujeto si se administrara en ausencia del otro compuesto, por ejemplo, menos de una cantidad recomendada. Los efectos de múltiples compuestos pueden, pero no necesitan, ser aditivos o sinérgicos. Uno o más de los compuestos pueden administrarse múltiples veces.
- En algunas realizaciones, se utiliza un agente antiviral conocido en la técnica por ser útil para tratar a un sujeto infectado con un virus particular, por ejemplo, un picornavirus, como segundo compuesto en combinación con un inhibidor de PLA2G16. En algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo que neutraliza o inhibe el virus. En algunas realizaciones, se utiliza un compuesto que inhibe la fusión viral. En algunas realizaciones, se utiliza un inhibidor de la proteasa o inhibidor de cinasas. En algunas realizaciones, se utiliza un agente de iARN, por ejemplo, un ARNip, por ejemplo, que se dirige a un gen viral. En algunas realizaciones se utiliza un agente de unión de la cápside. En algunas realizaciones, el segundo compuesto es, por ejemplo, rupintrivir, pleconaril, un éter de piridaziniloxima, o arbidol. Véase, por ejemplo, Barnard DL., Current status of anti-picornavirus therapies *Curr Pharm Des.* 12(11):1379-90, 2006; DePalma, AM, et al., *Medicinal Research Reviews*, 28(6): 823 - 884, 2008.
- En algunas realizaciones, un compuesto que no es suficientemente activo para ser terapéuticamente útil se convierte en terapéuticamente útil cuando se administra en combinación con un inhibidor de PLA2G16. En algunas realizaciones, puede usarse una dosis más baja de tal compuesto cuando se administra en combinación con un inhibidor de PLA2G16.
- En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición que comprende un inhibidor de PLA2G16 y un segundo compuesto útil para inhibir una infección viral, por ejemplo, una infección por un picornavirus. En algunas realizaciones, se proporciona una forma de dosificación unitaria que comprende los dos (o más) agentes.
- La presente divulgación también proporciona envases farmacéuticos o kits que comprenden uno o más recipientes (por ejemplo, viales, ampollas, frascos) que contienen un inhibidor de PLA2G16 farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, uno o varios de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente asociado a tal(es) recipiente(s) puede estar una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, nota que refleja la autorización por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. La nota puede describir, por ejemplo, la dosis, vías y/o métodos de administración, indicaciones autorizadas (por ejemplo, infecciones virales para las que la composición farmacéutica ha sido autorizada para su uso en el tratamiento), mecanismo de acción, u otra información de uso para un profesional médico y/o paciente. Pueden suministrarse diferentes componentes en forma sólida (por ejemplo, liofilizada) o líquida. Cada componente generalmente será adecuado como alícuota en su recipiente respectivo o se proporciona en una forma concentrada. Los kits también pueden incluir medios para la reconstitución de componentes liofilizados. Los recipientes individuales del kit se mantienen preferentemente en confinamiento cerrado para venta comercial.
- Un virus que va a inhibirse según la presente divulgación puede infectar un tipo de célula, órgano o sistema de órgano de interés. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el virus infecta células del tubo gastrointestinal. En algunas realizaciones, el virus infecta el hígado, por ejemplo, hepatocitos. En algunas realizaciones, el virus infecta el aparato respiratorio, por ejemplo, células de las vías respiratorias superiores y/o inferiores. En algunas realizaciones, el virus infecta células musculares, por ejemplo, células de músculo cardíaco. En algunas realizaciones, el virus infecta el sistema nervioso (por ejemplo, neuronas). En algunas realizaciones, el virus infecta el sistema nervioso central. En algunas realizaciones, el virus infecta células de la piel (por ejemplo, queratinocitos).
- En algunas realizaciones, el virus infecta células de la mucosa. En algunas realizaciones, el virus infecta célula del sistema inmunitario, por ejemplo, linfocitos o macrófagos. En algunas realizaciones, una infección por virus está asociada a daño a un tipo de célula, órgano, o sistema de órganos de interés. Tal daño podría surgir debido a la infección de células por el virus y/o debido a mecanismos inmunomediados.
- En algunas realizaciones, un compuesto es útil para fines de investigación, por ejemplo, para estudiar además la función de PLA2G16 en procesos fisiológicos normales o procesos patológicos. Por ejemplo, un compuesto puede usarse para estudiar además la función de PLA2G16 en el metabolismo y/o en infección viral.
- En otro aspecto, la invención como se define por las reivindicaciones proporciona un método de generación de un organismo pluricelular no humano, por ejemplo, un animal no humano, por ejemplo, un vertebrado no humano, que tiene elevada resistencia a infección viral, por ejemplo, por un picornavirus. En un aspecto, el organismo pluricelular

no humano tiene actividad de PLA2G16 endógena reducida en comparación con un organismo no transgénico normal de la misma especie. En algunas realizaciones, el organismo es un vertebrado no humano transgénico que tiene una inserción diana en, o delección de, al menos parte del gen PLA2G16, de manera que el animal tiene expresión reducida de PLA2G16 funcional. En otras realizaciones, el animal no humano transgénico expresa un agente de iARN, por ejemplo, un ARNhp, que reduce la expresión de PLA2G16. En algunas realizaciones, el organismo no es un roedor. En algunas realizaciones, el organismo no es un ratón. En algunas realizaciones, el vertebrado es un animal de importancia comercial. Por ejemplo, el organismo puede contribuir a menos de 10.000\$ al producto nacional bruto de al menos un país y/o ser un objeto de comercio interestatal o internacional. Como ejemplos de animales de importancia comercial se incluyen, por ejemplo, vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos, pollos, pavos, peces. En algunas realizaciones, un animal es un animal domesticado, por ejemplo, un animal de granja, por ejemplo, ganado tal como una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra o un caballo. En algunas realizaciones, un animal resistente a virus es de una especie no domesticada. Opcionalmente, la especie está en peligro de extinción. El método puede usarse para identificar individuos que son resistentes a infección viral y tienen probabilidad mejorada de sobrevivir en estado salvaje o en cautividad. La resistencia del animal a la infección viral puede reducir la diseminación de virus que pueden infectar tanto al animal como a huéspedes humanos. Pueden manipularse mutaciones o delecciones utilizando, por ejemplo, recombinación homóloga, recombinación mediada por nucleasas con dedos de cinc, modificación de genes mediada por oligonucleótidos, etc. El organismo transgénico puede generarse utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica para generar tales organismos. Por ejemplo, puede usarse transferencia nuclear de células somáticas (SCNT).

En otro aspecto, la invención como se define en las reivindicaciones, proporciona un método que comprende identificar un organismo pluricelular no humano, por ejemplo, un vertebrado no humano, por ejemplo, un animal no humano, con PLA2G16 funcional reducida o ausente. En algunas realizaciones, el organismo no es un roedor. En algunas realizaciones, el animal no es un ratón. En algunas realizaciones, el organismo tiene expresión de PLA2G16 reducida. En algunas realizaciones, el organismo expresa una variante funcionalmente inactiva o fragmento de PLA2G16. Por ejemplo, el organismo podría tener una mutación del marco de lectura o una delección o alteración de al menos algún resto necesario para la actividad. El organismo puede identificarse utilizando, por ejemplo, genotipificación (por ejemplo, para identificar animales que tienen mutaciones o polimorfismos que producen PLA2G16 reducida o alterada) y/o examen del nivel de expresión en tejidos e identificación de animales con expresión o actividad de PLA2G16 baja o ausente. En algunas realizaciones, se examinan polimorfismos, por ejemplo, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que se conocen en la técnica. Por ejemplo, los proyectos de genoma y otros esfuerzos de secuenciación han identificado numerosos SNPs en genomas de animal. Pueden evaluarse SNPs, por ejemplo, SNPs localizados en o cerca del gen PLA2G16, para identificar aquellos que están asociados a PLA2G16 funcional alterada, por ejemplo, reducida o ausente. Pueden identificarse animales que llevan tales SNPs. En algunas realizaciones, la PLA2G16 reducida o ausente se produce en al menos algunos tejidos y/o células que son dianas para infección por un virus. En algunas realizaciones, la PLA2G16 reducida o ausente se produce en la mayoría o todos los tejidos. Pueden seleccionarse organismos con un rasgo deseable (por ejemplo, PLA2G16 reducida o ausente). Pueden aplicarse técnicas de cría estándar para producir animales con expresión y/o actividad de PLA2G16 particularmente baja. Por ejemplo, podrían usarse métodos convencionales de cría de ganado. Pueden emplearse esquemas de cría tradicional y/o selección asistida por marcador. En algunas realizaciones, una mutación o polimorfismo es una mutación que surge espontáneamente, es decir, no se genera por el hombre. En algunas realizaciones, una mutación se genera por el hombre, por ejemplo, utilizando radiación o mutagénesis química. Así, la invención como se define por las reivindicaciones proporciona un método de producción de un organismo no humano no genéticamente modificado, por ejemplo, animal no humano, con PLA2G16 funcional reducida o ausente. En algunas realizaciones, el método comprende identificar o seleccionar un organismo con PLA2G16 funcional reducida o ausente. En algunas realizaciones, el organismo no humano se produce utilizando técnicas de cría selectiva. La invención proporciona además tales organismos y métodos de uso de los mismos.

En algunas realizaciones, un método comprende proporcionar o usar un organismo con PLA2G16 funcional reducida o ausente en agricultura y/o ganadería. El organismo puede ser un organismo genéticamente modificado o un organismo no genéticamente modificado. El organismo puede tener probabilidad reducida de infección con un virus y/o puede tener gravedad reducida de la infección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el animal tiene probabilidad reducida de infección y/o gravedad reducida de la infección por un virus de la glosopeda. En algunas realizaciones, el animal tiene probabilidad reducida de infección y/o gravedad reducida de la infección por un enterovirus bovino o porcino. En algunas realizaciones, la invención como se define por las reivindicaciones proporciona un método que comprende (a) proporcionar un animal que tiene PLA2G16 funcional reducida o ausente; y (b) involucrar en la ganadería utilizando el animal. La ganadería engloba la cría y recría de animales para carne o para recoger productos animales (tales como leche, huevos o lana), además de la cría y cuidado de especies para trabajo y/o compañía. Agricultura se refiere a la producción de alimentos y/o bienes mediante cultivo.

Un experto en la materia aprecia fácilmente que la presente invención es muy aceptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, además de aquellos inherentes en su interior. Los detalles de la descripción y los ejemplos en el presente documento son representativos de ciertas realizaciones, son a modo de ejemplo, y no están previstos como limitaciones al alcance de la invención. Se producirán modificaciones en su interior y otros usos para los expertos en la materia.

Debe entenderse que los artículos "un", "uno" y "una", como se utilizan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, incluyen los referentes plurales. Reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran cumplidas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o son de otro modo relevantes para un producto o proceso dado, a menos que se indique lo contrario o sea de otro modo evidente a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en, o es de otro modo relevante para un producto o proceso dado. La invención también incluye realizaciones en las que más de uno, o todos de los miembros del grupo, están presentes en, se emplean en o son de otro modo relevantes para un producto o proceso dado. Además, debe entenderse que la invención proporciona todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introduce en otra reivindicación dependiente en la misma reivindicación base (o, como sea relevante, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto habitual en la materia de que surgiría una contradicción o inconsistencia. Se contempla que todas las realizaciones descritas en el presente documento son aplicables a todos los aspectos diferentes de la invención cuando corresponda. También se contempla que cualquiera de las realizaciones o aspectos puede ser libremente combinada con una o varias de otras realizaciones o aspectos tales, siempre que sean apropiados. Si los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo de Markush o similar, debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se desvela, y puede eliminarse cualquier elemento(s) del grupo. Debe entenderse que, en general, donde se denomine que la invención, o aspectos de la invención, comprende elementos particulares, características, etc., ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc. Para fines de simplicidad, aquellas realizaciones no han sido en cada caso específicamente expuestas en muchas palabras en el presente documento. Debe también entenderse que cualquier realización o aspecto de la invención puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se cita en la memoria descriptiva. Por ejemplo, puede excluirse uno cualquiera o más géneros virales, especies virales, virus, ensayos, compuestos, enfermedades, sujetos, o combinaciones de los mismos.

Donde las reivindicaciones o descripción se refieren a una composición de materia, por ejemplo, un compuesto, debe entenderse que los métodos de preparación o uso de la composición de materia según cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, y métodos de uso de la composición de materia para cualquiera de los fines en el presente documento, desvelan aspectos de la invención, a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto habitual en la materia que surge una contradicción o inconsistencia. Donde las reivindicaciones o descripción se refieren a un método, por ejemplo, un método de identificación de un compuesto, debe entenderse que los métodos de uso del compuesto, o formulación de una composición que comprende el compuesto, como se describen en el presente documento, son aspectos de la divulgación, a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto habitual en la materia que surge una contradicción o inconsistencia.

Donde se dan intervalos en el presente documento, la invención incluye realizaciones en las que los puntos extremos están incluidos, realizaciones en las que ambos puntos extremos se excluyen, y realizaciones en las que un punto extremo se incluye y el otro se excluye. Debe asumirse que ambos puntos extremos están incluidos, a menos que se indique lo contrario. Además, debe entenderse que, a menos que se indique lo contrario o sea de otro modo evidente del contexto y entendimiento de un experto habitual en la materia, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o sub-intervalo dentro de los intervalos establecidos en diferentes realizaciones de la invención, hasta el décimo de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. También se entiende que donde una serie de valores numéricos se establezca en el presente documento, la invención incluye realizaciones que se refieren análogamente a cualquier valor intermedio o intervalo definido por cualesquiera dos valores en la serie, y que el valor más bajo puede ser tomado como un mínimo y el valor más grande puede ser tomado como un máximo. Valores numéricos, como se usa en el presente documento, incluyen valores expresados como porcentajes. Para cualquier realización de la invención en la que un valor numérico esté precedido por "aproximadamente", la invención incluye una realización en la que se cita el valor exacto. Para cualquier realización de la invención en la que un valor numérico no esté precedido por "aproximadamente", la invención incluye una realización en la que el valor va precedido por "aproximadamente". "Aproximadamente" generalmente incluye números que entran dentro de un intervalo del 1 % o en algunas realizaciones dentro de un intervalo del 5 % de un número o en algunas realizaciones dentro de un intervalo del 10 % de un número en cualquier dirección (mayor o menor que el número), a menos que se establezca de otro modo o sea de otro modo evidente del contexto (excepto donde tal número supere impermisiblemente el 100 % de un posible valor). Debe entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluye más de un acto, el orden de los actos del método no está necesariamente limitado al orden en el que los actos del método se citan, pero la divulgación incluye realizaciones en las que el orden está así limitado. Debe también entenderse que a menos que se indique lo contrario o sea evidente del contexto, cualquier producto o composición descrito en el presente documento puede considerarse "aislado".

Ejemplos

Ejemplo 1: Caracterización e infección retroviral de subclones KBM7

Los presentes inventores caracterizaron primero una configuración de genoma haploide en células humanas que pensaron que serían permisibles para enfoques genéticos directos eficaces. Se ha descrito un subclon de la línea celular de CML KBM7 que lleva un conjunto de cromosomas casi haploides (Kotecki, M., Reddy, P.S., y Cochran, B.H. Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. Exp Cell Res 252, 273-280, 1999). Primero, los presentes inventores examinaron si esta línea celular (generosamente proporcionada por el Dr. B.H. Cochran, Escuela de Medicina de la Universidad de Tufts, Boston, Massachusetts) podría propagarse fácilmente, si era tolerante a infección viral y si podría subclonarse de manera eficaz. El término "línea celular KBM7" se usa en el presente documento para referirse a esta línea celular casi haploide o a un subclon de la misma. Las células de la línea celular KBM7 o un subclon de la misma pueden denominarse "células KBM7". Las células KBM7 tenían una alta eficiencia de subclonación (de aproximadamente ~80 %), y adicionalmente se examinaron varios de los subclones. Los subclones KBM7 proliferaron fácilmente con un tiempo de generación de aproximadamente 24 h y pudieron mantenerse a densidades celulares dispersas y muy altas (por ejemplo, ~1x10⁷ células/ml). Y, lo que es más importante, el análisis de citometría de flujo indicó que los subclones de KBM7 tenían un cariotipo hipodiploide en comparación con las células de carcinoma colorrectal HCT116 diploides. Se examinó un subclon adicionalmente para cariotipificación espectral FISH de 24 colores y se mostró que era haploide para todos los cromosomas, excepto el cromosoma 8, y que contenía un cromosoma Filadelfia (t(9;22)) característico de células de leucemia mielógena crónica transformadas en BCR-ABL. Véase, por tanto, la publicación PCT N.º WO 2011/006145 y Carette JE, et al., Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens, Science. 27 de nov. de 2009; 326(5957):1231-5.

Ejemplo 2: Infección retroviral de células KBM7

Los presentes inventores mostraron a continuación que las células KBM-7 podrían infectarse con retrovirus. Se produjo virus por transfección de un vector retroviral que expresaba GFP con vectores de encapsidación en células 293T (obtenidas de ATCC). El vector retroviral fue pLIB-GFP (Clontech), pero se entenderá que podrían usarse muchos vectores retrovirales diferentes. Se usó el sobrenadante que contiene virus para infectar células KBM7. Para mejorar la eficiencia de infección de células KBM7 con retrovirus, se ensayaron diferentes condiciones. La centrifugación de las células en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos durante 45 minutos a 2.000 pm a temperatura ambiente produjo un aumento de 2 veces en la eficiencia de infección en comparación con sin centrifugación. A continuación, se ensayó el efecto de la adición de retronectina, polibreno y sulfato de protamina, dando eficiencias del 25 %, 33 % y 44 %, respectivamente. Ocho microgramos por mililitro de medio de cultivo de sulfato de protamina es la adición preferida. La concentración de virus por ultracentrifugación durante 1,5 h a 25.000 rpm en un rotor Beckman SW28 mejoró espectacularmente las tasas de infección en comparación con el virus sin diluir y se prefirió con respecto a la concentración por filtros Amicon. En conclusión, las células KBM-7 son óptimamente infectadas cuando se utiliza virus concentrado para una infección en centrífuga en presencia de sulfato de protamina. Estos subclones podrían ser eficientemente infectados (~70-90 %) con GFP que expresa virus retrovirales o lentivirales que se pseudotipificaron VSV-G y mantuvieron altos niveles de expresión de GFP durante varios meses.

Ejemplo 3: Construcción de vectores de trampa génica que contienen vectores que contienen marcadores de selección de puromicina y de GFP

Se construyeron vectores de trampa génica que contenían una LTR inactivada, un sitio de aceptor fuerte de corte y empalme derivado del gen de fibra larga del adenovirus serotipo 40 (Carette et al. 2005 The Journal of Gene Medicine 7(8) 1053-1062), y bien la GFP o el gen de resistencia a puromicina (PURO), seguido de una señal de poliadenilación del SV40, del siguiente modo. La secuencia codificante de PURO o de GFP se obtuvo por amplificación por PCR con cebadores que contenían sitios de restricción ClaI y NheI colgantes, así como sitios de aceptor de corte y empalme parciales: (GFP: 5'-GATCGCTAGCCGCATTTCTTTTTCCAGATGGT-GAGCAAGGGCGAGG-3' y 5'-GATCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3' PURO: 5'-GATCGCTAGCCGCATTTCTTTTTCCAGATGACCGAGTACAAGCCCAC-3' y 5'-GATCGGATCCTCAGGCACCGGGCTTGC-GGGTGC-3'). Estos productos de PCR se insertaron en pEGFPC1 (Clontech) sustituyendo a EGFP. Posteriormente se realizó PCR para introducir el sitio de aceptor de corte y empalme completo para obtener bien GFP o PURO, seguido de la señal de poliadenilación utilizando cebadores que contienen sitios ClaI y BamHI colgantes, además del extremo 5' de la señal del aceptor de corte y empalme (GFP: 5'-GATCATCGATCGCAGGCGCAATCTTCGCATTCTTTTTCCAGATGG-3' y 5'-GATCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3' PURO: 5'-GATCATCGATCGCAGGCGCAATCTTCGCATTCTTTTTCCAGATGAC-3' y 5'-GATCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'). Estos productos de PCR se insertaron en pRETRO-SUPER (Brummelkamp et al. 2002 Cancer Cell. 2(3):243-7) sustituyendo el promotor de polIII. Los plásmidos resultantes se denominaron pGT-GFP y pGT-PURO. Se generaron construcciones de trampas génicas que contenían un gen indicador de GFP o de puromicina en los tres marcos de lectura. Los vectores virales contienen un sitio de aceptor de corte y empalme inmediatamente en la dirección 5' de un

indicador sin promotor y señal de poliadenilación de manera que la inserción del vector en un intrón en un gen activo inactiva el locus nativo, y la transcripción conducida por el promotor del gen produzca un transcrito de fusión en el que el (los) exón (exones) en la dirección 5' están cortados y empalmados con el gen GFP o PURO. Como la transcripción termina en el sitio de poliA insertado, el transcrito de fusión resultante codifica una versión truncada y no funcional de la proteína celular y tanto GFP como PURO, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 1B para un vector de trampa génica en el que el gen que codifica el gen GFP sirve de gen indicador.

Ejemplo 4: Generación de bibliotecas de células mutantes

Para generar una biblioteca de células con alelos inactivados (*knock-out*) en casi todos los genes, las células KBM7 casi haploides se infectaron con las trampas génicas generadas como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se preparó el virus de trampa génica por transfección de células 293T en placas T175 con pGT-GFP o con pGT-PURO combinados con plásmidos de encapsidación retrovirales. El sobrenadante que contenía virus se concentró utilizando ultracentrifugación durante 1,5 h a 25.000 rpm en un rotor Beckman SW28. Los lotes de células KBM7 mutantes normalmente se preparan por infección de una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos que contenía 1,5 millones de células por pocillo utilizando el método descrito en el Ejemplo 2. Se seleccionaron las células infectadas con la trampa génica que contiene el gen de resistencia a puromicina 2 días después de la infección utilizando 500 ng de puromicina por mililitro. Después de la selección por dilución limitante, las células se expandieron y se congelaron para cribados adicionales. Las células infectadas de la trampa génica de GFP se utilizaron tanto para cribados no seleccionados para anular que la trampa génica introdujera sesgo para los genes activamente expresados como se seleccionaron utilizando clasificación FACS para células que expresaban GFP. En algunos casos se realizó estratificación adicional basada en la expresión de GFP para obtener lotes de células con diferentes niveles de GFP. Para aumentar la probabilidad de identificar genes que codificaban productos génicos con una semivida relativamente más larga, los cribados se realizaron en o después del día 6 después de la infección de la trampa génica, permitiendo así que los productos génicos se diluyeran durante la proliferación celular.

Ejemplo 5: Generación de un nuevo tipo de célula útil para genética haploide

Los presentes inventores generaron un tipo de célula adicional, adecuada para genética haploide utilizando reprogramación de células somáticas, un método que se ha descrito recientemente que permite reprogramar el estado de células diferenciadas, por ejemplo, introduciendo factores de transcripción inductores de pluripotencia tales como OCT4, SOX2, KLF4 y c-Myc (Zaehres, H., y Scholer, H.R. (2007). Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell* 131, 834-835). La introducción de estos cuatro factores de transcripción en células KBM-7 por infección retroviral (como se describe en Takahashi, K., et al., *Cell*, 131(5):861-72, 2007) produjo la formación de clones de células adherentes. Algunos o la mayoría de estos clones perdieron los marcadores superficiales de células hematopoyéticas CD43 y CD45. La mayoría de estas células no fueron pluripotentes. Se aisló un subclon y se llamó "HAP1". Las células HAP1 podrían cultivarse en medio que contiene 10 % de FCS y podrían expandirse utilizando tripsina. Estas células no fueron hematopoyéticas y la mayoría de estas células tenía una única copia de cada cromosoma que incluye el cromosoma 8.

A diferencia del virus de la gripe, las células KBM7 no pueden infectarse productivamente con el virus de la poliomielitis (Fig. 1B, paneles izquierdos). Sin embargo, las células HAP1 son muy susceptibles a infección por el virus de la poliomielitis y experimentan muerte celular masiva en el plazo de algunos días (Fig. 1B, compárense los paneles derecho superior y derecho inferior). Posteriormente, se infectaron células HAP1 recientes con la construcción retroviral de trampa génica de los presentes inventores y se expusieron al virus de la poliomielitis. Se expandieron dos colonias resistentes y se mapearon las integraciones. Ambos mutantes contuvieron integraciones independientes en el receptor de entrada del virus de la poliomielitis conocido, PVR, explicando así su resistencia. Estos resultados indicaron que los factores esenciales para la infección por el virus de la poliomielitis pueden encontrarse mediante cribados genéticos haploides en líneas celulares no hematopoyéticas reprogramadas, derivadas de células KBM7, tales como células HAP1.

Ejemplo 6: Identificación de PLA2G16 como factor huésped para el virus de la poliomielitis

Con el fin de identificar nuevos factores huésped para el virus de la poliomielitis, se realizó un cribado más grande utilizando células HAP1 (Fig. 1C). Se preparó un retrovirus y se generó una biblioteca de células HAP1 mutantes como se describe en el Ejemplo 4. Se pusieron en contacto cien millones de células HAP1 haploides mutagenizadas con virus de la poliomielitis y se dejaron crecer colonias resistentes. Para identificar la inserción de sitios de trampa génica, se adaptó un protocolo de PCR inversa para su uso con técnicas de secuenciación masivamente paralelas. Con el fin de hacer esto, se aisló ADN genómico de 30 millones de células que se habían infectado con un vector de trampa génica. Se realizaron cuatro reacciones de digestión por muestra, dos utilizando NlaIII y dos utilizando MseI. Posteriormente, el ADN digerido se purificó en columna (Qiagen) y 1 microgramo de ADN se unió en un volumen de 300 microlitros utilizando ADN ligasa T4 (NEB) a temperatura ambiente durante la noche. Después de otra ronda de purificación en columna, el ADN se usó como molde para una PCR inversa con cebadores orientados hacia el exterior. Los oligonucleótidos se diseñaron para contener secuencias de adaptador requeridas para su uso con el "analyzer del genoma Illumina", una plataforma de secuenciación masivamente paralela. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTGATGGTTCCTAGCTTGCC-3' 5'-

CAAGCAGAAGACGGCATAACGACCCAGGTTAAGATCAAGGTC-3' para moldes digeridos con NlaIII. Los oligonucleótidos utilizados fueron: 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTGATGGTTCTCTAGCTTGCC-3' 5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGACGTTCTGTGTTGTCTGTCTG-3' para moldes digeridos con MseI. Se reunieron las cuatro reacciones de PCR y se utilizaron para el análisis en un analizador del genoma Illumina según el protocolo del fabricante y se mapearon contra el genoma humano. Normalmente se obtienen ~20.000 sitios de inserción que se mapean con diferentes posiciones en el genoma humano de este análisis. Para facilitar la identificación de loci genómicos que son enriquecidos para inserciones de trampas génicas se representó la "densidad de inserción" en una gráfica. La densidad de inserción se determinó para cada inserción calculando $1 / (\text{distancia promedio a los tres sitios de inserción siguientes})$.

La representación en la Fig. 2 muestra las posiciones sobre el cromosoma humano con las que las mutaciones de la trampa génica individuales se mapearon en el eje x y la inversa de la distancia de una mutación particular a sus vecinos en el eje y. Se encontró que las mutaciones estaban altamente enriquecidas en el cromosoma 19 en el receptor del virus de la poliomielitis (PVR) conocido y en el cromosoma 11 en una región que los presentes inventores identificaron como el gen que codifica la PLA2G16 de fosfolipasa. Este gen contuvo 42 inserciones de trampa génica independiente.

Ejemplo 7: Confirmación de que la inserción de la trampa génica anula la expresión de PLA2G16

El cambio del aminoácido 113 de C a A (mutación C113A) convierte a PLA2G16 en catalíticamente inactiva (Duncan, citado anteriormente). Se generaron construcciones retrovirales adecuadas para expresar PLA2G16 humana no mutante o mutante en células HAP1 con o sin una marca FLAG utilizando métodos convencionales y se introdujeron en células HAP1 que contenían una inserción de trampa génica en el locus PLA2G16 (PLA2G16^{GT}). Se usó el vector retroviral pMX que expresa PLA2G16 humana marcada con Flag y un gen marcador de selección IRES-blasticidina o. Para la versión no marcada de PLA2G16 se clonó ADNc de PLA2G16 humana en el vector retroviral pBABEpuro. Se realizó una transferencia Western utilizando un anticuerpo policlonal para PLA2G16 para examinar la expresión de PLA2G16 (Fig. 3). PLA2G16 se detectó en células HAP1 no mutantes (WT, *wild type*) (es decir, células HAP1 que no se habían expuesto al vector de trampa génica) (carril 1). Como era de esperar, las células PLA2G16^{GT} carecieron de PLA2G16 detectable (carril 2). Como se observa en los carriles 3-6, PLA2G16 se detectó fácilmente en células PLA2G16^{GT} que habían recibido una construcción que codificaba PLA2G16 (no mutante o mutante C113A). Como era de esperar, PLA2G16 marcada con FLAG fue ligeramente más grande en tamaño que PLA2G16 sin marcar (compárense los carriles 3 y 4 frente a 5 y 6). Este experimento demostró que la trampa génica había de hecho anulado eficazmente la expresión de PLA2G16 y que las construcciones restauraron la expresión de PLA2G16 cuando se introdujeron en células HAP1 PLA2G16^{GT}.

Ejemplo 8: Confirmación de que la falta de PLA2G16 convierte a las células en resistentes al virus de la poliomielitis

Para confirmar que la anulación de la expresión de PLA2G16 inhibe la infección por virus de la poliomielitis, se infectaron células PLA2G16^{GT} haploides con retrovirus que codificaban PLA2G16 o un mutante catalíticamente inactivo (que contenía una alteración C113A). PLA2G16^{GT} creció vigorosamente en ausencia del virus de la poliomielitis (Fig. 4, panel izquierdo). Como se muestra en la Fig. 4 (segundo panel de la izquierda), células PLA2G16^{GT} (que contenían una inserción de trampa génica en PLA2G16) también crecieron en presencia del virus de la poliomielitis. La complementación de PLA2G16 por expresión en exceso retroviral de PLA2G16 no mutante en células PLA2G16^{GT} restaura la sensibilidad de estas células al virus de la poliomielitis (segundo panel de la derecha). Esto requiere la actividad catalítica de PLA2G16 debido a que la complementación con un sitio catalítico mutante (C113A) no restaura la sensibilidad (panel derecho).

La Fig. 6A muestra la sensibilidad de las células mutantes de la trampa génica al virus de la poliomielitis en forma gráfica. Se infectaron células con las MOI indicadas y tres días después de la infección se midió la viabilidad utilizando un ensayo con MTT. La inserción de la trampa génica en PLA2G16 convierte las células en sensibles a la infección por el virus de la poliomielitis, y la sensibilidad puede restaurarse expresando PLA2G16 no mutante, pero no mutante catalíticamente inactiva, en las células. Como era de esperar, la inserción de la trampa génica en el receptor del virus de la poliomielitis convierte las células haploides en resistentes a infección por el virus de la poliomielitis. La inserción de la trampa génica en PLA2G16 tiene un efecto esencialmente equivalente a la inserción de la trampa génica en el receptor del virus de la poliomielitis.

Ejemplo 9: La inserción de PLA2G16 convierte a las células haploides en resistentes al virus de Coxsackie

La Figura 5 muestra el efecto del virus de Coxsackie B1 sobre células haploides no mutantes y células que carecen de PLA2G16 funcional. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y las monocapas se trataron con virus de Coxsackie B1 a las MOI indicadas. Cuatro días después de la infección, se tiñeron células adherentes viables utilizando cristal violeta. Las células no mutantes fueron muy sensibles al virus a todas las MOI ensayadas (fila superior). Las células mutantes para PLA2G16 debido a la inserción de la trampa génica estuvieron esencialmente inafectadas por el virus de Coxsackie B1, incluso a las altas concentraciones de virus (segunda fila desde arriba). La complementación de PLA2G16 por expresión en exceso retroviral restaura la sensibilidad de estas células al virus

de Coxsackie B1 (tercera fila desde arriba). Esto requiere la actividad catalítica de PLA2G16 debido a que la complementación con un sitio catalítico mutante (C113A) no restaura la sensibilidad (fila inferior). Así, las células que contienen una inserción de la trampa génica en PLA2G16 son resistentes al virus de Coxsackie B1, y la sensibilidad puede restaurarse expresando PLA2G16 no mutante, pero no mutante catalíticamente inactivo.

5 La Figura 6B muestra la sensibilidad de las células mutantes de la trampa génica al virus de Coxsackie B1 en forma gráfica. Se pusieron en contacto células con el virus a las MOI indicadas y tres días después se midió la viabilidad utilizando un ensayo con MTT. La inserción de la trampa génica en PLA2G16 convierte las células sensibles a infección por el virus de Coxsackie B1, y la sensibilidad puede restaurarse expresando PLA2G16 no mutante, pero
10 no mutante catalíticamente inactivo, en las células. Como era de esperar, la inserción de la trampa génica en el receptor del virus de la poliomielitis no influyó significativamente en la sensibilidad al virus de Coxsackie B1.

Ejemplo 10: La inactivación de PLA2G16 aumenta la resistencia a rinovirus

15 Se estudió la capacidad de la inactivación medida por iARN de PLA2G16 para inhibir la infección por rinovirus en células HeLa. La expresión de PLA2G16 se inhibió en células HeLa utilizando dos ARNip diferentes dirigidos a PLA2G16, y se examinó la capacidad de las células para sobrevivir y proliferar después de la exposición a los rinovirus humanos HRV-2 y HRV-14. Los ARNip fueron la secuencia de ARNip 223200 de Ambion, secuencia 5'-CAAGAAACAAGCGACAAAtt-3' y de ARNip 21977 5'-GUACCAGGUCAACAACAAtt-3'. Las células HeLa que no se
20 habían transfectado con ARNip o se transfectaron con un ARNip de control fueron muy susceptibles a la infección por los rinovirus humanos HRV-2 y HRV-14 (Fig. 7, dos columnas de la izquierda). La inactivación de PLA2G16 en células HeLa produjo resistencia significativamente elevada a tanto HRV-2 como a HRV-14 (Fig. 7, dos columnas de la derecha). Las células transfectadas con ARNip dirigidas a PLA2G16 pudieron sobrevivir y proliferar bien después de la exposición a HRV-2 y a HRV-14.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación *in vitro* de un compuesto antiviral candidato que comprende etapas de:
 - 5 (a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido PLA2G16 y un compuesto de ensayo;
 - (b) determinar si el compuesto de ensayo inhibe el polipéptido PLA2G16, en el que si el compuesto inhibe el polipéptido PLA2G16, el compuesto se identifica como un compuesto antiviral candidato útil para inhibir la infección viral por un Picornavirus.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende determinar si el compuesto de ensayo inhibe la expresión del polipéptido PLA2G16, o una actividad enzimática del polipéptido PLA2G16.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la actividad enzimática es actividad de fosfolipasa A2.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que la composición de la etapa (a) es una composición acelular que comprende PLA2G16 purificada; y la etapa (b) comprende determinar si el compuesto de ensayo inhibe la actividad enzimática de PLA2G16, o en el que la composición de la etapa (a) comprende una célula que expresa un polipéptido PLA2G16, y en el que la etapa (b) comprende determinar si el compuesto de ensayo inhibe la expresión o actividad enzimática de PLA2G16.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que si los compuestos inhiben el polipéptido PLA2G16, el compuesto se identifica como un compuesto antiviral candidato útil para inhibir la infección viral por un enterovirus.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en el que si los compuestos inhiben el polipéptido PLA2G16, el compuesto se identifica como un compuesto antiviral candidato útil para inhibir la infección viral por un virus de la poliomiéлитis, virus de Coxsackie o un rinovirus.
7. El método de la reivindicación 1, que comprende además
 - 30 evaluar la capacidad del compuesto para inhibir la infección viral de una célula o de un sujeto, la etapa de poner en contacto una célula con el compuesto y con un virus, en el que la célula sería susceptible al virus en ausencia del compuesto, o
 - la etapa de poner en contacto con un compuesto una célula que se infecta con el virus.
- 35 8. Un método de validación *in vitro* de un compuesto antiviral candidato que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar un compuesto antiviral candidato identificado según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
 - 40 (b) determinar si el compuesto inhibe la infección de una célula o de un organismo causada por un virus, en el que si el compuesto inhibe la infección de una célula o de un organismo causada por el virus, el compuesto se valida como un compuesto antiviral, en el que el virus es un Picornavirus.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, en el que el virus es un enterovirus.
10. El método de la reivindicación 8, en el que el virus es un virus de la poliomiéлитis, virus de Coxsackie o un rinovirus.
- 50 11. Una célula de mamífero casi haploide no humana que tiene no más de 5 cromosomas presentes en dos o más copias, en la que dicha célula de mamífero casi haploide no humana tiene una mutación en un gen que codifica PLA2G16.
12. La célula de mamífero casi haploide de la reivindicación 11, en la que la célula expresa una forma mutante de PLA2G16, o en la que la célula expresa una forma mutante de PLA2G16, en la que la forma mutante tiene actividad catalítica reducida en comparación con la forma no mutante.
- 55 13. Un método de identificación de un organismo pluricelular no humano con elevada resistencia a infección por un virus, comprendiendo el método determinar el genotipo y/o el nivel de expresión en tejidos procedentes de dicho organismo pluricelular no humano, determinando así si el organismo tiene expresión o actividad de PLA2G16 reducida, en el que si el organismo tiene expresión o actividad de PLA2G16 reducida, el organismo tiene resistencia elevada a infección causada por un virus, en el que el virus es un Picornavirus.
- 60 14. El método de la reivindicación 13, en el que el virus es un enterovirus.
- 65 15. El método de la reivindicación 13, en el que el virus es un virus de la poliomiéлитis, virus de Coxsackie o un rinovirus.

- 5 16. Un método que comprende: (a) proporcionar un organismo pluricelular no humano genéticamente modificado con PLA2G16 funcional reducida o ausente; y (b) usar el organismo en agricultura y/o ganadería, en el que el organismo tiene elevada resistencia a infección por un picornavirus con respecto a un organismo que no tiene PLA2G16 funcional reducida o ausente.
- 10 17. El método de la reivindicación 13 o 16, en el que el organismo es un animal vertebrado importante desde el punto de vista comercial.
- 15 18. El método de la reivindicación 16, en el que el organismo tiene elevada resistencia a infección por un enterovirus con respecto a un organismo que no tiene PLA2G16 funcional reducida o ausente.
- 20 19. El método de la reivindicación 16, en el que el organismo tiene elevada resistencia a infección por un virus de la poliomielitis, virus de Coxsackie o un rinovirus con respecto a un organismo que no tiene PLA2G16 funcional reducida o ausente.
- 25 20. Un animal de granja genéticamente modificado que tiene PLA2G16 funcional reducida o ausente, en el que el animal tiene elevada resistencia a infección causada por un virus, en el que el virus es un Picornavirus.
21. El animal de granja de la reivindicación 20, en el que el virus es un enterovirus.
22. El animal de granja de la reivindicación 20, en el que el virus es un virus de la poliomielitis, virus de Coxsackie o un rinovirus.
23. El animal de granja de la reivindicación 20, en el que el animal de granja es una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un caballo, un pollo o un pavo.

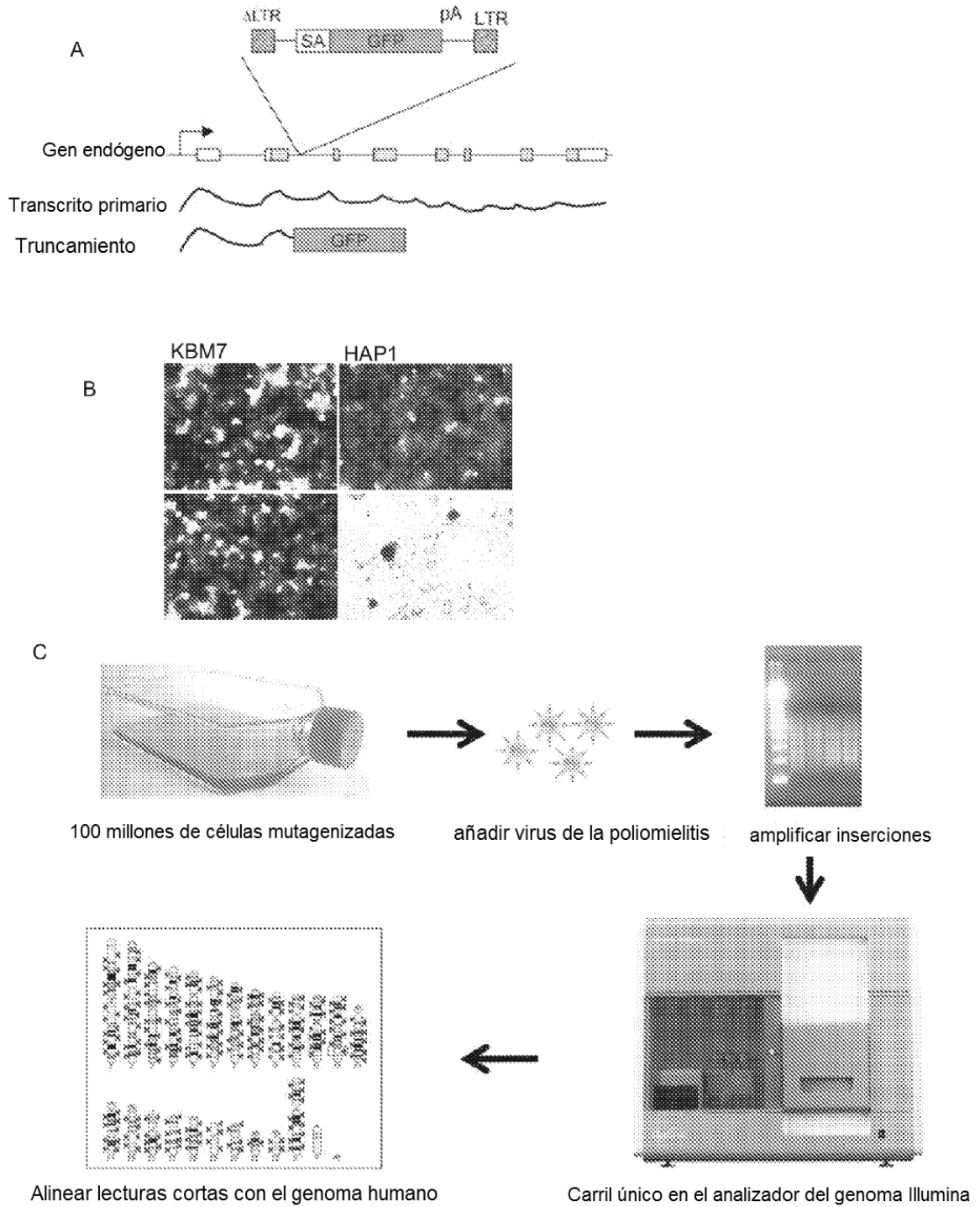


Fig. 1

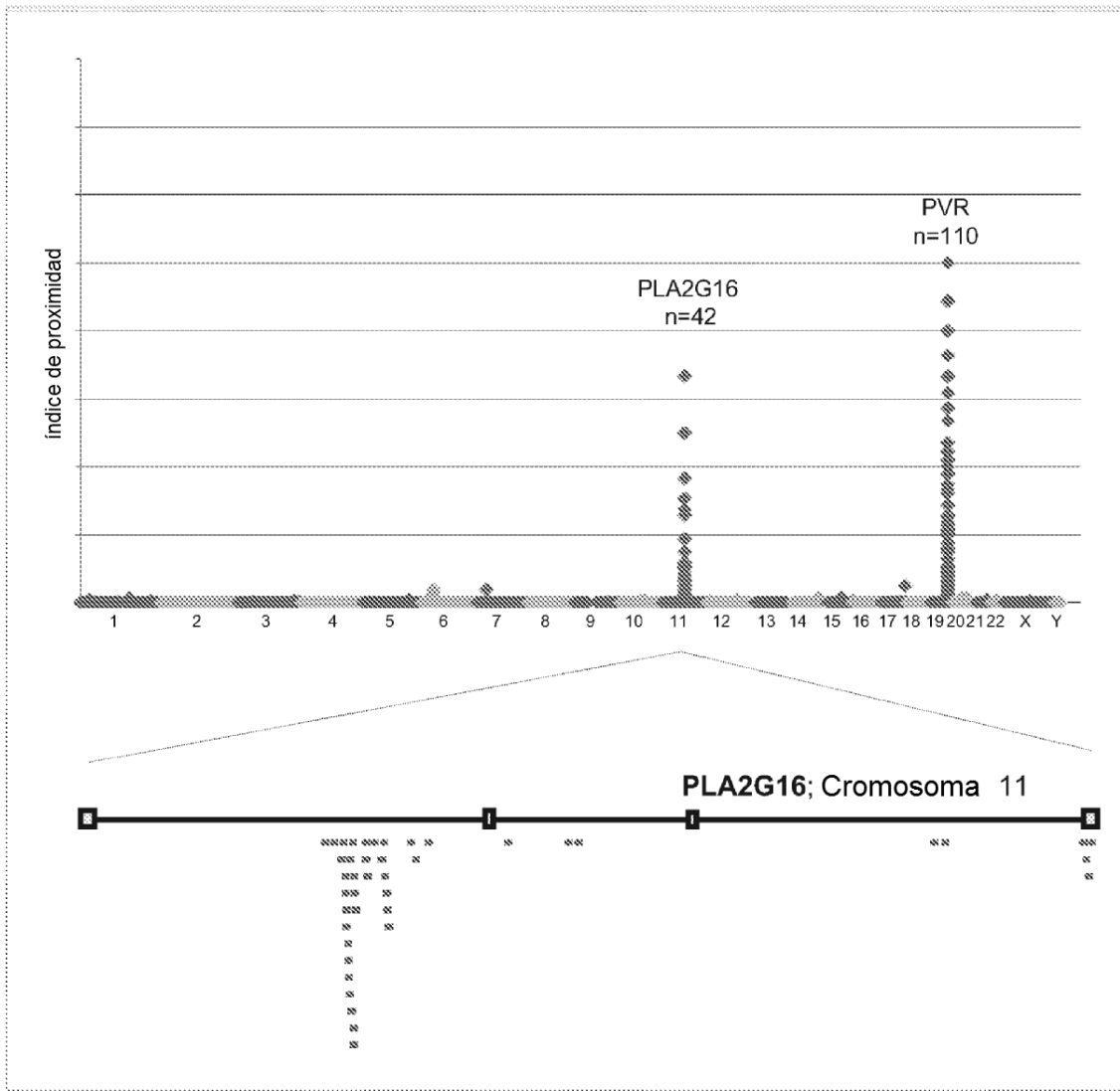


Fig. 2

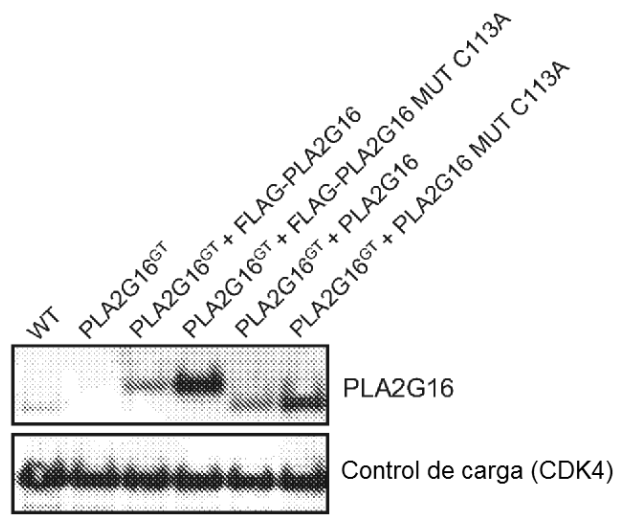


Fig. 3

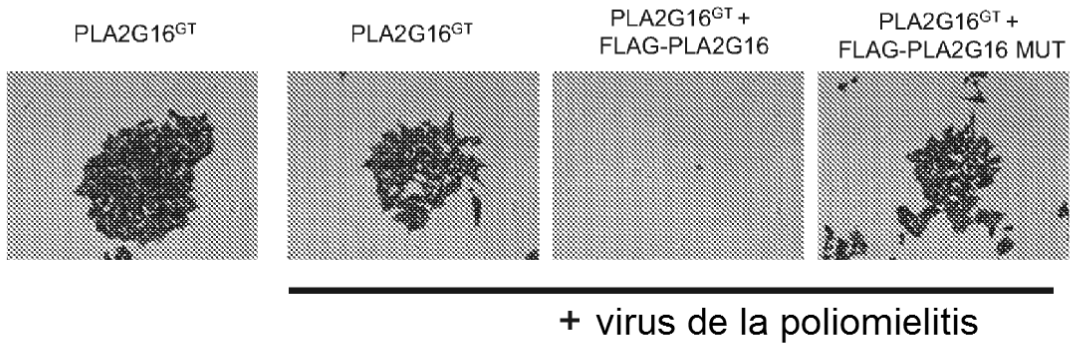


Fig. 4

Virus de Coxsackie B1

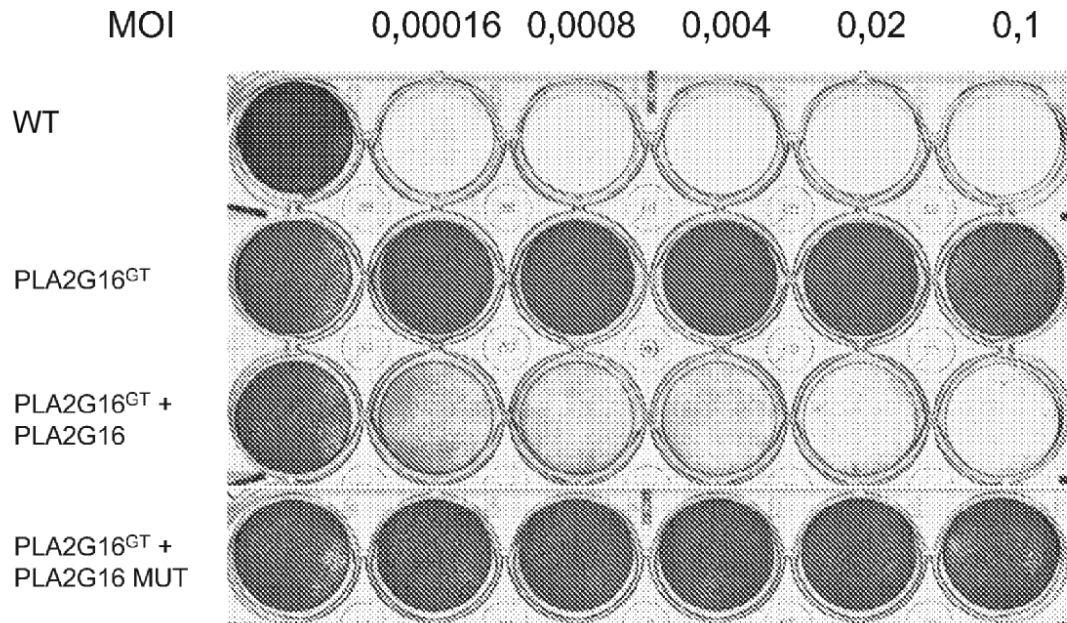


Fig. 5

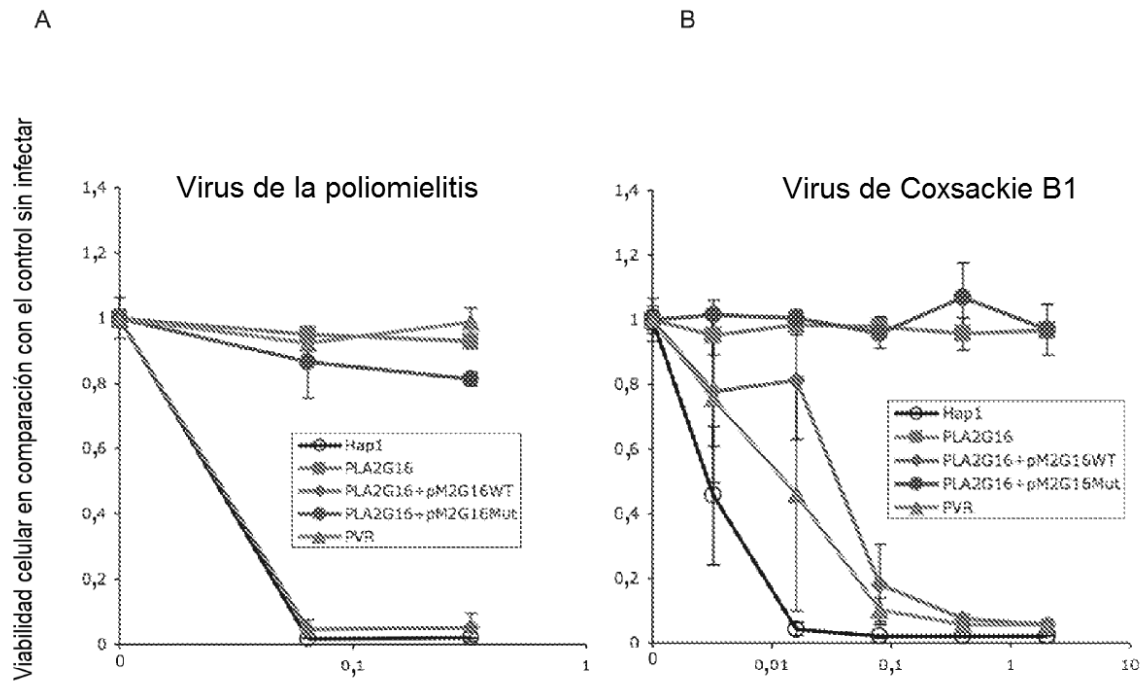


Fig. 6

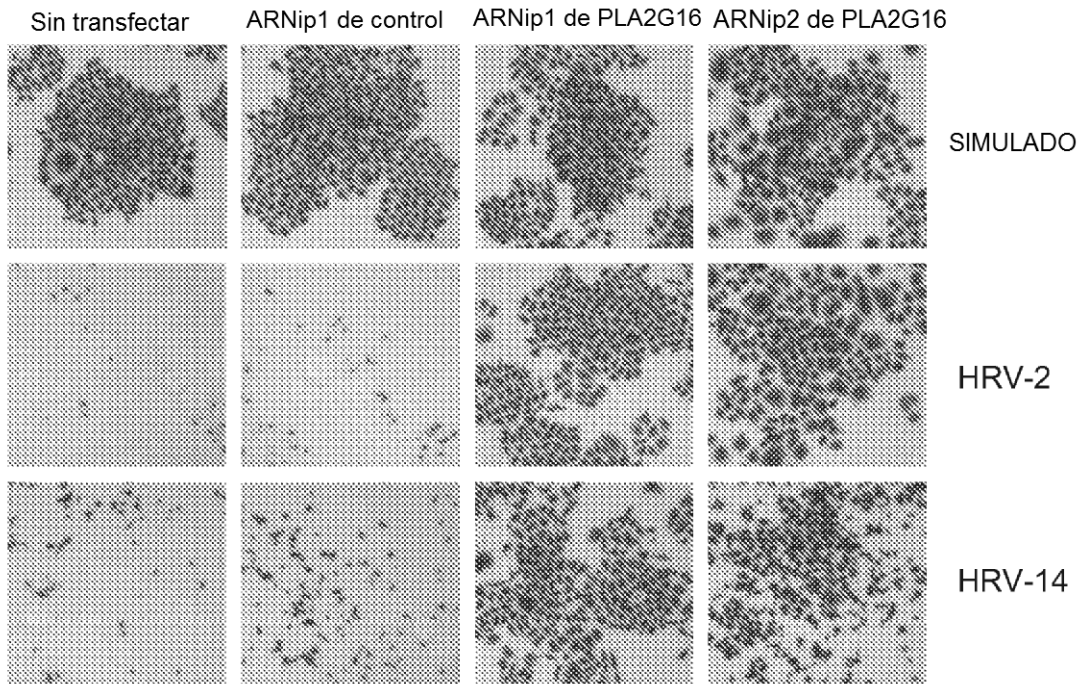


Fig. 7

ES 2 611 150 T3

Secuencias de aminoácidos de PLA2G16 de varias especies de mamífero.

ser humano (*Homo sapiens*) SEQ ID NO: 1
ratón (*Mus musculus*) SEQ ID NO: 2
rata (*Rattus norvegicus*) SEQ ID NO: 3

```
1      MRAPIPEPKP GDLIEIFRPF YRHWAIYVGD GYVVHLAPPS EVAGAGAASV MSALTDKAIV
61     KKELLYDVAG SDKYQVNNKH DDKYSPLPCS KIIQRAEELV GQEVLYKLTS ENCEHFVNEL
121    RYGVARSDQV RDVITIAASVA GMGLAAMSLI GVMFSRNKRQ KQ (SEQ ID NO: 1)
```

```
1      MLAPIPEPKP GDLIEIFRPM YRHWAIYVGD GYVIHLAPPS EIAGAGAASI MSALTDKAIV
61     KKELLCHVAG KDKYQVNNKH DEEYTPLPLS KIIQRAERLV GQEVLYRLTS ENCEHFVNEL
121    RYGVPRSDQV RDAVKAVGIA GVGLAALGLV GVMLSRNKKQ KQ (SEQ ID NO: 2)
```

```
1      MPIPEPKPGD LIEIFRPMYS HWAIYVGDGY VIHLAPPSEI PGAGAASIMS ALTDKAIVKK
61     ELLRDVAGKD KYQVNNKHDK EYTPLPLNKI IQRAEELVGQ EVLYRLTSEN CEHFVNELRY
121    CVPRSDQVRD AVKVATVTGV GLAALGLICV MLSRNKKQKQ (SEQ ID NO: 3)
```

Figura 8