

(12)

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: 2 645 679

51 Int. CI.: A61K 39/00 (2006.01)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

Т3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacion	nal: 26.	04.2007	PCT/CU2007/0000	14
87 Fecha y número de publicación internacional:	08.11.200	07 WO	07124698	
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	26.04.200	D7 E 07	721810 (5)	
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea:	11.10.201	7 EP	2022506	

54 Título: Método para el tratamiento de infección por flavivirus, moléculas y sus usos

③ Prioridad:	(73) Titular/es:
 28.04.2006 CU 20060091 (45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 07.12.2017 	CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (100.0%) Avenida 31 entre 158 y 190 Cubanacán Playa Ciudad De La Habana 10600, CU (72) Inventor/es:
	HUERTA GALINDO, VIVIAN; CHINEA SANTIAGO, GLAY; FLEITAS SALAZAR, NORALVIS; MARTÍN DUNN, ALEJANDRO, MIGUEL; SARRÍA NÚÑEZ, MÓNICA; GUIROLA CRUZ, OSMANY; TOLEDO MAYORA, PATRICIA, GABRIELA; SÁNCHEZ PUENTE, ANIEL; BESADA PÉREZ, VLADIMIR, ARMANDO; REYES ACOSTA, OSVALDO; GARAY PÉREZ, HILDA, ELISA; CABRALES RICO, ANIA; MUSACCHIO LASA, ALEXIS; PADRÓN PALOMARES, GABRIEL, RAMÓN y GONZÁLEZ LÓPEZ, LUIS, JAVIER
	SAEZ MAESO, Ana

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

Método para el tratamiento de infección por flavivirus, moléculas y sus usos.

Alcance de la invención

- La presente invención está relacionada con los campos de la virología, la biotecnología y la industria farmacéutica.
 Particularmente, esta invención está relacionada con métodos para modular o bloquear la infección por el virus del dengue (DV), con base en el bloqueo de la interacción del virus con su receptor celular. El virus del dengue (DV) usa el receptor alfa 2-macroglobulina (A2MR) para su entrada en células de mamíferos, y puede usar la alfa 2-macroglobulina (A2MR) como proteína transportadora que facilita su interacción con este receptor. La presente invención establece la presencia de una interacción directa con A2M humano y define una región de la proteína E
- 10 del virus que participa en esta interacción. Además, la presente invención define péptidos derivados de la proteína E que interfieren con la interacción del virus con su receptor celular, A2MR, y que inhiben la infección de las células de mamíferos por el virus. Estas moléculas constituyen, por lo tanto, posibles agentes farmacológicos para la prevención y el tratamiento de la enfermedad causada por la infección con DV.

Estado de la técnica

- 15 El virus del dengue (DV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, género Flavivirus (FV). Existen cuatro tipos de DV que están genéticamente relacionados, pero se reconocen como serotipos diferentes (DV1, DV2, DV3 y DV4) (Henchal E.A. y Putnak J.R. 1990. Los virus del dengue. Clin. Microbiol. Rev. 3: 376-396). El grado de homología de secuencia del genoma completo entre los cuatro serotipos es aproximadamente del 70%. Una infección primaria por una cepa de un serotipo viral confiere inmunidad de larga duración contra infecciones subsiguientes por cepas
- 20 pertenecientes al serotipo homólogo, pero no contra cepas pertenecientes a los serotipos restantes. Las infecciones secundarias con serotipos heterólogos son comunes y están asociadas con la aparición de síntomas mucho más graves de la enfermedad ((Halstead,S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. (2003) Adv. Virus Res. 60:421-67., 421-467. Hammon WMc. (1960) New haemorragic fever in children in the Philippines and Thailand. Trans Assoc Physicians; 73: 140-155).
- Por lo tanto, al desarrollar una vacuna contra DV es imprescindible garantizar que proporciona protección contra los cuatro serotipos. Sin embargo, debido al grado de variación antigénica encontrada incluso entre las cepas del mismo serotipo, a veces los anticuerpos provocados por la infección con una cepa no son protectores contra una infección por una segunda cepa del mismo serotipo, convirtiendo así el desarrollo de un efecto eficaz, una vacuna segura y de bajo coste, en un gran desafío. Por lo tanto, el uso de moléculas con actividad antiviral representa una atractiva alternativa terapéutica a la vacunación.

El ciclo de replicación de los viriones DV comienza con su entrada a la célula huésped. En huéspedes de mamíferos, los viriones ingresan a las células usando un mecanismo de endocitosis mediada por receptor (Hase T., Summers .PL. and Eckels K.H. (1989), entrada de Flavivirus en células de mosquito cultivadas y monocitos de sangre periférica humana. Arch Virol. 104: 129-143). La disminución del pH que se produce en los endosomas desencadena un cambio conformacional irreversible en los viriones que induce su fusión con la membrana endosomal y su desmontaie (Mukhonadhyay S. Kuh P. L. and Possmann M. C. (2005). A structural perspective of the flavivirus life

- 35 un cambio conformacional irreversible en los viriones que induce su fusión con la membrana endosomal y su desmontaje (Mukhopadhyay S., Kuhn R.J. and Rossmann M. G. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat Rev Microbiol. 3: 13-22).
- El genoma viral así liberado al citoplasma se traduce en una sola poliproteína que se procesa co- y postraducción mediante proteasas víricas y celulares. El ensamblaje de nuevos viriones toma lugar en la superficie del retículo
 endoplásmico, de donde las proteínas estructurales y las moléculas de ARN genómico ingresan a la luz y continúan a través del complejo de Golgi. Los viriones salen del complejo de Golgi como partículas víricas maduras dentro de las vesículas intracelulares cuyos contenidos se liberan al medio extracelular por exocitosis (Mukhopadhyay S., Kuhn R.J. and Rossmann M. G. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat Rev Microbiol. 3: 13-22).
- 45 La entrada de DV a la célula huésped depende de su interacción con moléculas receptoras específicas en la superficie celular. Se han identificado varias moléculas de superficie para las cuales hay evidencia que respalda su implicación en la entrada del virus a la célula, y que por lo tanto se consideran como receptores virales putativos. Experimentalmente, los pasos iniciales de una interacción productiva de células DV se han dividido en una primera etapa de adsorción del virus por interacción con moléculas superficiales, que pueden tener lugar a 4°C, y otra etapa
- 50 durante la cual ocurre la endocitosis mediada por receptor, y que requiere la incubación de las células a 37°C como prerrequisito (Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC (1999) Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells Virology; 257:156-67). Estas etapas involucran diferentes regiones de la proteína de la cubierta viral y diferentes moléculas de la superficie celular (Crill WD, Roehrig JT (2001) Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells.

55 J Virol. 75:7769-73).

Entre las moléculas de superficie importantes para este proceso que se han identificado hasta el momento son los proteoglicanos (Chen Y., Maguire T., Hileman R.E., Fromm J.R., Esko J.D., Linhardt R.J. and Marks R.M. (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. Nat. Med. 3: 866-871),

los que han sido propuestos como participantes en la concentración de partículas virales en la superficie celular para su posterior interacción con otros receptores específicos de alta afinidad (Halstead S.B., Heinz F.X., Barrett A.D. and Roehrig J.T. (2005) Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. Vaccine. 23: 849-856). Las proteínas asociadas a CD14 también se han descrito como posibles receptores en

- 5 macrófagos y monocitos (Chen Y.C., Wang S.Y. and King C.C. (1999) Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. J Virol. 73: 2650-2657). Otras moléculas propuestas provisionalmente como receptores de DV son GRP78/Bip (Jindadamrongwech S. and Smith DR. (2004) Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) reveals serotype specific heterogeneity of dengue virus binding proteins on HepG2 human liver cells. Intervirology. 47: 370-
- 373. Reyes-Del Valle J., Chavez-Salinas S., Medina F. and Del Angel RM. (2005) Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. J Virol. 279: 4557-4567) y el receptor de laminina (Thepparit C. and Smith D.R. (2004) Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. J Virol. 278: 12647-12656. Tio P.H., Jong W.W. and Cardosa M.J. (2005) Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3. Virol J. 2: 25).

La proteína DC-SIGN desempeña un papel muy importante en la entrada de los viriones DV en células dendríticas inmaduras. Sin embargo, esta proteína también parece estar involucrada en la concentración de las partículas virales en la superficie celular en lugar de su endocitosis (Tassaneetrithp B., Burgess T.H., Granelli-Piperno A., Trumpfheller C., Finke J., Sun W., Eller M.A., Pattanapanyasat K., Sarasombath S., Birx D.L. Steinman R.M.,

- 20 Schlesinger S., and Marovich M.A. (2003) DC-SIGN (CD209) mediates Dengue Virus infection of human dendritic cells. J. Exp. Med. 197: 823-829. Navarro-Sanchez E., Altmeyer R., Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL., Arenzana-Seisdedos F. and Despres P. (2003) Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. EMBO Rep. 4: 723-728. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Despres P, Arenzana-
- 25 Seisdedos F, Amara A (2005) Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. J Biol Chem. 280:23698-708).

La proteína de envoltura (E) de DV y otros FV juega un papel fundamental en la unión a los receptores celulares, la fusión de la membrana y el ensamblaje del virión. En consecuencia, constituye uno de los principales determinantes del rango y la virulencia del huésped, y para la inducción de la inmunidad protectora (Heinz F. X. (1986) Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. Adv Virol. Res. 31: 103-168. Modis Y., Ogata S., Clements D. and Harrison S.C. (2005) Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. J Virol. 79: 1223-1231). Esta proteína, con una masa molecular de 53 a 54 kDa, es la más conservada de los polipéptidos estructurales DV, siendo un 40% idéntica en su secuencia de aminoácidos entre los diferentes FV (Mukhopadhyay

- S., Kuhn R.J. and Rossmann M.G. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat Rev Microbiol. 3: 13-22). X-ray crystallography (Modis Y., Ogata S., Clements D. and Harrison S.C. (2003) A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 6986-6991) and electron cryo-microscopy studies (Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann, M.G., Pletnev S. V., Corver J., Lenches E., Jones C.T., Mukhopadhyay S., Chipman P.R., Strauss E.G., Baker T.S. and Strauss J.H. (2002) Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. Cell. 108: 717-725) han revelado que, de una manera similar a otra
- FV, la proteína E de DV se encuentra como dímeros en la superficie de los viriones maduros.

El ectodominio N-terminal de la proteína E está formado por el 80% de los aproximadamente 500 residuos de aminoácidos de la molécula completa. Los residuos restantes constituyen una región transmembrana que ancla la proteína a la envoltura lipídica que rodea al virus. Hay 12 residuos de Cys estrictamente conservados en la

- 45 estructura primaria de la proteína É, que están involucrados en la formación de 6 puentes de disulfuro (Nowak T. and Wangler G. (1987) Analysis of the disulphides present in the membrane protein of the West Nile flaviviruses. Virology. 156: 127-137. Hahn Y.S., Daller R., Hunkapiller T., Dalrymple J.M., Strauss J.H., and Strauss E.G. (1988) Nucleotide sequence of Dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses. Virology. 162: 167-180) that play a very important role in the formation of the antigenic epitopes of this molecule 50 (Roehrig J.T. Volpe K.F., Squires J. Hunt A.R., Davis B.S. and Chang G.J. (2004) Contribution of disulfide bridging
- 50 (Roehrig J.T., Volpe K.E., Squires J., Hunt A.R., Davis B.S. and Chang G.J. (2004) Contribution of disulfide bridging to epitope expression of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. J Virol. 78: 2648-2652).

La cadena polipeptídica que forma el ectodominio soluble de la proteína E se pliega en tres dominios estructurales: un dominio central de lámina plisada (dominio I), un dominio de dimerización alargado (dominio II) y un tercer dominio similar a inmunoglobulina (dominio III) (Rey F.A, Heinz F.X, and Mandl C. (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. Nature. 375: 291-298. Modis Y., Ogata S., Clements D. and

55 from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. Nature. 375: 291-298. Modis Y., Ógata S., Clements D. and Harrison S.C. (2003) A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 6986-6991).

El documento WO2005123774 está relacionado con los anticuerpos de la proteína E del virus del Nilo Occidental (WNE), que incluyen anticuerpos humanos, y porciones de unión a antígeno de los mismos.

60 Schlegel, R. et. al. describe el efecto de la dansilcadaverina y la amantadina en la entrada del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en las células del ratón. (Schlegel R., Dickson R. B., Willingham M. C., and Pastan I. H. (1982)

Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of a2macroglobulin, Proc. NatL Acad. Sci. USA, Vol. 79, pp. 2291-2295).

Koff, W. C., et al. describen que la amantadina inhibe significativamente la replicación de los virus del dengue *in vitro* e indican la necesidad de determinar la eficacia de este fármaco contra las infecciones del virus del dengue *in vivo*. (Koff W. C., Elm, JR. J. L., and Halstead S. B. (July 1980) Inhibition of Dengue Virus Replication by Amantadine Hydrochloride, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 18, No. 1, p. 125-129).

Dominio III de la proteína E de DV

5

El dominio III (DIII) es de gran importancia funcional en la proteína E. Muchas de las mutaciones que determinan el escape a los anticuerpos neutralizantes o las alteraciones mediadoras del fenotipo viral (atenuación o determinantes de la virulencia) se correlacionan con las superficies superiores y laterales de este dominio. DIII se encuentra en la región C-terminal de cada monómero de proteína E y comprende los aminoácidos 294 a 392. Este dominio constituye la región más prominente en los viriones, en la que expone su cara lateral y se encuentra alrededor de los ejes de simetría 5X y 3X, teniendo cada 60 moléculas de DIII (Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann, M. G., Pletnev S. V., Corver J., Lenches E., Jones C. T., Mukhopadhyay S., Chipman P.R., Strauss E.G., Baker T.S. and Strauss J.H.

15 (2002) Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. Cell. 108: 717-725).

La estructura de DIII es similar a la de la región constante de las inmunoglobulinas. Está formado por un barril β con dos láminas beta antiparalelas, una compuesta por las cadenas A, B, C', D y E, y la otra por las cadenas C, F y G. La estructura terciaria de DIII depende, en gran medida extensión, en la presencia de un solo puente disulfuro,

- 20 formado entre 2 residuos de Cys que están estrictamente conservados entre todos los FV. La reducción de este puente disminuye o elimina la unión mediante anticuerpos neutralizantes específicos para DIII. Una gran cantidad de datos, obtenidos del análisis estructural de los viriones de proteínas E y DV, así como de la experimentación directa, indican que DIII es parte de la región en la proteína E que interactúa con los receptores celulares (Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC, Chang W (2004) An external loop region of domain III of dengue virus type 2
- 25 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. J Virol. 78.378-88, Crill WD, Roehrig JT (2001) Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. J Virol. 75:7769-73, Thullier P, Demangel C, Bedouelle H, Megret F, Jouan A, Deubel V, Mazie JC, Lafaye P (2001) Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism J Gen Virol. 82(Pt 8):1885-92).
- 30 Los estudios sobre las relaciones estructura-función de DIII también han empleado péptidos sintéticos. Por ejemplo, el péptido 386-397, que incluye la cadena beta G de DIII de DV2, es reconocido por el anticuerpo monoclonal neutralizante 3H5, que se sabe que interfiere con la unión del virus a las células e inhibe la hemaglutinación de los eritrocitos (Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG (1998) Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica Virology. 246:317-28). Sin embargo, varias mutaciones en esta región de la proteína E no
- 35 son perjudiciales para la unión de 3H5 (Hiramatsu K, Tadano M, Men R, Lai CJ (1996) Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence. Virology. 1996, 224:437-45), mientras que las mutaciones de los residuos E383, P384 y G385 abrogan esta unión. También se ha demostrado que el péptido 380-389, que corresponde al bucle F-G y parte de la cadena G, puede bloquear la interacción de DIII con células de
- 40 mosquito, pero no con células de mamífero (Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC, Chang W (2004) An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. J Virol. 78:378-88). Por otro lado, el péptido 306-314 de DV1, correspondiente a la cadena beta A, es reconocido por el anticuerpo neutralizante 4E11 (Thullier P, Demangel C, Bedouelle H, Megret F, Jouan A, Deubel V, Mazie JC, Lafaye P (2001) Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the
- 45 infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism J Gen Virol. 82(Pt 8):1885-92). Este péptido es capaz de inhibir la infección viral en células Vero cuando se usa a altas concentraciones (aproximadamente 500 μM).

Alfa 2-macroglobulina (A2M)

- El A2M humano pertenece a la familia de las macroglobulinas alfa, cuyos miembros comparten la característica de poder unir una amplia gama de péptidos, proteínas y partículas, lo que sirve como una línea de defensa humoral en el plasma y los tejidos de los vertebrados. Hay homólogos A2M humanos en la circulación de vertebrados e invertebrados, así como en la clara de huevo de aves y reptiles (Borth W. (1992) Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. 6:3345-53).
- A2M humana es una glicoproteína formada por cuatro subunidades de 180 kDa cada una, formando un homotetrámero de 720 kDa. Esta proteína se sintetiza en diferentes tipos celulares, por ejemplo fibroblastos pulmonares, monocitos/macrófagos, hepatocitos y astrocitos. Existen cinco sitios reactivos por subunidad: 1) La región "cebo", un tramo de 25 aminoácidos localizado aproximadamente en el medio de cada subunidad, que puede escindirse mediante proteasas que pertenecen virtualmente a cualquier clase mecanicista, producida por el hospedador o por cualquier entrante microorganismo; 2) Un enlace tioéster entre las cadenas laterales de una

cisteína y una glutamina, que puede escindirse por altas temperaturas, la presencia de pequeños nucleófilos como aminas primarias, agentes reductores o agua; 3) El sitio de unión al receptor, compuesto por aminoácidos Cterminales de cada subunidad, que se expone solo después de la escisión del enlace tioéster; 4) Un sitio de unión de transglutaminasa, localizado 20 aminoácidos antes de la región de "cebo" y 5) un sitio de unión de Zn²⁺.

- 5 El A2M humano inhibe un gran número de enzimas proteolíticas involucradas en una amplia gama de procesos biológicos tales como la fibrinólisis, la coagulación, la digestión, la respuesta inmune y el crecimiento de tejido invasivo. La escisión de la región de "cebo" por una proteasa induce un cambio conformacional en A2M que está estrechamente acoplado a la hidrólisis del enlace tioéster, como resultado de lo cual A2M atrapa la proteasa dentro de su nueva conformación. El resultado neto de este proceso es que A2M evita el acceso de sustratos grandes al
- sitio activo de la proteasa. Este cambio conformacional también expone la región de unión del receptor en cada subunidad del tetrámero y, por lo tanto, los complejos A2M-proteasa se eliminan rápidamente de la circulación por endocitosis mediada por receptor (Gonias SL, Balber AE, Hubbard WJ, Pizzo SV (1983) Ligand binding, conformational change and plasma elimination of human, mouse and rat alpha-macroglobulin proteinase inhibitors. Biochem J. 1. 209:99-105).
- Además de su papel como regulador proteolítico, A2M también está involucrado en muchos procesos, debido a su capacidad para unir varias moléculas diferentes y luego liberar esta carga en diferentes etapas a lo largo de la ruta endocítica. Las funciones de A2M como proteína portadora se han asociado al transporte de la vía endocítica al citoplasma, la transcitosis y la degradación con o sin la participación de la maquinaria de presentación del antígeno (Pizzo Salvatore V, Gron Hanne (2004) Immune response modulator alpha-2 macroglobulin complex, US6403092).
- Se ha descubierto que la naturaleza de la interacción química con A2M es un determinante clave para el destino celular final del péptido o proteína de carga. Las interacciones reversibles permiten que la carga asuma un rol biológico una vez disociado del complejo en las primeras etapas de la ruta endocítica, mientras que las proteínas o péptidos irreversiblemente unidos generalmente alcanzan los compartimientos lisosómicos, donde se degradan (Borth W. (1992) Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics The FASEB
- 25 journal 6:3345-53).

El receptor de macroglobulina alfa-2

El receptor A2M (A2MR), también conocido como proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y como CD91, se ha relacionado con numerosos papeles fisiológicos de vital importancia, como el metabolismo de los lípidos, la hemostasia, la activación de enzimas lisosomales y neurotransmisión.

A2MR es un heterodímero formado por una cadena α extracelular de 500 kDa, unida no covalentemente a una cadena β de 85 kDa transmembrana. La cadena α contiene cuatro grupos de 2, 8, 10 y 11 sitios de unión a ligandos ricos en Cys similares a complemento. Después de cada grupo de sitios de unión a ligando, hay un dominio similar a EGF formado por regiones ricas en Cys y dominios YWTD. La cola citoplásmica de la cadena tiene dos motivos NPxY que son reconocidos por las proteínas adaptadoras implicadas en la señalización y la endocitosis (Herz J, Strickland DK. (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. J Clin Invest. 108:779-84).

A2MR reconoce al menos 30 ligandos diferentes que pertenecen a diferentes familias de proteínas que incluyen lipoproteínas, proteasas, complejos inhibidores de proteasas, proteínas de matriz extracelular, toxinas bacterianas, virus y varias proteínas intracelulares. Los estudios dirigidos a detallar las características de las interacciones de estas moléculas con A2MR han revelado que la capacidad del receptor para el reconocimiento de una amplia gama de licendos, proteínas per tendes per tendes per tendes de las proteínas de las características de una amplia gama de licendos.

40 de ligandos es proporcionada por la presencia de los 31 sitios de unión de ligandos, presentando cada uno una superficie de interacción única. Una interacción de alta afinidad con el receptor, por lo tanto, implica la unión simultánea a varios sitios de unión al ligando.

El A2MR humano también reconoce ligandos de otras especies, con constantes de afinidad similares a los que se muestran para los ligandos endógenos.

45 Descripción detallada de la invención.

La interacción de los virus con sus receptores celulares es un determinante principal de la infectividad. La obtención de compuestos que bloquean las interacciones entre los virus y los receptores puede conducir al desarrollo de potentes fármacos antivirales.

- En el caso de DV, se ha demostrado que existe una alta correlación entre la viremia y la gravedad de la enfermedad.
 La obtención de un fármaco antiviral eficaz capaz de disminuir las cargas virales en los pacientes infectados es, por lo tanto, una estrategia muy atractiva para el control de las formas graves de la enfermedad. Sin embargo, el desarrollo de fármacos antivirales para DV basado en el bloqueo de las interacciones entre virus y receptores se ha visto obstaculizado por la falta de conocimiento de la identidad del receptor que media la endocitosis del virus, la naturaleza de la interacción y los determinantes del reconocimiento.
- La presente invención se basa en los hallazgos de que DIII de la proteína E de DV2, cepa Jamaica (Seq. ID.1) puede formar complejos unidos de manera reversible con A2M del plasma humano (Sec. ID. 2), y que el bloqueo del

receptor A2MR (Sec. ID. 3) por medio de anticuerpos anti-receptor o ligandos competitivos puede inhibir la infección por DV de células de mamífero. El primero sugiere que A2M, en este contexto, funciona como una proteína portadora del virus al receptor A2MR, que sirve como uno de los medios para la entrada viral a la célula a través de la endocitosis mediada por este receptor.

- 5 A2M y su receptor, A2MR, están ampliamente distribuidos en diferentes tejidos y organismos, donde se han encontrado homólogos para estas proteínas. Ambas moléculas (A2M y A2MR) han evolucionado a partir de familias de proteínas ancestrales. Dado que existe un alto grado de homología de secuencia estructural y de aminoácidos entre los miembros de cada familia, la actividad de estas moléculas como receptores de DV está potencialmente presente en una gran variedad de tipos de células y organismos. Además, dada la alta similitud entre los dominios de unión de ligandos de los diferentes miembros de la familia de receptores de LDL, es posible inferir la existencia
- de unión de ligandos de los diferentes miembros de la familia de receptores de LDL, es posible inferir la existencia de una interacción entre DV y otros receptores pertenecientes a esta familia.

Como ejemplo, los miembros de la familia menor de los rinovirus usan diferentes miembros de la familia de receptores de LDL como receptores celulares; en este caso, son el receptor de lipoproteínas de baja densidad, el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad y LRP1 (Hofer F, Gruenberger M, Kowalski H, Machat H, Huettinger

- M, Kuechler E, Blass D (1994) Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minorgroup common cold virus. Proc Natl Acad Sci 1; 91:1839-42). Se sabe que las proteínas superficiales de esta familia viral que interactúan con sus receptores pueden unirse, con diferentes afinidades, a los miembros de la familia del receptor de LDL de las células de los primates y murinos, y se ha establecido que tales interacciones median la entrada viral en estos tipos de células.
- También hay un alto grado de homología estructural y de secuencia entre las proteínas E de diferentes FV y, por lo tanto, otros FV podrían usar A2MR u otros receptores de la familia de receptores de LDL. El género Flavivirus comprende más de 70 virus, muchos de los cuales son potentes patógenos humanos. Las enfermedades causadas por las infecciones flavivirales se caracterizan por síntomas febriles que pueden tener manifestaciones hemorrágicas, encefalitis y complicaciones hepáticas. Además de los cuatro serotipos de DV, otros miembros conspicuos del género con importancia para la salud humana son el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el virus de la encefalitis del valle Murray y el

virus del oeste del Nilo.

La invención proporciona un método para seleccionar e identificar un compuesto que protege contra una infección causada por un flavivirus de acuerdo con la reivindicación 1.

- 30 Basándose en los hallazgos mencionados anteriormente, se describe aquí un método para bloquear la infección de células por DV basado en la interferencia de la interacción del virus con el receptor A2MR. Alternativamente, es posible modular la infección por DV interfiriendo la interacción con A2M humano. En este contexto, interferir la interacción con el receptor o con A2M significa reducir o aumentar esta interacción. La reducción de la interacción abortaría la infección viral en una etapa muy temprana, ya que el virus no ingresaría a la célula; por otro lado, el
- 35 aumento o potenciación de esta interacción impediría la liberación del virus endocito al comienzo de la acidificación endosomal, afectando los eventos de fusión de la membrana y la liberación del ARN viral. Ambos tipos de interferencia han sido efectivos para la neutralización de la infectividad de otros virus.

La unión de DV a las células puede interferirse mediante moléculas que interactúan con cualquiera de las dos superficies implicadas en este evento: la superficie interactuante de la proteína E o la superficie interactuante del receptor A2MR. Del mismo modo, es posible interferir con la unión de DV a las células mediante el uso de moléculas que se unen a la superficie de la interacción del A2M humano con la proteína viral.

Específicamente, la presente invención muestra que la proteína conocida como Proteína Asociada al Receptor (que se denominará RAP de ahora en adelante), que constituye uno de los ligandos naturales de A2MR, así como los anticuerpos contra este receptor, son capaces de inhibiendo la infección por DV de células Vero.

- 45 Por lo tanto, un agente para interferir la interacción de DV con el receptor A2MR puede consistir en un ligando del receptor purificado de fuentes naturales u obtenido mediante técnicas de ADN recombinante; o puede consistir en una variante soluble purificada del receptor que comprende su parte extracelular (la región comprendida entre los residuos 20 a 4419 en la secuencia mencionada en la secuencia que se enumera como Seq. ID. 3) o un fragmento derivado de esta parte que todavía está capaz de unirse a DV. Preferiblemente, dicho fragmento comprenderá un
- 50 segmento correspondiente a uno de los dominios de unión de ligando de este receptor (regiones comprendidas entre los residuos 25 a 66, o 70 a 110, o 852 a 892, o 893 a 933, o 934 a 973, o 974 a 1013, o 1014 a 1053, o 1060 a 1099, o 1102 a 1142, o 1143 a 1182, o 2522 a 2563, o 2564 a 2602, o 2603 a 2641, o 2642 a 2690, o 2694 a 2732, o 2733 a 2771, o 2772 a 2814, o 2816 a 2855, o 2856 a 2899, o 2902 a 2940, o 3332 a 3371, o 3372 a 3410, o 3411 a 3450, o 3451 a 3491, o 3492 a 3533, o 3534 a 3572, o 3573 a 3611, o 3612 a 3649, o 3652 a 3692, o 3693 a
- 55 3733, o 3739 a 3778, de la secuencia identificada en la lista de secuencias como Seq. ID. 3). Un agente interferente también puede consistir en un ligando sintético, desarrollado para este propósito. Un ejemplo de este último sería un péptido sintético desarrollado usando métodos conocidos en la técnica, en base a la información proporcionada por la presente invención.

Los métodos basados en informática se han convertido en herramientas poderosas para el diseño de fármacos. Estos métodos tienen la ventaja de poder evaluar grandes cantidades de compuestos, por lo cual proporcionan grandes ahorros en tiempo y trabajo experimental. El uso exitoso de estos métodos requiere la disponibilidad de datos sobre la estructura tridimensional de las proteínas y ligandos involucrados en la interacción para ser afectados. Cualquier dato experimental que ayude a definir la superficie de la interacción en cualquiera de las moléculas que reaccionan es también una ayuda inestimable en este contexto.

Teniendo en cuenta el estado del arte en técnicas computacionales para el desarrollo de fármacos basados en acoplamiento molecular, los hallazgos descritos en la presente invención sobre el papel de A2M y su receptor A2MR en la entrada celular de DV proporcionan un objetivo para experimentos de exámenes virtuales para compuestos que inhiben esta interacción, como potenciales fármacos antivirales o potenciales para su desarrollo. Las estructuras

- 10 que inhiben esta interacción, como potenciales fármacos antivirales o potenciales para su desarrollo. Las estructuras tridimensionales del ectodominio de la proteína E y del virión DV están disponibles, y también lo están las coordenadas estructurales del dominio que median la unión de A2M a A2MR, así como las de varios dominios de unión de ligandos de los miembros de la LDL familia receptora Por otro lado, la presente invención también define aminoácidos que participan en la interacción de DV con su receptor celular, y proporciona información sobre los
- 15 determinantes estructurales para esta interacción.

5

30

35

Por lo tanto, un medio para obtener las secuencias de péptidos sintéticos y/o la estructura de moléculas pequeñas que pueden interferir la interacción de DV con el receptor A2MR puede ser el uso de métodos teóricos que implícitamente emplean uno o varios métodos de modelado computacional y modelos de la estructura tridimensional de DIII, así como de cualquiera de los dominios de unión al ligando del receptor A2MR. Empleando cualquiera de

- 20 estos métodos para el modelado computacional y basándose en las coordenadas espaciales para la estructura de DIII, es posible modelar la columna vertebral de una cadena polipeptídica formando una horquilla beta antiparalela que incluye un giro beta en la cadena de conexión entre ambos hilos. Además, es posible modelar las cadenas laterales del polipéptido de tal manera que la identidad química de estas cadenas, así como su conformación, conduzcan a contactos atómicos energéticamente favorables. También es posible explorar computacionalmente el
- 25 espacio de secuencia, así como el espacio conformacional del péptido, los rotámeros de las cadenas laterales y seleccionar las cadenas laterales más favorables usando como criterio una evaluación energética de los modelos, que es predictiva de mayor afinidad por la interacción péptido-proteína.

Las coordenadas del modelo de interacción de DIII con uno y/o varios dominios de unión a ligando del receptor A2MR pueden obtenerse a través de medios experimentales, usando técnicas de difracción de rayos X y/o RMN, o usando el modelado computacional.

También es posible utilizar un método computacional de acoplamiento molecular para reproducir los detalles atómicos de la interacción entre los péptidos correspondientes a la horquilla FG beta de DIII de la proteína E de diferentes flavivirus y los dominios de unión a ligando del receptor A2MR. Del mismo modo, es posible seleccionar de una base de datos de estructuras moleculares aquellos compuestos que reproducen las características de esta interacción, lo que constituiría, por lo tanto, posibles inhibidores para el bloqueo de las infecciones flavivirales.

Se pueden obtener otros agentes interferentes usando un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo seleccionado mediante cualquiera de los métodos disponibles en la técnica, por ejemplo por selección de bibliotecas de anticuerpos exhibidas en fagos. En este último caso, la selección puede implementarse de tal manera que propicie la obtención de una respuesta específica contra las regiones involucradas en las interacciones DV-A2MR o DV-A2M. Si la coloción de antica propiente de tal manera que propiciente de tal manera que propicita de tal manera que propiciente de tal maner

40 Si la selección se implementa de tal manera que se seleccione una respuesta contra la región de interacción de A2MR o A2M, la selección debe permitir la discriminación entre la interferencia de esta interacción y la interferencia con la funcionalidad fisiológica de estas moléculas.

Se describe aquí también un método para bloquear la infección de células por DV, basado en el uso de un agente que interfiere con la expresión del receptor A2MR. Utilizando la metodología disponible en el estado de la técnica para el desarrollo de fármacos antivirales, es posible deducir que un ejemplo sería el uso de un ARN interferente corto (ARNsi) que disminuye o elimina temporalmente la expresión del receptor A2MR.

También se describe aquí un método para la prevención o el tratamiento de la enfermedad causada por la infección por DV, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una molécula con actividad antiviral que interfiere con la interacción de DV con un receptor celular, en donde dicho celular receptor es el receptor celular
A2MR. La molécula con actividad antiviral, formulada en condiciones aceptables de acuerdo con las regulaciones actuales para preparados farmacéuticos, se puede administrar en una dosis efectiva antes de la infección o después de la aparición de los síntomas de la enfermedad, con un diagnóstico confirmatorio de laboratorio para la infección por DV.

La molécula con actividad antiviral contra DV puede emplearse como un fármaco profiláctico antes de la exposición en áreas de alto riesgo para la infección por DV. Un área de alto riesgo para la infección de DV es una región geográfica conocida por albergar el vector para la transmisión de DV, es decir, el mosquito *Aedes*, y donde se produce la circulación detectable de cualquier serotipo de DV.

También se describe aquí un método para prevenir y/o tratar la enfermedad causada por DV, que comprende el uso

de un agente que interfiere la interacción del virus con A2M humano.

La invención también proporciona un péptido para uso como un compuesto antiviral que bloquea la infección de células por flavivirus de acuerdo con la reivindicación 12.

- La invención también proporciona un uso in vitro de estos péptidos para la determinación de la susceptibilidad de 5 una célula y/o un organismo a la infección por el virus del dengue de acuerdo con la reivindicación 16. Se describe aquí un método para predecir la susceptibilidad de un tipo de célula específico para la infección de DV. Esta predicción puede hacerse mediante la prueba de la presencia del gen que codifica el receptor A2MR, donde el término gen incluye el segmento de ADN implicado en la producción de la cadena polipeptídica, así como las regiones anteriores y sucesivas y las secuencias intermedias (intrones) entre las secuencias de codificación 10 (exones).

El método comprende el uso de 20-50 pares de bases: polinucleótidos largos que se hibridan con las regiones diana seleccionadas en la secuencia del gen que codifica el receptor A2MR y que en lo sucesivo se denominará como sonda, en condiciones que permitan la detección de hibridando objetivos con una identidad de secuencia del 80 al 95% con la sonda. Los procedimientos utilizados para lograr una rigurosidad más alta (es decir, detección de

regiones con una identidad de secuencia de solo el 95% o superior a la sonda) son bien conocidos en la técnica. La 15 sonda utilizada para la hibridación puede ser capaz de determinar si el gen codifica una proteína que aún conserva toda la funcionalidad de un receptor DV.

La invención también proporciona un uso in vitro de un compuesto para la determinación de la susceptibilidad de un organismo a la infección por el virus del dengue de acuerdo con la reivindicación 19. También se describe aquí el uso de moléculas que se han desarrollado para la interferencia de interacción de DV con su receptor, para estimar la 20 susceptibilidad de un tipo celular específico a la infección por DV. El método consiste en la detección de la proteína A2MR en la superficie celular. Por ejemplo, en puede comprender el uso de un anticuerpo que reconoce el receptor A2MR, o uno de sus ligandos, o un péptido sintético que interactúa con el receptor, que se incuban con las células a ensayar, después de lo cual su unión a la superficie celular se detecta mediante cualquiera de las técnicas actuales en el estado de la técnica, como la citometría de flujo asistida por fluoróforo. Entre los ligandos que pueden usarse f

25 se encuentran A2M y RAP.

También se describe aquí un método para estimar la susceptibilidad de un tipo celular específico a la infección por DV, en base a la detección de la proteína A2MR. El método implica la obtención de una preparación que contiene la totalidad de proteínas celulares o una fracción subcelular. Las proteínas, previamente fraccionadas por electroforesis

- 30 en geles de acrilamida o no. se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y se detecta la presencia del receptor A2MR por medio de un anticuerpo que reconoce específicamente esta molécula, seguido de la detección del anticuerpo unido. Alternativamente, la membrana de nitrocelulosa que contiene las proteínas transferidas se incuba en una solución que contiene uno de los ligandos del receptor, por ejemplo A2M o RAP, y el ligando unido se detecta más tarde.
- 35 También se describe aquí un método para seleccionar e identificar un compuesto que protege contra la infección por DV, que comprende la determinación de la capacidad de los compuestos en evaluación para bloquear la interacción de DV con el receptor A2MR. Un método basado en este principio puede emplear preparaciones que contienen viriones DV o, alternativamente, el ectodominio de la proteína E de DV, o una proteína recombinante que comprende DIII de dicha proteína. El método implica la incubación del receptor A2MR conjuntamente con una preparación que
- 40 contiene DV y el compuesto cuya capacidad de bloqueo debe evaluarse, seguido de la estimación de la cantidad de virus unido y su comparación con la cantidad de virus unido en ausencia del compuesto probado. La detección se realiza, preferiblemente, usando el receptor unido o inmovilizado en una fase sólida, agregando la mezcla de viriones y el compuesto evaluado en solución.
- La preparación A2MR puede consistir en una muestra purificada de fuentes naturales, donde el receptor A2MR 45 representa, preferiblemente, al menos el 75% del contenido total de proteína de la muestra. Algunos ejemplos de fuentes naturales son homogeneizados de células/tejidos, o sobrenadantes de cultivo de cultivo celular o plasma humano. La preparación A2MR también puede consistir en una proteína recombinante que comprende la cadena α del receptor o un fragmento de la misma, que retiene la funcionalidad como receptor DV.
- Se describe aguí un método para seleccionar e identificar un compuesto que puede proteger contra la infección de DV, basándose en la determinación de la capacidad de los compuestos en evaluación para bloquear la interacción 50 de DV con A2M humano. Un método basado en este principio puede, alternativamente, emplear el ectodominio de la proteína E de DV, o una proteína recombinante que comprende DIII de dicha molécula. Con el fin de evaluar la actividad de los compuestos que se examinan, la sustancia en evaluación se incuba con A2M y se estima su capacidad para interferir la interacción con DV, o el ectodominio de la proteína E o DIII de la proteína E.
- 55 La invención también proporciona un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 y péptidos de acuerdo con la reivindicación 20.

Descripción de figuras

Figura 1. Caracterización de la preparación purificada de DIIIE2J. (A) Se cargaron 45 µg de DIIIE2J en una columna de fase inversa C4. La ejecución cromatográfica se realizó a 37°C, utilizando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento equipado con 2 bombas y un controlador. La elución de la proteína se logró aplicando un gradiente lineal de 10 a 60% (v/v) de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v) a un flujo de 0.8 mL/min, detectándose

- 5 a 226 nm. (B) Análisis en SDS-PAGE al 15%. Línea 1: Marcadores de peso molecular. Línea 2:12 μg de la preparación purificada de DIIIE2J, diluida 1:1 en regulador de muestra no reductor. Las bandas de proteínas se tiñeron siguiendo la metodología descrita por Heukeshoven, J. y Dernick, R., (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis 6: 103-112.
- Figura 2. Determinación de la masa molecular y del estado del puente disulfuro mediante espectrometría de masas.
 (A) Secuencia de aminoácidos pronosticada a partir de la secuencia de ADN del fragmento clonado. (B) Masa promedio esperada calculada a partir de la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína, suponiendo que la metionina N-terminal no se elimina (Met¹) o se elimina completamente (Ala²). RCM: Masa media esperada de la proteína Ala² después de la incorporación de yodoacetamida en cada residuo de cisteína. (C) Espectro de masa desconvolucionado para DIIIE2J. Nativo: Proteína no modificada, recogida de rp-HPLC. +IAA: Proteína incubada
- 15 durante 30 min. a 25°C con yodoacetamida. +DTT +IAA: La proteína se incubó durante 2 horas a 37°C con DTT 10 mM, seguido de 30 min. incubación a 25°C con yodoacetamida.

Figura 3. Siembra de puntos para el análisis de la antigenicidad de DIIIE2J con anticuerpos murinos y humanos. Las filas contienen las diferentes preparaciones utilizadas para sensibilizar la membrana de nitrocelulosa, mientras que las columnas representan la disposición de las diferentes preparaciones de anticuerpos. C⁺: Preparaciones de antígeno viral del serotipo 2, obtenido por el método de sacarosa-acetona (Clarke D.H. and Casals J. (1958).

- 20 antígeno viral del serotipo 2, obtenido por el método de sacarosa-acetona (Clarke D.H. and Casals J. (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 7: 561-573) de homogeneizados cerebrales de ratones lactantes OF1 inoculados intracranealmente. C⁻: homogeneizados cerebrales de ratones lactantes OF1 no inoculados, procesados por el método de sacarosaacetona.
- Figura 4. Reconocimiento de DIIIE2J, inmovilizado covalentemente en un gel cromatográfico, mediante anticuerpos anti-DV2. Se incubaron alícuotas de veinte microlitros del gel de afinidad con DIIIE2J como ligando con diferentes preparaciones de anticuerpo durante 30 minutos a 25°C. La fracción no unida se eliminó mediante centrifugación a baja velocidad y el gel se lavó extensamente con PBS a pH 7.4, 0.1% Tween-20.
- Figura 5. Enlace directo entre A2M y DIIIE2J con ambas proteínas en solución. (A) Análisis de la calidad de la preparación de A2M purificado usado en los experimentos de unión directa. SDS-PAGE (10%) en condiciones no desnaturalizantes y no reductoras. Línea 1: Tinción con azul de Coomassie. Línea 2: Inmunoidentificación de inmunotransferencia de tipo Western, que emplea una preparación A2M antihumana policional (Sigma, Estados Unidos). (B-F): Perfiles cromatográficos de las pistas de filtración en gel utilizadas para separar las diferentes especies. Una columna Superdex 200 HR 10/30, equilibrada en NaHPO₄ 50 mM pH 7.0, regulador de NaCl 300 mM, so utilizá en todo. La elegueirán so realizá a un fluio de 0.4 ml (min, y so controló a 280 mm, las muestras en solar en todo.
- 35 se utilizó en todo. La ejecución se realizó a un flujo de 0.4 mL/min, y se controló a 280 nm. Las muestras se cargaron en un volumen de 200 μl. (A) 100 μg de DIIIE2J. (B) 70 μg de A2M no activado. (C) Se incubaron 100 μg de DIIIE2J durante 1 hora a 25°C con 70 μg de A2M no activado. (D) 70 μg de A2M_MeNH₂. (E) Se incubaron 100 μg de DIIIE2J durante 1 hora a 25°C con 70 μg de A2M A2M_MeNH₂. Las flechas indican, en cada cromatograma, las fracciones que se recogieron para su análisis posterior mediante SDS-PAGE. El asterisco marca el tiempo
- 40 correspondiente a la elución de un volumen de columna total. (G): Análisis por 12.5% de SDS-PAGE de la especie de proteína presente en las fracciones recogidas de las diferentes series cromatográficas. Las muestras recogidas de cada serie se precipitaron con acetona, y los pellets se resuspendieron en 15 µl de muestra regulador y se sometieron a electroforesis. La letra del cromatograma correspondiente, así como la descripción de la muestra cargada, se indica en la parte superior de cada línea. La flecha indica la posición de la banda DIIIE2J en el gel.
- Figura 6. Enlace directo entre DIIIE2J y A2M, medido por Biacore. Curvas de respuesta obtenidas durante y después de la inyección de (B) anticuerpos monoclonales contra DV serotipo 2 (3H5) y contra todo FV (4G2); (C) Preparaciones de anticuerpos policlonales de ratón obtenidas por inmunización con DV1 y DV2, incluidos sueros preinmunes y diluciones (D) A2M, a concentraciones de 0.3 µMol/L a 3 µMol/L. La ejecución se realizó en PBS a pH 7.4 a 25°C. Las diferentes diluciones A2M se cargaron a un flujo de 5 µl/min durante 20 min. La respuesta se representa en las unidades de resonancia (RU) corregidas por la unión inespecífica utilizando la respuesta del canal
- sin proteína inmovilizada (menos del 5% de la señal específica).

Figura 7. Inhibición de la unión de DIIIE2J a células Vero por A2M y RAPR13. Las células pre-fijadas se incubaron con las proteínas fluoresceinizadas, y la intensidad de la fluorescencia debida a la unión de los ligandos fluoresceinados a las células se midió mediante citometría de flujo. Cada punto experimental representa los datos recopilados de un mínimo de 20 000 células. (A) Unión de A2M y RAPR13 a las células. Los valores representados corresponden al promedio de la intensidad de la fluorescencia en cada punto del ensayo menos la fluorescencia obtenida con las células no tratadas. (B) y (C) Las células se incubaron con DIIIE2J fluoresceinado en presencia o

ausencia de los ligandos no fluoresceinados, utilizando la relación molar indicada en cada caso. El % de unión se calculó a partir de la relación de la intensidad media de la fluorescencia de las células incubadas con la mezcla de DIIIE2J fluoresceinado más las proteínas, entre la de las células incubadas solo con DIIIE2J fluoresceinado.

Figura 8. Efecto del RAP recombinante sobre la infección de células Vero con DV2, cepa S16803. Las monocapas Vero a una confluencia del 90% se preincubaron con diferentes diluciones de RAPR13 o BSA, durante 1 hora a 37°C, seguido de la adición de la preparación viral a una multiplicidad de infección de 1 y otra incubación a 37°C por 1 hora. Después de eliminar los virus no unidos, se añadió medio MEM suplementado con aminoácidos no conservição a 1% de COC y 1% de CMC y las adivas as incubaron durante 5 días o 27°C.

5 esenciales, 1% de FCS y 1% de CMC, y las células se incubaron durante 5 días a 37°C. Las placas líticas se visualizaron tiñendo la monocapa con Naphtol Blue Black. Los ensayos se realizaron en placas de 24 pozos, utilizando duplicados para cada punto del ensayo.

Figura 9. Alineación de secuencia múltiple de los dominios de unión a ligando del receptor A2MR (SEQ ID. 3, LRP1_human en el banco de datos SwissProt). La alineación se realizó utilizando la aplicación ClustalX (Higgins D., Thompson J., Gibson T.Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). Las flechas indican los residuos que pertenecen a los parches de unión al ligando. La parte inferior de la figura muestra una representación esquemática del grado de conservación por residuo.

- Figura 10. Modelo tridimensional de la estructura de DIII de la proteína E de DV. (A) DV1, (B) DV2, (C) DV3 y (D) DV4. Los parches cargados positivamente en la superficie de DIII están sombreados, utilizando parches ovales en dos tonos grises: gris oscuro en la superficie de la hoja beta definida por las cadenas A, B, C', D y E, y gris claro para los parches en la superficie correspondiente o adyacente a la horquilla beta de FG (ver figura 10A).
- Figura 11. Diseño de los péptidos para bloquear la infección por DV, en función de la horquilla beta de FG. (A)
 Representación esquemática de la estructura tridimensional de DIII de DV2. El esquema enfatiza los elementos de la estructura secundaria. (B) Superposición estructural de los modelos para la estructura terciaria de DIII de los cuatro serotipos de DV. Los modelos se representan con diferentes tonos grises para los diferentes serotipos del virus. (C) y (D) Modelos tridimensionales de la estructura de los péptidos HDIII2CL y HDIII3CL, respectivamente.
- Figura 12. (A) Secuencia de los péptidos diseñados para imitar diferentes regiones en la superficie de DIII. La numeración de residuos corresponde a la secuencia para la proteína E de DV serotipo 2, cepa Jamaica 1409, disponible en el banco de datos Swiss-Prot (http://www.ebi.ac.uk/swissprot) con el número de acceso P07564. Los residuos subrayados no están presentes en la proteína E y se introdujeron durante el diseño. Los residuos de cisteína se usan para restringir la movilidad estructural del péptido mediante un puente disulfuro. (B) Reconocimiento del péptido HDIII2Cs por el anticuerpo neutralizante 3H5 en un ensayo de transferencia de Western. Se sometieron
- 30 a electroforesis 50 μg de los conjugados de péptido BSA y 20 μg de la proteína recombinante PD5 en un gel de SDS-PAGE al 12.5% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo, la membrana se incubó con una dilución (30 μg/ml) del mAb 3H5 durante 2 horas a 25°C. El anticuerpo unido se detectó con un conjugado anti-IgG-peroxidasa de ratón y las transferencias se desarrollaron usando quimioluminiscencia. (C) Se sensibilizaron dos piezas de membrana de nitrocelulosa en paralelo con 10 μg de cada variante de la proteína y de
- 35 los péptidos. Una membrana se incubó con mAb 3H5 a una concentración de 30 µg/mL, y el segundo se incubó con sueros combinados de ratones inmunizados con un conjugado HDIII2Cs-KLH. La detección de los anticuerpos unidos se realizó en las mismas condiciones usadas para el ensayo de transferencia Western. RCM: proteína/péptido reducido y carbamidometilado.
- Figura 13. Reconocimiento del virus por el suero anti-HDIIIE2Cs. (A) Los homogeneizados de las células Vero,
 infectados con DV2 o no infectados, se sometieron a electroforesis con SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo, las membranas se incubaron con las siguientes preparaciones de anticuerpos: (A.A) mAb 3H5 a 30 µg/mL, (A.B) Suero preinmune de los ratones inmunizados con el conjugado HDIIIE2Cs-KLH, diluido 1/100 y (A.C) Sera de ratones inmunizados con cinco dosis del conjugado HDIIIE2Cs-KLH, diluidos 1/100. (B) Inmunoprecipitación de ³⁵S_DV2 con sueros de ratones inmunizados con diferentes péptidos DIII.
 Se usó una dilución 1/100 de los sueros combinados de ratones inmunizados con los conjugados péptido-KLH
- 45 Se usó una dilución 1/100 de los sueros combinados de ratones inmunizados con los conjugados péptido-KLH (después de la quinta dosis). Línea 1. Suero anti-pepDIII-1. Línea 2. Sueros anti-HDIIIE2Cs. Línea 3. Sueros anti-pepDIII-2. Línea 4. Regulador de inmunoprecipitación, sin muestra, y Línea 5. Suero humano agrupado reactivo con DV2.
- Figura 14. Reconocimiento de la proteína PD5 por los sueros obtenidos de ratones inmunizados con conjugados péptido-KLH. Las placas de múltiples pozos se recubrieron con 0.5 µg/pozo de proteína total de las diferentes variantes: no modificadas (no mod.), reducidas y carbamidometiladas (RCM) y carbamidometiladas sin reducción previa de sus puentes disulfuro (CM). Los sueros agrupados de cada grupo, diluidos 1:100, se incubaron durante 2 horas a 37°C en PBS-T, pH 7.4. Ambos ensayos se desarrollaron con un conjugado IgG-HRP anti-ratón (diluido 1:1000), usando H₂O₂/OPD como sustratos para la peroxidasa. La reacción enzimática se detuvo después de 20 minutos mediante la adición de 2.5 mol/L de H₂SO₄, y la absorbancia se midió a 492 nm. Los datos sobre la secuencia de los péptidos y la región de DIII de DV que comprenden pueden encontrarse en las figuras 9 y 11.

Figura 15. Representación de la región de DIII de la proteína E de DV incluida en los péptidos diseñados. Las secuencias representadas son las correspondientes a los aminoácidos 299-318 y 359-397 (numeración de secuencias de DV2) de DIII de DV1 (DIII_DV1) y DV2 (DIII_DV2). 3H5pept es un péptido reportado en la literatura como parte del epítopo reconocido por mAb 3H5 (Trirawatanapong T, Chandran B, Putnak R, Padmanabhan R

(1992) Mapping of a region of dengue virus type-2 glycoprotein required for binding by a neutralizing monoclonal antibody. Gene. 116:139-50). Los aminoácidos adicionales, no presentes en la secuencia original pero introducidos durante el diseño, se representan en gris. Se usaron dos residuos de cisteína para introducir un puente de disulfuro que restringiría la libertad conformacional del péptido. La lisina N-terminal se introdujo para permitir la conjugación

- 5 covalente de los péptidos a proteínas portadoras, y el residuo de β-alanina se incluyó como un espaciador. Se incluyen en el recuadro gris las secuencias de péptidos lineales utilizados en los informes precedentes en la literatura, DV2-1, DV1-1, DV2-2, DV2-3 (Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC, Chang W (2004) An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. J Virol. 78:378-88) and P'1 (Thullier P, Demangel C, Bedouelle H, Megret F,
- 10 Jouan A, Deubel V, Mazie JC, Lafaye P (2001) Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism J Gen Virol. 82(Pt 8):1885-92). Una representación tridimensional de la región abarcada por los péptidos (destacada en negro) sobre la estructura de DIII se encuentra en la parte inferior de la imagen.
- Figura 16. Unión de los péptidos HDIII2CL y HDIII3CL a la superficie de las células blancas de la sangre humana
 periférica. Las células, aisladas por lisis de eritrocitos, se lavaron con PBS a pH 7.4, albúmina de suero bovino al 1% (BSA), NaN₃ al 001%, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM y se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS a pH 7.4. Después del lavado, las células se incubaron con las diluciones del péptido durante 30 min. a 4°C en PBS a pH 7.4, 1% de BSA. La unión de los péptidos se detectó con un conjugado estreptavidina-FITC, utilizando citometría de flujo. Control celular: células fijas no tratadas con péptido o conjugado.
- Figura 17. Inhibición de la infección de las células Vero con DV1 y DV2. (A) Se incubaron placas de seis pozos con una monocapa a aproximadamente el 90% de confluencia durante 30 min. a 37°C con diluciones de los péptidos en medio MEM. A continuación, se añadió una dilución de la cepa DV1 West Pac 74 o la cepa DV2 S16803, calculada para obtener un promedio de 100 placas líticas por pozo, y las placas se incubaron durante 30 min. a 37°C con la mezcla de virus/péptido. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces, se recibió la adición de medio
- 25 MEM suplementado con aminoácidos no esenciales, 1% de suero de ternera fetal, 1% de CMC y finalmente se incubaron durante 5 días a 37°C bajo atmósfera de CO₂. (B) Efecto inhibitorio de los péptidos a 100 µMol/L. NRpep: péptido no relacionado. Los datos sobre la secuencia de los péptidos 3H5 pept, pepDIII-1, HIII2CL y HIII3CL, así como en la región en la que se extienden sobre DIII de DV, se pueden obtener de la figura 11. El cálculo de los porcentajes de inhibición se describe en materiales y métodos. (C) Inhibición de la infección por DV2 mediante el
- 30 uso de concentraciones variables de péptidos. Las placas víricas se visualizaron mediante tinción con Naphtol Blue Black. Control celular: células no tratadas. Control de virus: células incubadas con el virus, pero sin péptido. Para ambos péptidos se obtiene una inhibición del 50% a concentraciones de 22 a 45 µMol/L.

Figura 18. Alineación de secuencia múltiple de los residuos correspondientes a la horquilla beta FG de FV de interés para la salud humana y animal. (YFV) Virus de la Fiebre Amarilla, (WNV) Virus del Nilo Occidental, (JAE) Virus de la Encefalitis Japonesa, (TBE) Virus de la Encefalitis Transmitida por Garrapatas, (KUNJ) Virus Kunjin, (POW) Virus Powasan, (LAN) Virus Langat, (MVE) Virus de la encefalitis del valle de Murray y (SLE) virus de la encefalitis de Saint Louis.

Figura 19. Efecto producido en la unión de A2M y RAPR13 a la superficie de las células Vero mediante incubación simultánea con los péptidos. Las proteínas A2M y RAP13 fluoresceinadas se incubaron durante 30 minutos. a 4°C
 con células Vero pre-fijadas en presencia de concentraciones variables de HIII2CL y 3H5pept para alcanzar las relaciones de péptido/proteína molar indicadas. La unión de los ligandos marcados se detectó mediante citometría de flujo.

Figura 20. Inhibición de la infección de las células Vero con DV por preincubación con A2M. Las preparaciones virales se incubaron durante 1 hora a 25°C (A y C) o el tiempo indicado (B) con las proteínas por ejemplo, A2M activado (A2Mact), A2M no activado (A2M no act) y una proteína no relacionada (NR). Las mezclas de las proteínas con el virus se agregaron a monocapas de células Vero y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las monocapas celulares se lavaron para eliminar el virus no unido. A continuación, se añadió medio MEM complementado con aminoácidos no esenciales y 1% de FBS, 1% de CMC y las células se incubaron durante 5 días a 37°C en una incubadora de CO₂. Para visualizar las placas virales, las células Vero se tiñeron usando Naphtol Blue Black. Todos los puntos experimentales se realizaron en duplicados.

Figura 21. Perfil cromatográfico de la purificación de A2MR usando cromatografía de afinidad con A2M inmovilizado (A) y análisis de fracciones SDS-PAGE eluidos usando un gel de gradiente de 5-15% (B). Efecto de la preincubación de las fracciones cromatográficas con DV2 sobre la infección de las células Vero (C). El ensayo de neutralización de reducción de placa se realizó como se describe en la figura 20. (D) Análisis de protección de ratones usando el modelo de encefalitis inducida por DV.

Figura 22. Análisis de protección de ratones utilizando el modelo de encefalitis inducida por DV. Enlace de GAGs de PepNR: péptido formado por un fragmento de secuencia de unión a glicosaminoglicanos y un fragmento de secuencia no relacionado.

Ejemplos

Materiales y métodos

Electroforesis de proteína desnaturalizante (SDS-PAGE)

A., Willm, M., Vorm, O. y Mann, M., (1996). Anal. Chem. 68: 850-858).

Se usaron geles de poliacrilamida de acuerdo con las condiciones estándar descritas por (Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685). Las muestras de proteína se diluyeron en regulador de muestra (SDS al 1%, Tris-HCl 0.3 M, pH 6.8). Para el análisis en condiciones reductor se siguió el mismo procedimiento, pero se añadió β-mercaptoetanol a una concentración final de 2 mM en el regulador de muestra, y se calentaron las muestras durante 2 min. a 95°C. Las corridas electroforéticas se realizaron a 20 mA en Tris-HCl 0.25 M, regulador de glicina 1.92 M, pH 8.3 y SDS al 1%. Se emplearon las metodologías estándar para la tinción con azul de Coomassie o plata. Los geles destinados a la separación electroforética de proteínas que se analizarán más tarde mediante espectrometría de masas se tiñeron siguiendo el procedimiento de tinción con plata sin glutaraldehído, que es compatible con esta técnica (Shevchenko,

Inmunoprecipitación Western

Las proteínas, una vez separadas por electroforesis, se transfirieron del gel a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL de 0.45 μm (Amersham, Reino Unido) en una celda de transferencia subacuática (Towbin H., Staehelin T. and Golden J. (1979). Electroforetic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350-4354). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (p/v) en PBS a pH 7.4, Tween-20 al 0.1% por incubación durante 1 hora a 25°C, bajo agitación constante. Posteriormente, se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo

- 20 correspondiente diluido en PBS a pH 7.4, Tween-20 al 0.1% y leche desnatada al 5%. Después de enjuagar con abundante PBS a pH 7.4, Tween-20 al 0.1%, la membrana se incubó luego durante 1 hora a 25°C con el conjugado de peroxidasa adecuado, dependiendo de la especie de la que se habían obtenido los anticuerpos. Los conjugados en todos los casos se obtuvieron de Amersham (Reino Unido) o Sigma (Estados Unidos). El sustrato de peroxidasa utilizado para visualizar las especies reactivas se indica en los respectivos títulos de la figura.
- 25 Siembra de puntos

Se sensibilizaron dos piezas de membrana de nitrocelulosa con cantidades equimolares de DIIIE2J y BSA durante 1 hora a 25°C. Ambas membranas incluyeron, como control para la reactividad antivirus de los anticuerpos, una preparación de antígeno viral del serotipo DV 2 con su control negativo correspondiente. Las membranas se bloquearon durante 1 hora, bajo agitación constante, a 25°C en PBS, Tween-20 al 0.1% que contenía leche

- 30 descremada al 5%. La incubación con las diferentes preparaciones de anticuerpos se realizó en PBS, 0.01% de Tween-20, 5% de leche desnatada durante 2 horas a 25°C. Al final de la incubación, las membranas se lavaron extensamente con PBS, Tween-20 al 0.01% y se incubaron con un conjugado anti-IgG-peroxidasa anti-ratón (Amersham, Reino Unido) en el caso de anticuerpos murinos, o un conjugado anti-IgG-peroxidasa humana (Sigma, EE.UU.) para los de origen humano, durante 1 hora a 25°C en ambos casos. Después de lavar por completo la
- 35 membrana por segunda vez, las membranas se desarrollaron usando el sistema de análisis Western Blotting de ECL (Amersham, Reino Unido) con película CP-G PLUS (AGFA, Bélgica) en un casete de autorradiografía FBXC 810 (Fisher Biotech, EE.UU.). Las películas se desarrollaron en un procesador automático para películas autorradiográficas (Hyperprocessor, Amersham, Reino Unido).

Inmovilización de proteínas en geles cromatográficos.

40 Se sometió a diálisis una parte alícuota de 10 mg de proteína purificada frente a NaHCO₃ 0.1 mol/L a pH 8.3, NaCl 0.5 mol/L. El acoplamiento de la proteína a un gel cromatográfico se logró mediante incubación con 1 mL de sefarosa activada con CNBr (Amersham, Reino Unido) durante 2 horas a 25°C. La proteína desacoplada se eliminó del gel por centrifugación a 500 x g durante 5 minutos. La eficacia del acoplamiento se estimó mediante la comparación de la concentración de proteína de la solución antes y después de la reacción. En todos los casos, aproximadamente el 95% de la proteína se inmovilizó.

Ensayo para la concentración de proteínas

Los ensayos para la determinación de la concentración de proteína se llevaron a cabo usando un kit a base de ácido bicinconínico (Pierce, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante para ensayos en placas de 96 pozos. La curva estándar se preparó con diferentes diluciones (0.025-2 mg/ml) de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, EE. UU.).

Inmovilización covalente en chips cm5.

Se usó un chip cm5 (Biacore, Suecia) para la inmovilización covalente de las proteínas DIIIE2J y LRP1. La inmovilización se llevó a cabo a 25°C, con un flujo de 5 µL/min y usando HBS (Biacore, Suecia) como regulador de ensayo. La superficie del chip se activó cargando 35 µl de 0.2 mol/L de N-etil-N'-(3-dietilamino-propil) carbodiimida (EDC) y 0.05 mol/L de N-hidroxisuccinimida (NHS). Posteriormente, las proteínas, disueltas en regulador de acetato de sodio 10 mM, pH 4.5, se cargaron en el sistema. Al final de la inmovilización, se cargaron 35 µl de etanolamina 1

55

M de pH 8 en el sistema para bloquear cualquier grupo activado libre restante. El canal que se usará como control negativo en cada caso recibió solo las inyecciones activadoras con la solución EDC:NHS y el bloqueo con etanolamina, empleando el mismo flujo y volumen de inyección. Los resultados se analizaron utilizando el 4.1 paquete de aplicaciones de software BIAevaluation (Biacore, Suecia).

5 Análisis por espectrometría de masas

10

Los espectros de masas se obtuvieron con un espectrómetro de masas híbrido con geometría octogonal QTOF-2TM (Micromass, Reino Unido), equipado con una fuente de ionización por electronebulización por aspersión en Z.

El software utilizado para la obtención y el procesamiento de los espectros fue MassLinx, ver. 3.5 (Waters, EE. UU.). El espectro ESI-MS de la mezcla de péptidos trípticos se descircunvoluyó usando MaxEntropy ver. 3.0 (Micromass, Reino Unido). Las aplicaciones de software de identificación empleadas fueron MASCOT y SeqTag.

Obtención de DIII de la proteína E de DV2, genotipo Jamaica (DIIE2J)

El dominio III de la proteína E de DV2 se obtuvo mediante técnicas de ADN recombinante, que expresan en la bacteria *Escherichia coli* un fragmento génico que codifica este polipéptido. Para este objetivo, dos oligonucleótidos con las secuencias **CATATG**GCCATGGACAAACTACAGCTC (SEQ ID. 19) y **CTCGAG**GCCGATGGAACTTCCTTT

- 15 (SEQ ID. 20), que llevan en sus extremos 5' las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción Nde I y Xho I respectivamente (en negrilla en las secuencias), se sintetizaron usando el método de fosforamidita (Beaucage SL, Caruthers MH, Deoxynucleoside phosphoramidites- A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis., Tetrahedron Letters, (1981), 22, 1859).
- Con estos oligonucleótidos, y utilizando como plantilla el plásmido p30-VD2 (Deubel V, Kinney RM, Trent DW, Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype. Virology, (1986), 155, 365) que contiene los primeros 2469 nucleótidos del genoma de la cepa Jamaica 1409 de DV2, se amplificó por PCR un fragmento de ADN que codifica para DIII de la proteína E PCR (Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science (1985), 230, 1350). Este
- fragmento se clonó en el vector pMOSBlue usando el kit de clonación de extremos romos pMOSBlue de Amersham, Reino Unido (RPN 5110), y luego se purificó por digestión del plásmido resultante con las enzimas Nde I y Xho I (Promega Benelux, bv, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, seguido de electroforesis en geles de agarosa a temperatura de fusión baja (Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, Estados Unidos). Este fragmento se ligó luego al plásmido pET22b+ (Novagen Inc., EE. UU.) digerido de forma idéntica, usando ADN ligasa T4
- (Promega Benelux, b.v., Países Bajos) en las condiciones especificadas por el fabricante.

Las mezclas obtenidas se transformaron en la cepa de *E. coli* XL-1 Blue (Bullock WO, Fernández JM, Short JM. XL-1Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli K12 strain with beta-galactosidase selection. Biotechniques 1987; 5:376-8) de acuerdo con Sambrook *et al.* (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular

- 35 cloning: A laboratory manual. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989) y los plásmidos resultantes presentes en las colonias obtenidas después del crecimiento en medio selectivo se analizaron mediante análisis de restricción. La secuencia de varios plásmidos recombinantes se verificó mediante secuenciación automática de Sanger, y se eligió una molécula representativa cuya secuencia coincide con la secuencia esperada y se denominó pET-iDIIIE2_J (SEQ ID. 21). Este plásmido codifica la síntesis intracelular, en *E. coli*, de DIII de la
- 40 proteína E de DV serotipo 2, cepa Jamaica 1409, bajo el control del promotor T7. La proteína obtenida, denominada DIIIE2J (SEQ ID. 22), contiene una secuencia de 6 histidinas consecutivas en su extremo C, introducidas como una etiqueta para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) (Sulkowski, E. (1985) Purification of proteins by IMAC. Trends Biotechnol. 3, 1-7).
- Con el fin de purificar DIIIE2J, el plásmido pET-iDIIIE2_J se transformó (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Nueva York, EE. UU.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989) en el BL21 (DE3) la cepa de E. coli (Studier, F. W. and B. A. Moffatt. "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J.Mol.Biol. 189.1 (1986): 113-30), y se usó una colonia bien aislada para inocular un cultivo de 50 mL de Luria Bertani suplementado con 50 µg/mL de ampicilina (LBA). El cultivo se desarrolló durante 12 horas a 30°C a 350 r.p.m. y luego se utilizó para inocular 1 L de medio LBA a una densidad
- 50 óptica inicial de 0.05 a 620 nm, que luego se desarrolló durante 8 horas a 28°C hasta la última fase exponencial e inducida por la adición de isopropiltiogalactósido (IPTG). El crecimiento se reanudó en las mismas condiciones durante 5 horas más.

El cultivo inducido se centrifugó a 5000 x g durante 30 min. a 4°C y la biomasa resultante se volvió a suspender en 30 mL de PBS y se rompió usando 3 ciclos en una prensa francesa a 1500 kg/cm². Después de centrifugar el homogeneizado a 10 000 x g durante 30 min. a 4°C, el sedimento, que contenía la proteína como cuerpos de inclusión, se solubilizó en 30 mL de PBS, hidrocloruro de guanidinio 6 M y se replegó DIIIE2J por dilución en PBS/imidazol 10 mM a una concentración final de proteína de 100 μg/mL.

El DIIIE2J replegado se purificó por cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (Sulkowski, E. (1985)

Purificación de proteínas por IMAC. Trends Biotechnol. 3, 1-7) usando Ni-NTA agarosa (Qiagen Benelux B.V., Países Bajos). Después de la unión, la proteína se eluyó lavando sucesivamente la columna con soluciones 50, 100 y 300 mMoL/L de imidazol en PBS a pH 7.4, 0.3 mol/L de NaCl como regulador. La proteína obtenida tiene una pureza mayor o igual al 90% según se evaluó mediante el análisis de escaneos digitales de los geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie, que se ejecutaron en condiciones desnaturalizantes, utilizando las rutinas densitométricas de la Imagen J ver. aplicación de software 1.35d (Rasband W., http://rsb.info.nih.gov/ij/).

Purificación de A2M humano

5

10

15

El A2M humano se purificó a partir de 380 mL de plasma humano, obtenido reuniendo muestras de plasma de donantes sanos que tenían entre 30 y 40 años de edad. El plasma se sometió a diálisis frente a agua desionizada con cambios frecuentes durante 72 horas a 4°C, el material insoluble se sedimentó por centrifugación a 10000 x g durante 30 min, y el sobrenadante se sometió a diálisis contra PBS pH 6 y se cargó en una columna XK 50/30 (Amersham, Reino Unido) empaquetado con 65 mL de flujo rápido de sefarosa quelante (Amersham, Reino Unido) previamente cargado con Zn²⁺ y equilibrado con PBS pH 6. La columna se lavó luego con PBS pH 6 hasta que la absorbancia del eluido a 280 nm disminuyó hasta los niveles de referencia, y la proteína unida se eluyó con regulador de acetato de sodio 10 mMol/L pH 5, NaCl 150 mM. La proteína eluida se concentró por ultrafiltración usando una membrana con un MWCO de 300 kDa y luego se cargó en un flujo de 2 mL/min en una columna de filtración en gel (26 x 51 cm) empaquetada con Superdex 200 (Amersham, Reino Unido) y se equilibró con PBS pH 7.8. La presencia de la proteína en la fracción con el peso molecular más alto se verificó mediante un ensayo de transferencia de Western, usando una preparación de anticuerpo A2M anti-humano policlonal (Sigma, EE. UU.). La activación del A2M purificado se logró mediante incubación con 200 mMol/L de metilamina en 50 mMol/L de fosfato

20 activación del A2M purificado se logró mediante incubación con 200 mMol/L de metilamina en 50 mMol/L de fosfato de sodio, 150 mMol/L NaCl, pH 7.4. El A2M_MeNH₂ obtenido se sometió a diálisis extensamente contra fosfato de sodio 50 mMol/L, NaCl 0.5 Mol/L a pH 7.8.

Obtención de la proteína recombinante humana LRPAP1 (RAP)

La proteína humana asociada al receptor LRP1, conocida como LRPAP1 o, más comúnmente en la literatura 25 científica, como RAP, se obtuvo mediante técnicas de ADN recombinante, que expresan en la bacteria Escherichia coli un fragmento génico que codifica esta molécula. Para este objetivo, el ARN total se purificó a partir de la línea celular monocítica humana THP-1 (Tsuchiya,S.; Yamabe,M.; Yamaguchi,Y.; Kobayashi,Y.; Konno,T.; Tada,K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), Int.J.Cancer 26(2):171) utilizando el protocolo descrito por Chomczynsky AND Sacchi (Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987) Single-step 30 method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 162(1):156); y este ARN se transcribió de manera inversa en ADNc con el kit de núcleo de ARN GeneAmp PCR de Perkin-Elmer (EE.UU., N808-0143), usando hexámeros aleatorios. El gen de la proteína LRPAP1 (RAP) se amplificó a partir del ADNc mediante PCR (Saiki,R.K.; Scharf,S.; Faloona,F.; Mullis,K.B.; Horn,G.T.; Erlich,H.A.; Arnheim,N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle 35 cell anemia. Science 230(4732):1350), utilizando el kit de núcleo PCR GeneAmp RNA (Perkin-Elmer, EE.UU., N808-**CATATG**TACTCGCGGGAGAAGAACCAG (SEQ 0143) los oligonucleótidos ID. 23) ٧ CTCGAGTCAGAGTTCGTTGTGC (SEQ ID. 24), que llevan en su extremo 5' la secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción Nde I y Xho I, respectivamente (en negrilla en la secuencia), que habían sido previamente sintetizadas por fosforamidita química (Beaucage SL, Caruthers MH, Deoxynucleoside phosphoramidites- A new

40 class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis., Tetrahedron Letters, (1981), 22, 1859).

El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM-T (Promega Benelux b.v., Holanda) usando el kit pGEM-T Vector System I (Promega Benelux b.v., Países Bajos, A3600), y se aisló posteriormente mediante digestión con Nde I y Xho I (Promega Benelux, bv, Holanda) en las condiciones especificadas por el fabricante, seguido de electroforesis en geles de agarosa a temperatura de fusión baja (Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular

- 45 Cloning: A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE. UU.). Este fragmento se ligó luego al plásmido pET28a+ (Novagen Inc., EE. UU.), previamente digerido con Nde I y Xho I, usando ADN ligasa T4 (Promega Benelux, b.v., Países Bajos) en las condiciones especificadas por el fabricante. Las mezclas de reacción se transformaron en la cepa *Escherichia coli* XL-1 Blue (Bullock WO, Fernández JM, Short JM. XL-1Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli K12 strain with beta-galactosidase selection.
- 50 Biotechniques 1987, 5:376-8) de acuerdo con Sambrook *et al.* (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989) y los plásmidos de las colonias obtenidos después del crecimiento en medio selectivo se analizaron mediante análisis de restricción. Las secuencias de varios de los plásmidos recombinantes resultantes se verificaron mediante secuenciación automatizada de Sanger, y se seleccionó un clon representativo que coincide con la secuencia esperada y se
- 55 denominó pET-RAP (SEQ. ID. 25). Este plásmido codifica la síntesis intracelular, en *E. coli*, de la proteína humana LRPAP1 (RAP) bajo el control del promotor T7. La proteína recombinante, denominada RAPR13 (SEQ ID. 26), contiene una etiqueta de 6 histidinas consecutivas en el extremo N para su posterior purificación a través de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) (Sulkowski, E. (1985) Purification of proteins by IMAC. Trends Biotechnol. 3, 1-7), separado del resto de la proteína por un sitio de escisión de trombina.
- 60 La purificación de RAPR13 se logró mediante la transformación del plásmido pET-RAP (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, EE. UU.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989)

en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Studier, F. W. and B. A. Moffatt. "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J.Mol.Biol. 189.1 (1986): 113-30) e inoculación de una colonia bien aislada, un cultivo de 50 mL de medio ZYM5052 (Studier, F.W (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expression and Purification 41(1):207) complementada con

- 5 kanamicina a 100 μg/ml en un matraz Erlenmeyer de 1 L que luego se incubó durante 16 horas a 28°C y 350 rpm. El cultivo inducido se centrifugó a 5000 x g durante 30 min. a 4°C, y la biomasa resultante se volvió a suspender en 30 mL de PBS y se rompió en 3 pases en una prensa francesa a 1500 kg/cm². Después de centrifugar el homogeneizado resultante a 10 000 x g durante 30 min. a 4°C, la proteína se purificó del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (Sulkowski, E. (1985) Purification of proteins by IMAC. Trends
- Biotechnol. 3, 1-7) using Ni-NTA agarose (*Qiagen Benelux B.V.*, Países Bajos), con un gradiente lineal de imidazol 10 a 300 mM en PBS/NaCl 0.3 M como regulador corriente para la elución. La proteína purificada tiene una pureza igual o superior al 90%, según lo estimado mediante el análisis de las exploraciones digitales de los geles de electroforesis de poliacrilamida desnaturalizantes teñidos con azul de Coomassie (SDS-PAGE) de las muestras, utilizando las rutinas densitométricas del paquete de aplicaciones de software ImageJ ver. 1.35d (Rasband W., http://rsb.info.nih.gov/ij/).

Síntesis de péptidos

20

40

45

Los péptidos se obtuvieron mediante síntesis en fase sólida en una resina Fmoc-AM-MBHA, usando la estrategia Fmoc/tBu (Barany, G. and Merrifield, R.B. J Am Chem Soc. 99 (1977) 7363-7365). Los aminoácidos se acoplaron mediante la activación con DIC/HOBt, monitoreando la finalización de la reacción de acoplamiento mediante el ensayo de ninhidrina (Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I. Anal Biochem. 34 (1970) 595-598). Los

- péptidos sintetizados se separaron de la resina por tratamiento con una solución de TFÁ/EDT/H₂O/TIS (94%/2.5%/2.5%/1%), se precipitaron con éter y se liofilizaron durante 72 h. La ciclización del péptido mediante la formación de un puente disulfuro se logró por oxidación con DMSO (Andreu, D., Albericio, F., Solé, N. A., Munson, M. C., Ferrer, M. and Barany, G., Pennington, M. W. and Dunn, B. M. (Eds), Peptide Synthesis Protocols, Methods in
- 25 Molecular Biology, Totowa, NJ, 1994, pp. 91-169). En todos los casos, los péptidos se purificaron mediante RP-HPLC y las fracciones recogidas se analizaron nuevamente mediante RP-HPLC analítica. La preparación final de cada péptido se obtuvo reuniendo las fracciones con una pureza cromatográfica igual o superior al 99%. La masa del péptido en cada preparación final se verificó mediante espectrometría de masas ESI-MS.

Ensayo para la unión de proteínas fluoresceinizadas a la superficie celular

- 30 Se obtuvieron células sanguíneas periféricas mononucleares mediante lisis de eritrocitos de muestras de sangre total de donantes sanos, que se habían obtenido por punción venosa en viales BD Vacutainer K₃ EDTA. Se añadió a la sangre la solución de lisis (0.3 mol/L de NH₄Cl, 20 mMol/L de KHCO₃, 20 µmol/L de Na₂EDTA), usando 2 ml por cada 100 µl de sangre, y las muestras se incubaron aproximadamente durante 15 minutos a 25°C, agitando las muestras a intervalos de 3 minutos. La reacción se detuvo mediante enfriamiento a 4°C, y las células se separaron
- 35 de la solución de lisis por centrifugación a 350 x g durante 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, las células se lavaron con PBS a pH 7.4, albúmina de suero bovino al 1% (BSA), NaN₃ al 0.01%, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM.

En el caso de células Vero cultivadas, se separaron de la superficie del matraz de cultivo sin usar proteasas, mediante incubación con PBS a pH 7.4, EDTA 5 mM durante 10 minutos a 37°C, tocando suavemente el exterior del matraz.

Las células, recogidas y lavadas como se describe anteriormente, se incubaron en solución de fijación (PBS a pH 7.4, paraformaldehído al 2%, NaN₃ al 0.01%, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM durante 30 minutos a 4°C y la solución de fijación se eliminó por centrifugación a 350 xg durante 5 minutos a 4°C. El ensayo se llevó a cabo incubando 1 x 10⁵ células durante 1 hora a 4°C en un volumen total de 100 µL de cada dilución de las proteínas fluoresceinizadas (las diluciones se realizaron en PBS a pH 7.4, BSA al 1%, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM). Cada experimento incluyó controles con células no tratadas. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces y se incubaron nuevamente en solución de fijación. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo en un citómetro PAS III (Partec, Alemania). Los valores para cada punto experimental se calcularon a partir de mediciones

50 Inhibición de infección viral en células Vero

en un mínimo de 20000 células.

Las células Vero se cultivaron en placas de 24 pozos a aproximadamente el 90% de confluencia, y se lavaron dos veces con medio MEM sin FCS. Las diluciones que contenían las proteínas o los anticuerpos, de acuerdo con el objetivo del ensayo, se añadieron entonces y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, se añadió el virus a una multiplicidad de infección de 0.1, seguido de una subsiguiente incubación durante 1 hora a

55 37°C. Al final de la segunda incubación, el virus no unido se eliminó mediante lavado, y las células se incubaron durante 5 días a 37°C en medio de alta densidad (MEM suplementado con aminoácidos no esenciales, 1 % de FCS, 1% de carboximetilcelulosa) para propiciar la aparición de placas líticas. Las placas se visualizaron mediante tinción con 0.1% de Azul Negro de Naftol en 0.15 mol/L de acetato de sodio. Se utilizaron dos réplicas por punto experimental en cada ensayo, y se realizaron tres determinaciones independientes. El porcentaje de inhibición se

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{No. placas}}{\text{No. placasVir} \quad usCntrl}\right]$$

calculó de acuerdo con la expresión

Ensayo de protección de ratones utilizando el modelo de encefalitis inducida por DV.

Se anestesiaron grupos de 12 ratones Balb/C adultos (20 g de peso corporal promedio), se inocularon mediante inyección intracraneal con dosis letales de DV2 y se observaron diariamente durante 21 días. Las mezclas de péptidos con el virus se inocularon de la misma manera. El volumen de la muestra inoculada fue de 20 µL.

Ejemplo 1

5

10

15

40

Obtención de una matriz de afinidad para el aislamiento de proteínas que se unen a DIII de DV

Con el objetivo de preparar una matriz de afinidad con DIII como un ligando para el aislamiento de proteínas plasmáticas humanas como receptores potenciales para DV, la proteína recombinante DIIIE2J, que comprende los residuos Met₂₈₉ a Gly₄₀₀ (ID SEQ No. 22) de la proteína E de DV2, fue clonada y expresada en *E. coli*.

Después de IMAC, la preparación obtenida tiene una alta pureza según se evalúa mediante electroforesis de proteínas, donde la tinción con plata solo revela una banda principal sin contaminantes detectables (figura 1B). Para descartar la posible presencia de contaminantes que pudieran cometer con DIIIE2J durante la electroforesis, la preparación se analizó mediante cromatografía en fase reversa (rp-HPLC). Se cargó una alícuota de 80 µg de DIIIE2J en una columna de fase inversa C4 de 4.6 x 250 mm (J.T.Baker, EE. UU.). El cromatograma obtenido (figura 1A) tiene solo un pico, lo que confirma el alto grado de homogeneidad de la preparación.

DIII tiene una gran cantidad de epítopos topográficos reconocidos por anticuerpos neutralizantes, y en todos estos casos se ha demostrado que el reconocimiento de anticuerpos se elimina al reducir el puente disulfuro entre las dos cisteínas de DIII.

- 20 (Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG (1998) Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica Virology 246:317-28). Con el objetivo de verificar el peso molecular de la proteína y confirmar la presencia del puente disulfuro, la alícuota de DIIIE2J purificada mediante rp-HPLC se analizó adicionalmente mediante espectrometría de masas. Como se puede ver en la figura 2, la especie principal de la preparación DIIIE2J tiene una masa de 13515.00 Da, que difiere en 1.32 Da del valor esperado si el Met N-terminal de esta molécula fue
- 25 eliminado por la metionil-aminopeptidasa de *E. coli* (MAP). (Figura 2B). El resultado confirma que el Met N-terminal se ha eliminado de forma homogénea de la preparación DIIIE2J por MAP, pero la diferencia de masa no permite la confirmación de la presencia o ausencia del puente disulfuro.

Con el fin de examinar más a fondo el estado del puente disulfuro, se separó una alícuota de la DIIIE2J purificada por rp-HPLC en 2 fracciones con el mismo volumen. Una de las fracciones se redujo con ditiotreitol, después de lo cual se fraccionaron ambas fracciones por tratamiento con yodoacetamida, seguido de análisis ppor ESI-MS. Los resultados mostraron que el agente alquilante se había incorporado solo en la fracción previamente tratada con ditiotreitol, evidenciada por una masa aumentada de 13631.0 Da que difiere solo de 1.2 Da del valor esperado para las especies reducidas y carbamidometiladas. La fracción sometida solo a alquilación sin reducción previa tiene la misma masa (13515.00 Da) que la proteína no tratada, lo que confirma que la preparación de DIIIE2J no tiene
 grupos sulfhidrilo libres y que los residuos de 2 Cys de la molécula están unidos formando el puente disulfuro característico de DIII.

La caracterización antigénica de la proteína se realizó en un ensayo de transferencia de punto. Como se puede ver en la figura 3, DIIIE2J está fuertemente unida a los sueros anti-DV murinos, mostrando una marcada especificidad hacia el serotipo homólogo (Figura 3). La proteína también es reconocida por los sueros de personas que han sido infectadas por el virus en diferentes situaciones epidemiológicas. Este resultado evidencia que la preparación de DIIIE2J reproduce elementos estructurales presentes en el contexto de partículas virales intactas completas.

Para emplearse como un ligando de cromatografía de afinidad, es importante determinar si el DIIIE2J inmovilizado es capaz de reproducir las interacciones en las que está implicada en el contexto de la superficie viral. Con este objetivo, DIIIE2J se inmovilizó en Sepharose 4B y se analizó la unión de los anticuerpos originalmente contra las

- 45 partículas virales completas. Se equilibraron alícuotas de 20 μL de la resina de afinidad DIIIE2J en regulador de unión (PBS a pH 7.4, Tween-20 al 0.1%) y se incubaron con las muestras de anticuerpo, diluidas en regulador de unión, durante 30 minutos. a 25°C (en cada paso, se logró la eliminación de la solución añadida mediante centrifugación a 500 x g durante 5 minutos). Después de lavar extensamente la resina con regulador de unión, los anticuerpos unidos se eluyeron mediante sucesivas incubaciones en Gly 20 mM a pH 2.5 y en la reducción del
- 50 regulador de muestra para SDS-PAGE. Los resultados obtenidos en este experimento evidenciaron que la proteína recombinante inmovilizada es capaz de unirse específicamente a los anticuerpos obtenidos mediante inmunización con viriones enteros (Figura 4), lo que confirma que imita la superficie interactiva de DIII expuesta en el virión y que, por lo tanto, puede ser utilizado para el aislamiento de posibles receptores virales.

Ejemplo 2

El A2M humano interactúa directamente con DIII de la proteína E de DV2.

La presencia de fragmentos solubles de los receptores celulares en el plasma humano es ampliamente conocida. Por otro lado, también se sabe que la adición de suero a los medios de cultivo tiene una marcada influencia en la eficacia de la infección de las células cultivadas por DV (Nash DR, Halstead SB, Stenhouse AC, McCue C. (1971) Nonspecific Factors in Monkey Tissues and Serum Causing Inhibition of Plaque Formation and Hemagglutination by Dengue Viruses. Infect Immun. 3:193-199). Por lo tanto, se decidió tratar de aislar las proteínas con afinidad por DIII de la proteína E del plasma humano, con el objetivo de detectar potenciales receptores celulares de DV. Las muestras de plasma, obtenidas de donantes sanos de 30 a 40 años de edad sin anticuerpos detectables contra el virus, se inactivaron mediante incubación a 56°C durante 1 hora y las proteínas precipitadas se eliminaron de la solución mediante centrifugación (5000 x g, 10 min). El sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su uso.

El aislamiento de proteínas que se unen a DIII se realizó mediante cromatografía de afinidad. Se mezclaron cuatro partes de plasma humano, procesadas como se describe anteriormente, con una parte de HEPES 100 mM a pH 6, NaCl 1.75 M, CaCl₂ 25 mM, MgCl₂ 5 mM y se cargaron en una columna (1.5 cm de diámetro x 1.2 cm de altura)

- 15 rellena con la resina de afinidad DIIIE2J, a un flujo de 10 cm/h. La muestra fue recirculada en estas condiciones en la columna durante 4 horas adicionales, a 25°C, y luego la columna se lavó extensamente con 100 volúmenes de columna de regulador HEPES 20 mM, pH 6, NaCl 0.35 M, CaCl₂ 5 mM, 1 mM MgCl₂. Adicionalmente, la columna se lavó con regulador HEPES 20 mM pH 6, NaCl 0.5 M, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 1 mM. Se logró la elución de la proteína unida cargando Gly 10 mM, pH 2.5, en la columna, monitoreando la absorbancia a 280 nm del eluato con un
- 20 detector UV.

Para identificar las especies de proteína presentes en el eluato, se precipitó una alícuota de 100 µL de la fracción recolectada con ácido tricloroacético al 10%, se resuspendió en 20 µl de regulador de muestra y se sometió a SDS-PAGE. Las bandas de proteína se escindieron y se digirieron con tripsina, seguido por el análisis ESI-MS de los péptidos eluidos.

25 Se inspeccionaron los espectros de masas obtenidos para cada banda de proteína, y las señales con la intensidad más alta se fragmentaron para obtener información de secuencia para los péptidos. En todos los casos, los péptidos secuenciados correspondieron a fragmentos trípticos de proteínas plasmáticas humanas (tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las proteínas identificadas en el eluato de la cromatografía de afinidad con DIIIE2J inmovilizado.

Secuencia de péptidos	Identificación de Mascot ¹	Descripción de la proteína					
VTAAPQSVCALR LPPNVVEESAR	P01023	α2-macroglobulina humana					
VGEYSLYIGR IVLGQEQDSYGGK	P02743	Componente Amiloide P de suero humano					
LICQATGFSPR LTCLVTDLTTYDSVTISWTR	P04220	Cadena pesada de IgM humana					
VFDEFKPLVEEPQNLIK QNCELFEQLGEYK	Q645G4	Albúmina de suero humano					
DSTYSLSSTLTLSK	P01834	Región C de la cadena kappa de IgG humana					
1: Número de acceso en la base de datos Swiss-Prot de la proteína identificada por MASCOT (Perkins DN,							

1: Numero de acceso en la base de datos Swiss-Prot de la proteina identificada por MASCOT (Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence

Secuencia de péptidos Identificación de Mascot ¹		Descripción de la proteína				
databases using mass spectrome mediante el análisis ESI-MS.	try data. Electrophoresis 20:3	551-67) en función de los datos obtenidos				

Además de las proteínas implicadas en interacciones directas, específicas con el ligando inmovilizado, hay otras moléculas en el eluato de la cromatografía de afinidad que no tienen relevancia para esta unión. Tanto la albúmina (Q645G4, tabla 1) como las inmunoglobulinas IgM e IgG (P04220 y P01834, tabla 1) son contaminantes comunes eluidos durante experimentos de cromatografía de afinidad con ligandos de diferentes especificidades, probablemente debido a su alta abundancia en plasma humano, donde pueden encontrarse a concentraciones de aproximadamente 35 mg/mL para albúmina, 12-15 mg/ml para IgG y 5 mg/ml para IgM. La presencia de inmunoglobulinas también podría explicarse por la existencia de reactividad cruzada con DIIIE2J en algunos anticuerpos del plasma humano que son realmente específicos para otros antígenos.

- Se consideró particularmente interesante la presencia de A2M (P01023, tabla 1; SEQ. ID. 2) dentro del conjunto de proteínas identificadas. Se sabe que A2M funciona como una proteína transportadora para otras moléculas que pueden dirigirse, de esta manera, a la ruta endocítica a través del receptor celular A2MR (SEQ. ID. 3). Además, hay proteínas en el eluato cromatográfico que pueden no estar implicadas en interacciones directas con el ligando inmovilizado, y podrían ser parte del complejo ternario con otras proteínas identificadas que se unen al ligando (Cavin AC, Poseba M, Krause P, Grandi P, Marzioch M, Pauer A, Schultz L, Bick, IM, Michen AM, Cruciat CM.
- 15 (Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes Nature. 415:123-4).
- Para determinar si el aislamiento de A2M se debe a una interacción directa con DIIIE2J, se incubó una alícuota de 100 µg de esta última proteína en PBS a pH 7.4 en experimentos independientes con 100 µg de A2M humana no activado o activado (mediante tratamiento con metilamina). La concentración molar de las proteínas en la mezcla fue de 1.4 x 10⁻⁴ mol/L para DIIIE2J y 7 x 10⁻⁷ Mol/L para ambas variantes de A2M humana. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C y luego se cargó en una columna de filtración en gel 10/30 Superdex 200 HR previamente
- 25 equilibrada con regulador NaHPO₄ 50 mM, pH 7.0/300 mM NaCl, a un flujo de 0.4 mL/min (Figura 5E y F). Antes de cargar las proteínas mixtas, el perfil de elución y el tiempo de retención de DIIIE2J y A2M se establecieron por separado, utilizando corridas cromatográficas con las proteínas purificadas. (Figura 5B-D). En todos los casos, las fracciones recogidas de cada serie se precipitaron con acetona y se analizaron mediante SDS-PAGE al 15%, manteniendo constante la relación con el volumen total de cada fracción (1/5). La figura 5G evidencia la formación
- 30 de un complejo entre DIIIE2J y las dos variantes de A2M, que se manifiesta por la aparición de la banda correspondiente a DIIIE2J en la fracción de alto peso molecular. Este resultado constituye la primera evidencia de una interacción física entre A2M y DIII de la proteína envolvente de DV.

Ejemplo 3

5

Determinación de las constantes de afinidad para la interacción entre DIIIE2J y A2M por Biacore

- 35 Para estimar la fuerza de la interacción entre DIIIE2J y A2M humano, se inmovilizaron covalentemente 1600 RU de DIIIE2J en un chip CM5 (canal 1, figura 6A) (Biacore, Suecia), siguiendo el procedimiento descrito en la sección materiales y métodos.
- Durante los experimentos preliminares (figuras 6B y C) fue posible confirmar la presencia en la superficie del chip de proteína inmovilizada que expone las regiones de su superficie que también están expuestas en el contexto de la partícula viral. Esta confirmación se logró midiendo la interacción específica de las moléculas inmovilizadas con preparaciones de anticuerpos obtenidos por inmunización con DV. Específicamente, la unión mediante el anticuerpo monoclonal 3H5 (figura 6C) evidencia la exposición y la formación correcta de un epítopo topográfico que depende de la presencia del puente disulfuro entre los dos residuos de cisteína de DIII.
- Al cargar A2M a concentraciones de 0.3 µMol/L a 3 µMol/L, fue posible determinar que la interacción entre ambas
 proteínas es saturable y reversible (figura 6D). Las curvas de asociación y la disociación obtenidas permitieron la estimación del Kd aparente, del orden de 10⁻⁷ Mol/L. Este valor puede representar una interacción de avidez mucho mayor en el contexto de todo el virión, donde DIII está dispuesto como múltiples copias alrededor de un eje de simetría y donde, por lo tanto, se favorece la unión de múltiples puntos a proteínas oligoméricas como A2M. El hecho de que la interacción sea reversible confirma la posibilidad de que A2M pueda funcionar como una proteína 50

Ejemplo 4

Los ligandos naturales del receptor A2MR inhiben la unión de DIII a las células Vero y la infección viral.

La RAP es una chaperona molecular natural para LRP1. Esta proteína controla la actividad de LRP1, posiblemente al mediar un cambio conformacional que impide la unión y/o la internalización de varios ligandos para este receptor (Herz J, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK, Brown MS. (1991) 39-kDa protein modulates binding of ligands to low departs ligandos para estere estate a controla de la con

5 density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor J Biol Chem. 266:21232-8). Por lo tanto, RAP constituye un ligando ideal para obtener evidencias de la implicación de LRP1 en la endocitosis de DV en células de mamíferos.

La línea celular Vero ha sido ampliamente utilizada en el estudio de la naturaleza de las interacciones de DV con sus receptores celulares. Estas células son altamente susceptibles a la infección por los cuatro serotipos virales. Constituyen una herramienta particularmente ventajosa para la evaluación de actividades antivirales contra DV, ya que pueden usarse para ensayos que miden la inhibición de la formación de placas líticas.

Dado que esta línea celular se deriva de células renales de mono (https://www.atcc.org/) y que los ligandos para el receptor A2MR utilizados en los ensayos son de origen humano, un paso preliminar y necesario fue la corroboración de la unión de las proteínas RAPR13 y A2M_MeNH₂ a las células Vero. Con este objetivo, estas proteínas fueron

15 fluoresceinizadas, y su unión a la superficie de las células Vero se midió mediante citometría de flujo. Ambas moléculas mostraron un comportamiento de unión saturable y dependiente de la concentración en esta línea celular (Figura 7A).

Después de este primer experimento, se determinó si RAPR13 era capaz de inhibir la unión de A2M-MeNH₂ a células Vero, incubando células prefijadas durante 30 minutos a 4°C con mezclas de A2M_MeNH₂ fluoresceinado y
 RAPR13 o EGF recombinante humano como control, usando las proteínas no marcadas en un exceso molar de 100 veces. Los resultados obtenidos evidencian una disminución de la fluorescencia de las células incubadas con A2M_MeNH₂ en presencia de RAPR13, en contraste con las muestras incubadas con A2M_MeNH₂ en presencia de RAPR13, en contraste con las muestras incubadas con A2M_MeNH₂ en presencia de EGF humano recombinante (Figura 7B). Estos resultados corroboran que tanto A2M_MeNH₂ como RAPR13 se unen de manera específica y funcional al receptor A2MR en células Vero.

El ensayo para la inhibición de la infección se realizó en placas de 24 pozos sembradas con una monocapa de células Vero a aproximadamente el 90% de confluencia. La dilución del virus se ajustó para obtener aproximadamente 20 placas líticas por pozo. Los resultados del ensayo mostraron una reducción drástica en el número de placas líticas cuando las células se preincubaron antes de agregar el virus con la proteína RAPR13 o con una preparación de anticuerpos policionales contra el receptor A2MR (tabla 2). No hubo reducciones significativas cuando las células se preincubaron con BSA o con preparaciones de anticuerpos contra un antígeno no relacionado.

Tabla 2. Ensayo para la inhibición de la infección de células Vero por un ligando natural del receptor A2MR o por anticuerpos anti-receptor¹.

Proteína	DV1	DV2	DV3	DV4
RAPR13	65	76	60	75
BSA	7	-	-	-
α-A2MR	82	90	90	85
α-NR	5	-	-	-

1. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones independientes. Las cepas virales utilizadas en el ensayo fueron West Pac 74 para DV1, S16803 para DV2, CH53489 para DV3 y TVP360 para DV4.

Las proteínas RAP13 y BSA se usaron a una concentración de 100 μg/mL en el ensayo. α-A2MR: anticuerpos obtenidos por inmunización con el receptor A2MR. α-NR: Anticuerpos obtenidos por inmunización con una proteína no relacionada. Ambas preparaciones de anticuerpos se usaron a una dilución 1/100.

De manera similar, fue posible mostrar mediante un ensayo de reducción de placa lítica que la inhibición de la infección obtenida para DV2 con la proteína RAPR13 depende de la concentración de proteína utilizada en el experimento (Figura 8). Este resultado constituye una fuerte evidencia de la participación del receptor A2MR en la mediación de la entrada de DV a su célula objetivo.

Ejemplo 5

40

Diseño de péptidos sintéticos topográficos y estructuralmente limitados.

Aunque se reconoce ampliamente el papel esencial desempeñado por DIII en la unión de FV a las células huésped, no hay informes de péptidos sintéticos derivados de DIII con una actividad potente (a niveles nanomolar o de bajo micromolar) para la inhibición de la infección de DV. Varias razones explican esta situación: 1) No es trivial imitar los

- 5 determinantes estructurales de las proteínas enteras con péptidos sintéticos, ya que los parches superficiales involucrados en las interacciones proteína-proteína son a menudo topográficos, compuestos por residuos que están estrechamente posicionados en el tridimensional estructura pero separada a lo largo de la secuencia de la proteína, 2) Por lo general, estos parches de interacción son bastante grandes, con áreas que van desde varios cientos hasta algunos miles de Å². Esta magnitud es mayor que la superficie total de pequeños péptidos, 3) Los péptidos tienen
- una estructura flexible en solución, lo que implica que habrá una pérdida considerable en la entropía conformacional al adoptar la estructura que es biológicamente relevante para la interacción con su compañero de unión y, por lo tanto, la afinidad del complejo péptido-proteína será significativamente menor que la del complejo proteína-proteína, 4) Es posible que el péptido adopte conformaciones relativamente estables en solución, pero estas conformaciones pueden ser diferentes de las adoptadas por el péptido en el contexto de su proteína nativa, 5) La unión del virus a
- 15 su(s) receptor(es) de proteína puede implicar interacciones multipunto y, por lo tanto, tendrá una gran avidez, ya que la superficie viral tiene múltiples copias simétricas de DIII. Esto impone una barrera de alta energía para la competencia entre el virus y el péptido para el receptor.

Los datos obtenidos durante los estudios sobre la relación estructura-función de la interacción entre el receptor A2MR y sus ligandos naturales han demostrado el papel importante desempeñado por los grupos de residuos básicos y/o por las cadenas laterales de Lys/Arg en la superficie de los ligandos A2MR. Tal es el caso de Lys1370 para A2M (SEQ ID. 2) y Lys57 para exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, que, si se cambia por mutagénesis dirigida al sitio, dan como resultado caídas significativas en la unión del ligando al receptor (Arandjelovic S, Hall BD, Gonias SL (2005) Mutation of lysine 1370 in full-length human alpha2-macroglobulin blocks binding to the low density lipoprotein receptor-related protein-1. Arch Biochem Biophys. 438:29-35, Wedekind JE, Trame CB, Dorywalska M, Katch P. Pacables TM. Matcan M. Est-Carabia D. Colling D. (2014) Defined entrelated protein entre de Defined entrelated protein entre CB. (2015) Para CB. (2014) Defined entrelated protein entrelated entrelat

- Koehl P, Raschke TM, McKee M, FitzGerald D, Collier RJ, McKay DB. (2001) Refined crystallographic structure of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity J Mol Biol. 314:823-37). De manera similar, otros estudios han subrayado la importancia de un grupo básico formado por los residuos 136-150, junto con Arg172, para la proteína de la apoE (Raussens V, Slupsky CM, Ryan RO, Sykes BD (2002) NMR structure and dynamics of a receptor-active apolipoprotein E peptide. J Biol Chem. 277:29172-80).
- 30 Por otro lado, los dominios de unión al ligando del receptor A2MR y, en general, los de todos los miembros de la familia del receptor LDL, se caracterizan por un potencial electrostático significativamente negativo en la superficie de unión al ligando, debido a la presencia de los residuos de ácido conservados y expuestos que pueden interactuar favorablemente con los residuos básicos en el ligando que interactúa. Por ejemplo, la estructura cristalográfica de un complejo entre un fragmento del receptor VLDL y el rhinovirus humano 2, perteneciente al grupo minoritario de los
- 35 rinovirus, muestra una interacción estrecha entre LYS224 de la proteína VP1 de la cápside viral y los residuos ASP139 y GLU137 de el receptor receptor (Verdaguer N, Fita I, Reithmayer M, Moser R, Blaas D (2004) X-ray structure of a minor group human rhinovirus bound to a fragment of its cellular receptor protein. Nat Struct Mol Biol. 11:429-34). La cadena lateral alifática de Lys224 de VP1 interactúa, además, con Trp132 del dominio receptor que, aunque no está estrictamente conservado entre todos los dominios de unión a ligando de A2MR, es el aminoácido
- 40 más frecuente en esta posición (en 20 dominios de 31, con Leu que aparece en 4 dominios, Phe en 3, Arg en 2 y Lys y Ser en solo 1 cada uno) (Figura 9). La Tabla 3 muestra los parches de unión al ligando del receptor A2MR, definidos por las posiciones estructuralmente equivalentes a Trp132, ASP135, GLU137 y ASP139 en el receptor VLDL.

Dominio*	Primer resid.	Último resid.	Longitud en aa.	P1	P2	P3	P4
A1	25	66	42	W45	D48	E50	D52
A2	70	110	41	R90	N93	V95	D97
A3	852	892	41	W871	D874	D876	D878
A4	893	933	41	W912	D915	D917	D919
A5	934	973	40	W953	D956	D958	D960
A6	974	1013	40	W994	D997	D999	D1001

Tabla 3. Parches de unión de ligandos en el receptor A2MR¹.

Dominio*	Primer resid.	Último resid.	Longitud en aa.	P1	P2	P3	P4
A7	1013	1053	41	W1032	D1035	D1037	D1039
A8	1060	1099	40	W1080	D1083	D1085	D1087
A9	1102	1142	41	W1123	D1126	D1128	D1130
A10	1143	1182	40	K1164	D1167	N1169	D1171
A11	2522	2563	42	L2542	D2545	V2547	H2549
A12	2564	2602	39	L2583	N2586	A2588	D2590
A13	2603	2641	39	S2622	N2625	F2627	D2629
A14	2642	2690	49	W2671	D2674	A2676	D2678
A15	2694	2732	39	W2713	D2716	E2718	D2720
A16	2732	2771	40	W2751	D2754	S2756	D2758
A17	2772	2814	43	W2792	D2795	D2797	D2799
A18	2816	2855	40	F2835	D2838	D2840	D2842
A19	2856	2899	44	W2876	D2879	E2881	D2783
A20	2902	2940	39	L2922	N2925	Q2927	D2929
A21	3332	3371	40	W3351	D3354	E3356	D3358
A22	372	3410	39	F3391	3394	D3396	D3398
A23	3411	3450	40	F2431	N2434	Q2436	N2438
A24	3451	3491	41	W3471	D3474	D3476	D3478
A25	3492	3533	42	W3512	D3515	E3517	D3519
A26	3534	3572	39	W3553	D3556	D3558	D3560
A27	3573	3611	39	W3592	D3595	D3597	D3599
A28	3611	3649	39	W3630	D3633	D3635	D3637
A29	3652	3692	41	W3671	D3674	E3576	D3678
A30	3693	3733	41	R3714	D3717	T3619	N3621
A31	3739	3778	40	L3759	N3762	F3764	D3766

Dominio*	Primer resid.	Último resid.	Longitud en aa.	P1	P2	P3	P4
1. La numeraci de los dominic ultimo resid., p Longitud en aa de unión al liga	ión en la tabla co os de unión al lig posiciones del pr a.: número total c ando.	prresponde a la s gando del recep rimer y último r de aminoácidos	secuencia de A2MR otor A2MR humano esiduo de los difere del dominio de unió	humano (SE en el banco entes dominio on al ligando.	Q ID NO. 3). de datos Sv s de unión o P1-4: residu	Dominio: De vissProt. Prir del ligando d os que forma	nominación ner resid. y el receptor. an el parche

Dada la importancia de los residuos de Lys/Arg y, en general, de cargas electrostáticas en la interacción con los dominios de unión a ligando de la familia de receptores de LDL, se inspeccionó la localización de los residuos cargados en las superficies expuestas superior y lateral de los modelos tridimensionales de la estructura de DIII correspondientes a DV1-4.

5

20

45

- Para este análisis, las estructuras de la proteína E de DV2 y DV3 (entradas 10an y 1uzg en el banco de datos de proteínas) se usaron como plantillas para construir modelos de la estructura 3D de la proteína E de DV1 y DV4, usando el programa MODELLER (A. Sali, T.L. Blundell. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol. 234:779-815). Como se puede ver en la figura 10, hay cuatro parches de superficie
- 10 correspondientes a cadenas laterales de lisina que se conservan en los cuatro serotipos. Con la excepción del parche definido por Lys310 en DV1, 2 y 4 (Lys308 en DV3), los parches restantes no se conservan estrictamente al nivel de su localización en la estructura primaria, sino más bien en su posición topográfica en la superficie de la proteína. Esto es posible debido a la aparición de mutaciones correlacionadas en posiciones cercanas en la estructura 3D de la proteína y debido a la flexibilidad de la cadena lateral de la lisina. Dos de los parches se ubican
- 15 en la superficie expuesta correspondiente a la hoja beta definida por las cadenas A, B, C', D y E (Figura 11A), mientras que los parches restantes están ubicados en la superficie lateral/superior correspondiente o adyacente al FG beta horquilla.

Al menos uno de los cuatro parches de lisina conservados en la superficie de los DIII, y especialmente los dos parches localizados en o adyacentes a la superficie expuesta de la horquilla beta de FG, interactúan favorablemente con los parches de enlace de ligandos del receptor A2MR, definido en la tabla 3.

Con el fin de diseñar péptidos basados en DIII que pueden inhibir la infección de FV, el segmento Ser376-Trp391 (numeración de residuos de DV2) se seleccionó como el punto de partida. Este segmento comprende la horquilla beta de FG, que expone un área total de 745 Å² al disolvente y es parte de la superficie superior/lateral del dominio que permanece expuesto en el contexto de la estructura del virión maduro. Se ha informado que varias mutaciones

- 25 en esta región afectan la unión de anticuerpos neutralizantes que bloquean la interacción del virus con la célula o afectan el fenotipo viral. La estructura de la columna vertebral de este segmento se conserva entre las estructuras cristalográficas disponibles de la proteína E de DV2 y DV3 (Figura 11B). Esta conservación estructural también incluye el bucle F-G, que tiene un giro beta tipo II entre los residuos Glu383-Gln386 (numeración de residuos de acuerdo con SEQ ID 1). La conservación de la estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la columna vertebral del segmento FG también estina estructura de la colu
- 30 aplicable a DV1 y DV4, considerando el grado de similitud entre las secuencias correspondientes, además de la similitud estructural entre los modelos 3D de la proteína E de estos virus, obtenidos mediante el modelado de homología basado en las coordenadas DV2 y DV3, respectivamente (Figura 11B).

La Figura 11 (C y D) muestra la estructura primaria y los modelos 3D de los péptidos sintéticos HDIII2CL y HDIII3CL, diseñados sobre la base de la horquilla FG de DV2 y DV3.

- 35 Los péptidos sintéticos incluyen dos cisteínas, una en el extremo N y otra en el extremo C. Estos residuos pueden formar un puente de disulfuro que es estructuralmente compatible con una estructura de horquilla beta, como lo indican los modelos de la estructura tridimensional de estos péptidos (Figura 11C y D). En estos modelos, los carbonos alfa de las cisteínas están separados por 5.7 Å, que es una distancia común para los puentes de disulfuro. La ciclización por un puente disulfuro contribuye a la estabilización de la estructura de horquilla del péptido al disminuir la entropía conformacional de su columna vertebral.
 - El diseño permite la formación de 6 enlaces de hidrógeno entre la cadena principal de las cadenas F y G del péptido, aumentando aún más su estabilidad (Figura C y D). Los residuos 4 y 6 (fila F) y 13, 15 y 17 (fila G) son hidrófobos y están orientados hacia la misma cara de la horquilla, lo que garantiza una interacción hidrófoba favorable entre ellos. Los residuos 4-6 de la cadena beta F están bifurcados en el carbono beta, y se caracterizan por una alta propensión a la adopción de estructuras beta/extendidas.
 - El péptido HDIII3CL (SEQ ID. 7) incluye los residuos Lys11 y Lys14, que corresponden a dos parches de lisina de DIII que constituyen sitios putativos para una interacción favorable con los dominios de unión a ligando de A2MR. El péptido HDIII2CL (SEQ ID. 5) solo tiene 1 parche formado por Lys14; mientras que HDIII1CL (DV1, SEQ ID. 6) tiene dos parches y HDIII4CL (DV4, SEQ. ID.8) no tiene ninguno.

Además, se diseñaron los péptidos cíclicos HDIII2Cs (SEQ ID. 4) y pepDIII-1, que corresponden respectivamente con las secuencias Ile379-Lys388 y Gly381-Gln386 de la proteína E de DV2 (Figura 12A). Ambos péptidos incluyen cisteínas en los extremos N y C para su ciclización mediante puentes disulfuro que son estructuralmente compatibles con la estructura 3D de la proteína nativa. El péptido HDIII2Cs es análogo al péptido HDIII2CL, pero

5 incluye solo una porción de las cadenas beta F y G. Por otro lado, el péptido pepDIII-1 solo incluye el bucle F-G.

Ejemplo 6

El péptido HDIII2Cs reproduce un epítopo topográfico de DIII de DV2

Con el objetivo de evaluar el reconocimiento del péptido HDIII2Cs por mAb 3H5, los conjugados de péptido-BSA se prepararon y analizaron mediante transferencia de Western con este anticuerpo (Figura 12B). La proteína recombinante PD5 se utilizó como control positivo para este ensayo. Esta proteína está formada por DIII de la proteína E de DV2 (residuos 286-426) fusionada al C-terminal de la lipoamida deshidrogenasa (P64k) de *Neisseria meningitidis*. El PD5 se ha evaluado como candidato a vacuna y es capaz de provocar una respuesta inmune protectora evaluada por una prueba viral en modelos de infección en ratones y monos (Hermida L., Rodriguez R., Lazo L., Silva R., Zulueta A., Chinea G., Lopez C., Guzmán M.G. and Guillen G. (2004) A dengue-2 Envelope

15 fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. J Virol Methods. 115: 41-49), lo que demuestra que esta proteína muestra epítopos importantes de esta región del virus.

El anticuerpo monoclonal 3H5 se obtuvo mediante inmunización con una preparación DV2 (Gentry MK, Henchal EA, McCown JM, Brandt WE, Dalrymple JM. (1982) Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies Am J Trop Med Hyg. 31(Pt 1):548-55), y reconoce en un serotipo específico un epítopo en DIII que depende de la presencia del puente disulfuro. Este anticuerpo neutraliza potentemente los aislamientos pertenecientes al serotipo 2. Los datos publicados indican que existe una alta correlación entre la actividad neutralizante de este mAb y su capacidad para inhibir la unión del virus a sus receptores celulares (He RT, Innis BL, Nisalak A, Usawattanakul W, Wang S, Kalayanarooj S, Anderson R (1995) Antibodies that block virus attachment to

25 Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2 J Med. Virol. 45:451-61). El reconocimiento específico del péptido HDIII2Cs por este anticuerpo evidencia que el péptido reproduce un epítopo topográfico de la superficie de DIII de mayor importancia funcional.

Una de las herramientas utilizadas para la caracterización de péptidos topográficos es la obtención y caracterización de sueros anti-péptido. Con el objetivo de reunir evidencia adicional que respalde la hipótesis de que el péptido
 diseñado reproduce las características antigénicas de la región equivalente de la proteína E en el virus, se inició un esquema de inmunización usando un conjugado HDIII2Cs-KLH como inmunógeno. El esquema comprendía la administración subcutánea de cinco dosis del conjugado HDIII2Cs-KLH a 10 ratones Balb C. El título antipéptido de los sueros de animales inmunizados (1/2700) se determinó usando un ensayo ELISA indirecto, recubriendo las placas con HDIII2C y comparando la reactividad de los sueros inmunes con los de sus controles preinmunes.

Para evaluar si el péptido HDIII2Cs era capaz de provocar una respuesta de anticuerpo dependiente de la conformación, se realizó un ensayo de transferencia de puntos en el que dos fragmentos de membrana de nitrocelulosa se sensibilizaron con la proteína PD5 y el péptido HDIII2Cs, ya sea sin modificar o reducirse y carbamidometilado (Figura 12C). El ensayo evidenció una disminución en la intensidad de la señal para el reconocimiento por los sueros de ambos PD5 y el péptido tras la pérdida de sus puentes disulfuro. El ensayo 40 también evidenció que el péptido es reconocido por mAb 3H5, y esta señal se pierde al reducir y carbamidometilar el péptido.

Finalmente, evaluamos el reconocimiento por el suero antipéptido del virus obtenido después de la infección de las células Vero en un formato de transferencia de Western, así como su capacidad para inmunoprecipitar ³⁵S_VD2. En la transferencia de Western, el suero anti-HDIII2Cs reconoció una banda en la misma posición de una banda reconocida por mAb 3H5, correspondiente al peso molecular de la proteína E (Figura 13A). No hubo señales en la membrana incubadas con los sueros preinmunes, lo que demuestra que el reconocimiento mediado por la respuesta antipéptido fue específico. Finalmente, el suero anti-HDIII2Cs fue capaz de inmunoprecipitar la proteína E de DV2

(Figura 13B).
 Los resultados obtenidos demuestran que el péptido HDIII2C imita un epítopo dependiente de puente disulfuro de
 DIII de la proteína E de DV2 y que la restricción conformacional impuesta al péptido por el puente disulfuro tiene un efecto dominante sobre la respuesta de anticuerpo obtenida tras la inmunización con este antígeno. Por lo tanto, la

Ejemplo 7

45

El péptido HDIII2CL es una mejor imitación de la estructura del epítopo que el péptido HDIII2C

ciclización del péptido es necesaria para imitar adecuadamente la estructura de este epítopo.

55 Se inició un programa de inmunización con el objetivo de determinar si el péptido HDIII2CL fue capaz de obtener una mejor respuesta que el péptido HDIII2C, evaluado sobre la base de las características conformacionales de esta región antigénica en la partícula viral. El esquema de inmunización también incluía los péptidos HDIII2C y pepDIII-1 (Figura 12A). De forma similar al esquema anterior, este experimento usó conjugados de péptido-KLH como antígenos y siguió la misma ruta de dosificación e inmunización descrita en el ejemplo 6.

Los sueros antipéptido resultantes se analizaron en un ensayo ELISA indirecto, recubriendo las placas con PD5 y P64k en tres variantes: sin modificar, carbamidometilado y reducido/carbamidometilado. Tanto los sueros anti-

- 5 HDIII2C como los sueros anti-HDIII2CL reconocen la proteína PD5 de una manera dependiente de la conformación, como lo demuestran las mayores reactividades con la proteína no modificada, en comparación con la variante reducida y carbamidometilada (Figura 14). Sin embargo, el impacto de la pérdida del puente disulfuro en el reconocimiento de la proteína por el suero anti-HDIII2CL es mayor que para el suero anti-HDIII2C y reproduce mejor el efecto observado para los sueros anti-DV2 obtenidos por la inmunización de ratones con preparaciones virales
- 10 (Figura 14). Este resultado muestra que el rediseño que resultó en el péptido HDIII2CL logra una mejor representación de la conformación presente en esta región de DIII en el contexto del virus.

Ejemplo 8

30

Los péptidos topográficos correspondientes al giro FG muestran una inhibición de amplio espectro contra los cuatro serotipos de DV

- 15 Se realizó un ensayo con los péptidos HIII2CL y HIII3CL (Figuras 11C, 10D y 15) para estimar su capacidad para imitar las interacciones de DIII con las moléculas de la superficie celular. El ensayo empleó péptidos biotinilados para facilitar su detección en experimentos de citometría de flujo por medio de un conjugado de estreptavidina-FITC. La figura 16 representa los histogramas que representan el comportamiento de la intensidad de la fluorescencia en las células después de la incubación con diferentes diluciones de los péptidos HIII2CL y HIII3CL, además de un
- péptido no relacionado (0.3-0.02 mg/ml). Los resultados muestran que ambos péptidos se unen a la superficie celular de una manera dependiente de la concentración (Figura 16), lo que implica que la interacción es específica. El cambio en el histograma producido por el péptido HIII3CL es significativamente mayor que el producido por HIII2CL. Este resultado indica que el péptido HIII3CL establece una interacción de mayor afinidad, que es coherente con la presencia en esta molécula de dos residuos de lisina potencialmente importantes para la interacción con el receptor A2MR (Lys11 y Lys14, figuras 10C y 11D), frente a la ausencia de uno de ellos (Lys11, figuras 10B y 11C)
- del péptido HIII2CL.

DIII tiene una de las regiones más variables de la superficie expuesta de la proteína E. De hecho, una de las características antigénicas de este dominio es que los anticuerpos obtenidos contra esta región son predominantemente serotipo específicos (Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG (1998) Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica Virology 246:317-28). Sin embargo, durante el ensayo de inhibición con diferentes serotipos DV, los péptidos muestran una actividad inhibidora de amplio espectro, que inhibe eficazmente la infección de las cepas de los serotipos homólogos, así como de los serotipos heterólogos (tabla 3). Es importante notar que a la concentración ensayada (0.1 mg/ml) todos los péptidos en todas las condiciones, con la excepción del péptido HIII4CL para DV3, produjeron niveles de inhibición superiores al 50%.

35 Tabla 3. Inhibición de la infección de los cuatro serotipos de DV por los péptidos diseñados.

Péptido	DV1	DV2	DV3	DV4
HDIII1CL	+	+	+	+
HDIII2CL	+	+	+	+
HDIII3CL	+	+	+	+
HDIII4CL	+	+	+/-	+
HDIII2Cs	-	-	-	-
3H5pept	-	-	-	-

Los resultados mostrados corresponden a un ensayo de reducción del número de placas virales, realizado en células Vero. Los péptidos se usaron a una concentración de 0.1 mg/ml. Los símbolos representan el grado de reducción del número de placas víricas en estado experimental, en comparación con un control en el que las células se incubaron con el virus sin tratamiento previo con el péptido. (+) Disminución del 50% o superior, (+/-) Disminución del 10-50% en el número de placas, (-) Menos del 10% de disminución en el número de placas.

La Figura 17 presenta resultados adicionales que confirman la potente actividad inhibidora de los péptidos contra los serotipos homólogos y heterólogos. El péptido HDIII2CL alcanza una inhibición del 60% de la infección contra un virus de su serotipo homólogo (DV2) y una inhibición del 80% contra DV1 (Figura 17B). Además, el péptido HDIII3CL inhibe la infección por DV2 con la misma o mayor eficacia que el péptido HDIII2CL (Figura 17C). En ambos ensayos

5 inhibe la infección por DV2 con la misma o mayor eficacia que el péptido HDIII2CL (Figura 17C). En ambos ensayos (Figuras 17B y C) los péptidos HDIII2CL y HDIII3CL tienen un efecto significativamente mejor que los péptidos restantes analizados (3H5pept, NR3pep y pepDIII-1).

En base a la similitud estructural entre diferentes FV para la proteína E, se decidió diseñar péptidos correspondientes a la misma región DIII de otros FV de interés para la salud animal y humana (Figura 18): virus de la Fiebre Amarilla (SEQ ID. 10), el Virus del Nilo Occidental (SEQ ID. 11), el virus de la Encefalitis Japonesa (SEQ ID. 12), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (SEQ ID. 13), el virus Kunjin (SEQ ID. 14), el virus Powasan (SEQ ID. 15), virus de Langat (SEQ ID. 16), virus de la encefalitis del valle de Murray (SEQ ID. 17) y virus de la encefalitis de St. Louis (SEQ ID. 18).

Ejemplo 9

10

20

55

15 El péptido HDIII2CL modifica la interacción de A2MR y RAPR13 con el receptor A2MR.

Con el fin de obtener una evidencia directa de la interacción con el receptor A2MR, se investigó el efecto de uno de los péptidos diseñados sobre la unión de los ligandos naturales de A2MR a células Vero. El ensayo se realizó con A2M y RAPR13 fluoresceinados, midiendo su unión a las células Vero en presencia de concentraciones crecientes del péptido HDIII2CL. La cantidad de proteína unida a las células se estimó mediante citometría de flujo, usando EGF humano recombinante (rhEGF) como control negativo para el experimento, ya que se sabe que las células Vero expresan el receptor de EGF en su superficie (Copp J, Wiley S, Ward MW, van der Geer P (2005) Hypertonic

- Vero expresan el receptor de EGF en su superficie (Copp J, Wiley S, Ward MW, van der Geer P (2005) Hypertonic shock inhibits growth factor receptor signaling, induces caspase-3 activation, and causes reversible fragmentation of the mitochondrial network. Am J Physiol Cell Physiol. 288:C403 -15). La figura 19 muestra cómo la presencia del péptido HDIII2CL aumenta la cantidad de A2M y RAPR13 unidos a la
- 25 superficie, que sin embargo no tienen ningún efecto sobre la unión de rhEGF. La presencia del péptido 3H5pept, empleado como control para el ensayo, no produce variaciones en la cantidad de RAPR13 unida a la superficie. Estos resultados indican que la influencia del péptido HDIII2CL en la interacción de A2M y RAPR13 con sus receptores celulares es específica para estas moléculas. Sin embargo, el hecho de que el efecto observado sea un aumento, en lugar de una disminución en la unión de los ligandos a las células, sugiere que el péptido no se une al
- 30 mismo sitio en el receptor que estas moléculas. En ese caso, el efecto observado se puede atribuir a los cambios conformacionales desencadenados por la unión del péptido que favorece la unión de A2M o RAPR13. La modulación de la interacción de un ligando debido a un efecto alostérico mediado por la unión de un ligando diferente es una posibilidad real, considerando la organización de este receptor en múltiples dominios de unión a ligando (Herz J, Strickland DK. (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. J Clin Invest.
- 35 108:779-84). De hecho, este mismo mecanismo se invoca para explicar la inhibición por RAP de la unión y/o la internalización de ligandos A2MR que en realidad se unen a dominios A2MR que son notablemente distantes en su estructura de los ocupados por RAP.

Ejemplo 10

La inhibición de la infección por DV por A2M activado está mediada por la interacción en solución con el virus.

- 40 Para obtener evidencias adicionales de la interacción de DV con A2M, las dos variantes de la proteína, es decir, activadas y no activadas, se usaron en ensayos de inhibición de la infección de células Vero. La preparación viral se incubó con soluciones de A2M activadas de concentraciones más altas que las concentraciones fisiológicas alcanzadas por esta variante de la proteína. Las soluciones de concentración equimolar de A2M no activada y una proteína no relacionada se usaron como controles negativos.
- 45 En la figura 20A se observa que la preincubación del virus con concentraciones crecientes de A2M activada bloquea la infección viral de una manera dependiente de la dosis. Un resultado muy interesante es el hecho de que la concentración de A2M activada que inhibe el 50% de la infección viral en las células Vero corresponde a la constante de afinidad determinada para la interacción del A2M activado con la proteína DIIIE2J (kD 10⁻⁷ mol/L, ver Eje 3 y Figura 6D). Este resultado sugiere que en este experimento la inhibición de la infección está mediada por la interacción del A2M activado con el virus en lugar de por una competencia por la unión al A2MR en la superficie
- 50 interacción del A2M activado con el virus en lugar de por una competencia por la unión al A2MR en la superficie celular. Activado-A2M también inhibió la infección de las células Vero por los serotipos 1 y 3 de DV (Figura 20C).

Para confirmar que la inhibición de la infección se debió a la interacción en solución del virus con A2M activado, ambas variantes de la proteína se incubaron durante intervalos de tiempo crecientes con la preparación viral antes de la incubación con las células. Los resultados en la Figura 20B muestran que el efecto inhibitorio depende del tiempo de incubación que corresponde a una inhibición mediada por la interacción directa de la proteína con la partícula del virus. Curiosamente, para tiempos de incubación mayores a 30 minutos, A2M no activado aumenta la infección viral hasta un 50%. Este resultado sugiere que pequeñas cantidades de A2M activadas generadas durante la incubación fueron capaces de aumentar la eficacia de la infección. De hecho, esta situación refleja mejor cuál podría ser la situación fisiológica real para la interacción del virus con el A2M *in vivo* donde el A2M activado circula en pequeñas cantidades debido a la alta eficacia de A2MR en el aclaramiento de los complejos A2M-proteasa (Li Y, Lu W, Marzolo MP, Bu G (2001) Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family

5 suggested by their distinct endocytosis rates. J Biol Chem. 276: 18000-18006; Verges M, Bensadoun A, Herz J, Belcher JD, Havel RJ (2004) Endocytosis of hepatic lipase and lipoprotein lipase into rat liver hepatocytes in vivo is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. J Biol Chem. 279: 9030-9036).

Ejemplo 11

La A2MR purificada inhibe la infección de DV a las células Vero.

- 10 También abordamos si la A2MR soluble es capaz de inhibir la infección por DV. Para este propósito, la cadena α del receptor se purificó a partir de plasma humano de donantes sanos, donde se sabe que esta proteína circula en un rango de concentraciones de 3.7-10.8 µg/mL (Quinn KA, Grimsley PG, Dai YP, Tapner M, Chesterman CN, Owensby DA (1997) Soluble low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) circulates in human plasma. J Biol Chem. 272:23946-23951). Las muestras de 300 mL de plasma humano congelado se prefraccionaron por
- 15 cromatografía de intercambio iónico usando una columna empaquetada con DE-52 (Whatman, Reino Unido) y se equilibraron con Tris 50 mM, NaCl 60 mM, EDTA 1 mM pH 6. Las fracciones se eluyeron por un gradiente escalonado de concentraciones crecientes de NaCl y analizadas para la presencia de A2MR mediante un análisis de ligando-siembra con ligandos biotinilados (es decir, MeNH₂_A2M y RAPR13). La unión de los ligandos biotinilados se detectó usando un conjugado de esptreptavidina-peroxidasa.
- Las fracciones que contenían el receptor se dializaron regulador agonista Tris 50 mM, NaCl 120 mM pH 7.4, CaCl₂ 1 mM, Tween 20 al 0.05% y se cargaron en una columna con MeNH₂_A2M inmovilizado, un ligando único reconocido por A2MR entre los miembros de la familia LDLR. Antes de la elución del receptor, la columna se lavó extensivamente con el regulador de equilibrado pero conteniendo 0.5 M de NaCl. Para la elución específica del A2MR se usó regulador Tris 50 mM, NaCl 0.5 M pH 6, EDTA 10 mM, Tween 20 al 0.05% (Figura 21A). Las diferentes fracciones de la cromatografía de afinidad se dializaron frente a PBS a pH 7.4, CaCl₂ 1 mM y se
- 25 diferentes fracciones de la cromatografia de afinidad se dializaron frente a PBS a pH 7.4, CaCl₂ 1 mM y se esterilizaron mediante flitración a través de 0.2 μM.

El análisis SDS-PAGE muestra un patrón diferencial de bandas de proteínas en ambas fracciones, es decir, la fracción eluida con NaCl 0.5 M y la fracción correspondiente a las condiciones específicas para la elución del A2MR. La fracción posterior muestra una única banda de proteína que migra a una posición correspondiente con la masa molecular de la cadena α de A2MR (400-500 kDa) (Figura 21B).

Las fracciones de cromatografía de afinidad se evaluaron en un ensayo de neutralización de reducción de placa DV2 en células vero. Para este objetivo, se preincubó una preparación viral que contenía 100 partículas virales infectivas con las diferentes fracciones a una concentración de proteína de 25 µg/ml durante 1 hora a 25°C. A continuación, se añadió el virus a las monocapas de células Vero y se dejó que la infección ocurriera durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente se eliminaron las mezclas de virus/proteínas, las células se lavaron con medio fresco y finalmente las células se incubaron durante 5 días a 37°C en medio de alta densidad.

Los resultados de este ensayo mostraron una potente neutralización de la infección de DV2 con la fracción correspondiente a las condiciones para la elución específica del receptor (Figura 21C). Esta fracción también exhibió un efecto protector significativo en un modelo de encefalitis de ratones inducida por infección intracraneal de dosis letales de DV2 (Figura 21D). De hecho, el nivel de protección fue similar al obtenido por la preincubación del virus

40 letales de DV2 (Figura 21D). De hecho, el nivel de protección fue similar al obtenido por la preincubación del viru con el potente mAb neutralizante 4G2 a 25 μg/mL.

Ejemplo 12

30

35

El péptido HDIII3CL protege de encefalitis por dengue en el modelo de ratón.

El modelo de ratón de la encefalitis por dengue se usó para investigar el potencial del péptido HDIII3CL para proteger contra la infección por DV2. Un grupo de 12 ratones se inocularon con dosis letales de DV2 en combinación con 15 µg y 1.5 µg de péptido HDIII3CL. Como control negativo se utilizó un péptido compuesto por un fragmento de 14 aminoácidos de una secuencia con actividad conocida de unión a heparina seguida de 16 aminoácidos de una secuencia no relacionada con la proteína de envoltura de DV. El péptido de control negativo se usó en una cantidad equimolar a la dosis más alta del péptido HDIII3CL. Otro grupo se inoculó con la misma preparación viral, pero se 50 incubo previamente con mAb 4G2 a 25 µg/ml como control positivo de protección.

Como se puede observar en la figura 22, el péptido HDIII3CL fue capaz de proteger al 56% de los ratones para el inoculado con la dosis más alta del péptido. El grupo correspondiente a 1.5 µg del péptido por animal exhibió un nivel similar de protección al péptido de unión a heparina sin diferencia estadísticamente significativa del grupo inoculado con el virus solo, según lo evaluado por la estadística de Kaplan-Meier (prueba de rango logarítmico).

55 La protección del péptido HDIII3CL frente a una exposición letal con DV2 junto con la evidencia de que este péptido es capaz de inhibir la infección por DV en un modelo in vivo también confirma la capacidad del péptido para proteger

contra la infección con un serotipo heterólogo de DV.

Listado de secuencias

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> MÉTODO PARA BLOQUEAR LA INFECCIÓN POR FLAVIVIRUS, MOLÉCULAS Y USOS.

5 <130> P86593EP00

<150> PCT/CU2007/000014 <151> 2007-04-26

<150> CU 2006-0091 <151> 2006-04-28

10 <160>26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1 <211> 495

<212> PRT

15 <213> Virus del dengue tipo 2

<400>1

Met Arg Cys Ile Gly Ile Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Leu Cys Lys His Ser Met Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Thr Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys Val Val Leu Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asp Lys Ala Trp Leu Val His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile

Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile 420 425 Gly Lys Ala Leu His Gln Val Phe Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Phe Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Leu Ile Gly Val Ile Ile Thr Trp Ile Gly Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Ser Leu Val Leu Val Gly Val Val Thr Leu Tyr Leu Gly Ala Met Val Gln Ala <210> 2 <211> 1474 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Lys Asn Lys Leu Leu His Pro Ser Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Leu Pro Thr Asp Ala Ser Val Ser Gly Lys Pro Gln Tyr Met Val Leu Val Pro Ser Leu Leu His Thr Glu Thr Thr Glu Lys Gly Cys Val Leu Ser Tyr Leu Asn Glu Thr Val Thr Val Ser Ala Ser Leu Glu Ser Val Arg Gly Asn Arg Ser Leu Phe Thr Asp Leu Glu Ala Glu Asn Asp Val Leu His Cys Val Ala Phe Ala Val Pro Lys Ser Ser Ser Asn Glu Glu Val Met Phe Leu Thr Val Gln Val Lys Gly Pro Thr Gln Glu Phe Lys Lys Arg Thr Thr Val Met Val Lys Asn Glu Asp Ser Leu Val Phe Val Gln Thr Asp Lys Ser Ile Tyr Lys Pro Gly Gln Thr Val Lys Phe Arg Val Val Ser Met Asp Glu Asn Phe His Pro Leu Asn Glu Leu Ile Pro Leu Val Tyr Ile Gln Asp Pro Lys Gly Asn Arg Ile Ala Gln Trp Gln Ser Phe Gln Leu Glu Gly Gly Leu Lys Gln Phe Ser Phe Pro Leu Ser Ser Glu Pro Phe Gln Gly Ser Tyr Lys Val Val Gln Lys Lys Ser Gly Gly Arg Thr Glu His Pro Phe Thr Val Glu Glu Phe Val Leu Pro Lys Phe Glu Val Gln Val Thr Val Pro Lys Ile Ile Thr Ile Leu Glu Glu Glu Met Asn Val Ser Val Cys Gly Leu Tyr Thr Tyr

Gly Lys Pro Val Pro Gly His Val Thr Val Ser Ile Cys Arg Lys Tyr 260 265 270 Ser Asp Ala Ser Asp Cys His Gly Glu Asp Ser Gln Ala Phe Cys Glu 275 280 285 Lys Phe Ser Gly Gln Leu Asn Ser His Gly Cys Phe Tyr Gln Gln Val 290 295 300 Lys Thr Lys Val Phe Gln Leu Lys Arg Lys Glu Tyr Glu Met Lys Leu 310 315 305 320 His Thr Glu Ala Gln Ile Gln Glu Glu Gly Thr Val Val Glu Leu Thr 325 330 335 Gly Arg Gln Ser Ser Glu Ile Thr Arg Thr Ile Thr Lys Leu Ser Phe 340 345 350 Val Lys Val Asp Ser His Phe Arg Gln Gly Ile Pro Phe Phe Gly Gln 365 355 360 Val Arg Leu Val Asp Gly Lys Gly Val Pro Ile Pro Asn Lys Val Ile 370 375 380 Phe Ile Arg Gly Asn Glu Ala Asn Tyr Tyr Ser Asn Ala Thr Thr Asp 385 390 395 400 Glu His Gly Leu Val Gln Phe Ser Ile Asn Thr Thr Asn Val Met Gly 415 405 410 Thr Ser Leu Thr Val Arg Val Asn Tyr Lys Asp Arg Ser Pro Cys Tyr 420 425 430 Gly Tyr Gln Trp Val Ser Glu Glu His Glu Glu Ala His His Thr Ala 435 440 445 Tyr Leu Val Phe Ser Pro Ser Lys Ser Phe Val His Leu Glu Pro Met 450 455 460 Ser His Glu Leu Pro Cys Gly His Thr Gln Thr Val Gln Ala His Tyr 465 470 475 480 Ile Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu Gly Leu Lys Lys Leu Ser Phe Tyr 485 490 495 Tyr Leu Ile Met Ala Lys Gly Gly Ile Val Arg Thr Gly Thr His Gly 500 505 510 Leu Leu Val Lys Gln Glu Asp Met Lys Gly His Phe Ser Ile Ser Ile 515 520 525 Pro Val Lys Ser Asp Ile Ala Pro Val Ala Arg Leu Leu Ile Tyr Ala 530 535 540 Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Ile Gly Asp Ser Ala Lys Tyr Asp Val 545 550 555 560 Glu Asn Cys Leu Ala Asn Lys Val Asp Leu Ser Phe Ser Pro Ser Gln 565 570 575 Ser Leu Pro Ala Ser His Ala His Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Gln 580 585 590 Ser Val Cys Ala Leu Arg Ala Val Asp Gln Ser Val Leu Leu Met Lys 595 600 605 Pro Asp Ala Glu Leu Ser Ala Ser Ser Val Tyr Asn Leu Leu Pro Glu 610 615 620 Lys Asp Leu Thr Gly Phe Pro Gly Pro Leu Asn Asp Gln Asp Asp Glu 625 630 635 640 Asp Cys Ile Asn Arg His Asn Val Tyr Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Thr 645 650 655 Pro Val Ser Ser Thr Asn Glu Lys Asp Met Tyr Ser Phe Leu Glu Asp 670 660 665 Met Gly Leu Lys Ala Phe Thr Asn Ser Lys Ile Arg Lys Pro Lys Met 675 680 685 Cys Pro Gln Leu Gln Gln Tyr Glu Met His Gly Pro Glu Gly Leu Arg 700 690 695 Val Gly Phe Tyr Glu Ser Asp Val Met Gly Arg Gly His Ala Arg Leu 710 715 720 705 Val His Val Glu Glu Pro His Thr Glu Thr Val Arg Lys Tyr Phe Pro 725 730 735 Glu Thr Trp Ile Trp Asp Leu Val Val Val Asn Ser Ala Gly Val Ala 740 745 750 Glu Val Gly Val Thr Val Pro Asp Thr Ile Thr Glu Trp Lys Ala Gly

760 765 755 Ala Phe Cys Leu Ser Glu Asp Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr Ala 770 775 780 Ser Leu Arg Ala Phe Gln Pro Phe Phe Val Glu Leu Thr Met Pro Tyr 785 790 795 800 Ser Val Ile Arg Gly Glu Ala Phe Thr Leu Lys Ala Thr Val Leu Asn 805 810 815 Tyr Leu Pro Lys Cys Ile Arg Val Ser Val Gln Leu Glu Ala Ser Pro 830 820 825 Ala Phe Leu Ala Val Pro Val Glu Lys Glu Gln Ala Pro His Cys Ile 835 840 845 Cys Ala Asn Gly Arg Gln Thr Val Ser Trp Ala Val Thr Pro Lys Ser 850 855 860 Leu Gly Asn Val Asn Phe Thr Val Ser Ala Glu Ala Leu Glu Ser Gln 865 870 875 880 Glu Leu Cys Gly Thr Glu Val Pro Ser Val Pro Glu His Gly Arg Lys 885 890 895 Asp Thr Val Ile Lys Pro Leu Leu Val Glu Pro Glu Gly Leu Glu Lys 900 905 910 Glu Thr Thr Phe Asn Ser Leu Leu Cys Pro Ser Gly Gly Glu Val Ser 915 920 925 Glu Glu Leu Ser Leu Lys Leu Pro Pro Asn Val Val Glu Glu Ser Ala 930 935 940 Arg Ala Ser Val Ser Val Leu Gly Asp Ile Leu Gly Ser Ala Met Gln 950 955 -945 960 Asn Thr Gln Asn Leu Leu Gln Met Pro Tyr Gly Cys Gly Glu Gln Asn 965 970 975 Met Val Leu Phe Ala Pro Asn Ile Tyr Val Leu Asp Tyr Leu Asn Glu 980 985 990 Thr Gln Gln Leu Thr Pro Glu Val Lys Ser Lys Ala Ile Gly Tyr Leu 995 1000 1005 Asn Thr Gly Tyr Gln Arg Gln Leu Asn Tyr Lys His Tyr Asp Gly Ser 1010 1015 1020 Tyr Ser Thr Phe Gly Glu Arg Tyr Gly Arg Asn Gln Gly Asn Thr Trp 1025 1030 1035 1040 Leu Thr Ala Phe Val Leu Lys Thr Phe Ala Gln Ala Arg Ala Tyr Ile 1050 1055 1045 Phe Ile Asp Glu Ala His Ile Thr Gln Ala Leu Ile Trp Leu Ser Gln 1060 1065 1070 Arg Gln Lys Asp Asn Gly Cys Phe Arg Ser Ser Gly Ser Leu Leu Asn 1075 1080 1085 Asn Ala Ile Lys Gly Gly Val Glu Asp Glu Val Thr Leu Ser Ala Tyr 1095 1100 1090 Ile Thr Ile Ala Leu Leu Glu Ile Pro Leu Thr Val Thr His Pro Val 1105 1110 1115 1120 Val Arg Asn Ala Leu Phe Cys Leu Glu Ser Ala Trp Lys Thr Ala Gln 1125 1130 1135 Glu Gly Asp His Gly Ser His Val Tyr Thr Lys Ala Leu Leu Ala Tyr 1140 1145 1150 Ala Phe Ala Leu Ala Gly Asn Gln Asp Lys Arg Lys Glu Val Leu Lys 1155 1160 1165 Ser Leu Asn Glu Glu Ala Val Lys Lys Asp Asn Ser Val His Trp Glu 1170 1175 1180 Arg Pro Gln Lys Pro Lys Ala Pro Val Gly His Phe Tyr Glu Pro Gln 1185 1190 1195 1200 Ala Pro Ser Ala Glu Val Glu Met Thr Ser Tyr Val Leu Leu Ala Tyr 1215 1205 1210 Leu Thr Ala Gln Pro Ala Pro Thr Ser Glu Asp Leu Thr Ser Ala Thr 1220 1225 1230 Asn Ile Val Lys Trp Ile Thr Lys Gln Gln Asn Ala Gln Gly Gly Phe 1235 1240 1245 Ser Ser Thr Gln Asp Thr Val Val Ala Leu His Ala Leu Ser Lys Tyr 1255 1260 1250

Gly Ala Ala Thr Phe Thr Arg Thr Gly Lys Ala Ala Gln Val Thr Ile 1265 1270 1275 1280 Gln Ser Ser Gly Thr Phe Ser Ser Lys Phe Gln Val Asp Asn Asn Asn 1285 1290 1295 Arg Leu Leu Gln Gln Val Ser Leu Pro Glu Leu Pro Gly Glu Tyr 1300 1305 1310 Ser Met Lys Val Thr Gly Glu Gly Cys Val Tyr Leu Gln Thr Ser Leu 1315 1320 1325 Lys Tyr Asn Ile Leu Pro Glu Lys Glu Glu Phe Pro Phe Ala Leu Gly 1330 1335 1340 Val Gln Thr Leu Pro Gln Thr Cys Asp Glu Pro Lys Ala His Thr Ser 1345 1350 1355 1360 Phe Gln Ile Ser Leu Ser Val Ser Tyr Thr Gly Ser Arg Ser Ala Ser 1365 1370 1375 Asn Met Ala Ile Val Asp Val Lys Met Val Ser Gly Phe Ile Pro Leu 1380 1385 1390 Lys Pro Thr Val Lys Met Leu Glu Arg Ser Asn His Val Ser Arg Thr 1395 1400 1405 Glu Val Ser Ser Asn His Val Leu Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser Asn 1410 1415 1420 Gln Thr Leu Ser Leu Phe Phe Thr Val Leu Gln Asp Val Pro Val Arg 1430 1435 1440 1425 Asp Leu Lys Pro Ala Ile Val Lys Val Tyr Asp Tyr Tyr Glu Thr Asp 1445 1450 1455 Glu Phe Ala Ile Ala Glu Tyr Asn Ala Pro Cys Ser Lys Asp Leu Gly 1460 1465 1470 Asn Ala <211> 5144

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

<210> 3

Met Gly Lys Asn Lys Leu Leu His Pro Ser Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Pro Thr Asp Ala Ser Val Ser Gly Lys Pro Gln Tyr Met Val Leu Val Pro Ser Leu Leu His Thr Glu Thr Thr Glu Lys Gly Cys Val Leu Leu Ser Tyr Leu Asn Glu Thr Val Thr Val Ser Ala Ser Leu Glu Ser Val Arg Gly Asn Arg Ser Leu Phe Thr Asp Leu Glu Ala Glu 70 75 80 Asn Asp Val Leu His Cys Val Ala Phe Ala Val Pro Lys Ser Ser Ser Asn Glu Glu Val Met Phe Leu Thr Val Gln Val Lys Gly Pro Thr Gln Glu Phe Lys Lys Arg Thr Thr Val Met Val Lys Asn Glu Asp Ser Leu 115 120 125 Val Phe Val Gln Thr Asp Lys Ser Ile Tyr Lys Pro Gly Gln Thr Val

Lys Phe Arg Val Val Ser Met Asp Glu Asn Phe His Pro Leu Asn Glu Leu Ile Pro Leu Val Tyr Ile Gln Asp Pro Lys Gly Asn Arg Ile Ala Gln Trp Gln Ser Phe Gln Leu Glu Gly Gly Leu Lys Gln Phe Ser Phe Pro Leu Ser Ser Glu Pro Phe Gln Gly Ser Tyr Lys Val Val Gln Lys Lys Ser Gly Gly Arg Thr Glu His Pro Phe Thr Val Glu Glu Phe Val Leu Pro Lys Phe Glu Val Gln Val Thr Val Pro Lys Ile Ile Thr Ile Leu Glu Glu Glu Met Asn Val Ser Val Cys Gly Leu Tyr Thr Tyr Gly Lys Pro Val Pro Gly His Val Thr Val Ser Ile Cys Arg Lys Tyr Ser Asp Ala Ser Asp Cys His Gly Glu Asp Ser Gln Ala Phe Cys Glu Lys Phe Ser Gly Gln Leu Asn Ser His Gly Cys Phe Tyr Gln Gln Val Lys Thr Lys Val Phe Gln Leu Lys Arg Lys Glu Tyr Glu Met Lys Leu His Thr Glu Ala Gln Ile Gln Glu Glu Gly Thr Val Val Glu Leu Thr Gly Arg Gln Ser Ser Glu Ile Thr Arg Thr Ile Thr Lys Leu Ser Phe Val Lys Val Asp Ser His Phe Arg Gln Gly Ile Pro Phe Phe Gly Gln Val Arg Leu Val Asp Gly Lys Gly Val Pro Ile Pro Asn Lys Val Ile Phe Ile Arg Gly Asn Glu Ala Asn Tyr Tyr Ser Asn Ala Thr Thr Asp Glu His Gly Leu Val Gln Phe Ser Ile Asn Thr Thr Asn Val Met Gly Thr Ser Leu Thr Val Arg Val Asn Tyr Lys Asp Arg Ser Pro Cys Tyr Gly Tyr Gln Trp Val Ser Glu Glu His Glu Glu Ala His His Thr Ala Tyr Leu Val Phe Ser Pro Ser Lys Ser Phe Val His Leu Glu Pro Met Ser His Glu Leu Pro Cys Gly His Thr Gln Thr Val Gln Ala His Tyr

Ile Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu Gly Leu Lys Lys Leu Ser Phe Tyr Tyr Leu Ile Met Ala Lys Gly Gly Ile Val Arg Thr Gly Thr His Gly Leu Leu Val Lys Gln Glu Asp Met Lys Gly His Phe Ser Ile Ser Ile Pro Val Lys Ser Asp Ile Ala Pro Val Ala Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Ile Gly Asp Ser Ala Lys Tyr Asp Val Glu Asn Cys Leu Ala Asn Lys Val Asp Leu Ser Phe Ser Pro Ser Gln Ser Leu Pro Ala Ser His Ala His Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Gln Ser Val Cys Ala Leu Arg Ala Val Met Leu Thr Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Leu Val Ala Ala Ala Ile Asp Ala Pro Lys Thr Cys Ser Pro Lys Gln Phe Ala Cys Arg Asp Gln Ile Thr Cys Ile Ser Lys Gly Trp Arg Cys Asp Gly Glu Arg Asp Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu Ala Pro Glu Ile Cys Pro Gln Ser Lys Ala Gln Arg Cys Gln Pro Asn Glu His Asn Cys Leu Gly Thr Glu Leu Cys Val Pro Met Ser Arg Leu Cys Asn Gly Val Gln Asp Cys Met Asp Gly Ser Asp Glu Gly Pro His Cys Arg Glu Leu Gln Gly Asn Cys Ser Arg Leu Gly Cys Gln His His Cys Val Pro Thr Leu Asp Gly Pro Thr Cys Tyr Cys Asn Ser Ser Phe Gln Leu Gln Ala Asp Gly Lys Thr Cys Lys Asp Phe Asp Glu Cys Ser Val Tyr Gly Thr Cys Ser Gln Leu Cys Thr Asn Thr Asp Gly Ser Phe Ile Cys Gly Cys Val Glu Gly Tyr Leu Leu Gln Pro Asp Asn Arg Ser Cys Lys Ala Lys Asn Glu Pro Val Asp Arg Pro Pro Val Leu Leu Ile Ala Asn Ser Gln Asn Ile Leu Ala Thr Tyr Leu Ser Gly
Ala Gln Val Ser Thr Ile Thr Pro Thr Ser Thr Arg Gln Thr Thr Ala Met Asp Phe Ser Tyr Ala Asn Glu Thr Val Cys Trp Val His Val Gly Asp Ser Ala Ala Gln Thr Gln Leu Lys Cys Ala Arg Met Pro Gly Leu Lys Gly Phe Val Asp Glu His Thr Ile Asn Ile Ser Leu Ser Leu His His Val Glu Gln Met Ala Ile Asp Trp Leu Thr Gly Asn Phe Tyr Phe Val Asp Asp Ile Asp Asp Arg Ile Phe Val Cys Asn Arg Asn Gly Asp Thr Cys Val Thr Leu Leu Asp Leu Glu Leu Tyr Asn Pro Lys Gly Ile Ala Leu Asp Pro Ala Met Gly Lys Val Phe Phe Thr Asp Tyr Gly Gln Ile Pro Lys Val Glu Arg Cys Asp Met Asp Gly Gln Asn Arg Thr Lys Leu Val Asp Ser Lys Ile Val Phe Pro His Gly Ile Thr Leu Asp Leu Val Ser Arg Leu Val Tyr Trp Ala Asp Ala Tyr Leu Asp Tyr Ile Glu Val Val Asp Tyr Glu Gly Lys Gly Arg Gln Thr Ile Ile Gln Gly Ile Leu Ile Glu His Leu Tyr Gly Leu Thr Val Phe Glu Asn Tyr Leu Tyr Ala Thr Asn Ser Asp Asn Ala Asn Ala Gln Gln Lys Thr Ser Val Ile Arg Val Asn Arg Phe Asn Ser Thr Glu Tyr Gln Val Val Thr Arg Val Asp Lys Gly Gly Ala Leu His Ile Tyr His Gln Arg Arg Gln Pro Arg Val Arg Ser His Ala Cys Glu Asn Asp Gln Tyr Gly Lys Pro Gly Gly Cys Ser Asp Ile Cys Leu Leu Ala Asn Ser His Lys Ala Arg Thr Cys Arg Cys Arg Ser Gly Phe Ser Leu Gly Ser Asp Gly Lys Ser Cys Lys Lys Pro Glu His Glu Leu Phe Leu Val Tyr Gly Lys Gly Arg Pro Gly Ile Ile Arg Gly Met Asp Met Gly Ala Lys Val Pro Asp Glu His Met

ES 2 645 679 T3

Ile	Pro 1155	Ile 5	Glu	As n 116(Leu)	Met	Asn 116	Pro 5	Arg	Ala	Leu	Asp	Phe	His	Ala
Glu 13	Thr 170	Gly	Phe 11	Ile L75	Tyr	Phe 13	Ala L80	Asp	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ile	Gly
Arg 118	Gln 5	Lys	Ile 1190	Asp)	Gly	Thr 1195	Glu 5	Arg	Glu 1200	Thr)	Ile	Leu	Lys	Asp	Gl y
Ile	His	Asn 1203	Val 5	Glu	Gly 1210	Val)	Ala	Val 1215	Asp	Trp	Met	Gly	Asp	Asn	Leu
Tyr	Trp 12	Thr 220	Asp	Asp 12	Gly 225	Pro	Lys 12	Lys 230	Thr	Ile	Ser	Val	Ala	Arg	Leu
Glu	Lys 1239	Ala 5	Ala	Gln 124(Thr)	Arg	Lys 124	Thr 5	Leu	Ile	Glu	Gly	Lys	Met	Thr
His 12	Pro 250	Arg	Ala 12	11e 255	Val	Val 12	Asp 260	Pro	Leu	Asn	Gly	Trp	Met	Tyr	Trp
Thr 1269	Asp 5	Trp	Glu 1270	Glu)	Asp	Pro 1275	Lys 5	Asp	Ser 1280	Arg)	Arg	Gly	Arg	Leu	Glu
Arg	Ala	Trp 128	Met 5	Asp	Gly 1290	Ser)	His	Arg 1295	Asp 5	Ile	Phe	Val	Thr	Ser	Lys
Thr	Val 13	Leu 300	Trp	Pro 13	Asn 305	Gly	Leu 13	Ser 310	Leu	Asp	Ile	Pro	Ala	Gly	Arg
Leu	Tyr 1315	Trp 5	Val	Asp 132(Ala)	Phe	Tyr 1325	Asp	Arg	Ile	Glu	Thr	Ile	Leu	Leu
Asn 13	Gly 330	Thr	Asp 13	Arg 335	Lys	Ile 13	Val 340	Tyr	Glu	Gly	Pro	Glu	Leu	Asn	His
Ala 134	Phe 5	Gly	Leu 1350	Cys)	His	His 1355	Gly 5	Asn	Tyr 1360	Leu)	Phe	Trp	Thr	Glu	Tyr
Arg	Ser	Gly 136	Ser 5	Val	Tyr 1370	Arg)	Leu	Glu 1375	Arg 5	Gly	Val	Gly	Gly	Ala	Pro
Pro	Thr 13	Val 380	Thr	Leu 13	Leu 385	Arg	Ser 13	Glu 390	Arg	Pro	Pro	Ile	Phe	Glu	Ile
Arg	Met 1395	Tyr 5	Asp	Ala 1400	Gln)	Gln	Gln 1403	Gln 5	Val	Gly	Thr	Asn	Lys	Cys	Arg
Val 14	Asn 410	Asn	Gly 14	Gly 415	Cys	Ser 14	Ser 120	Leu	Cys	Leu	Ala	Thr	Pro	Gly	Ser
Arg 1423	Gln 5	Cys	Ala 1430	Cys)	Ala	Glu 1439	Asp 5	Gln	Val 144(Leu)	Asp	Ala	Asp	Gly	Val
Thr	Cys	Leu 144	Ala 5	Asn	Pro 1450	Ser	Tyr	Val 1455	Pro 5	Pro	Pro	Gln	Cys	Gln	Pro
Gly	Glu 14	Phe 460	Ala	Cys 14	Ala 165	Asn	Ser 14	Arg 170	Cys	Ile	Gln	Glu	Arg	Trp	Lys
Cys	Asp 1473	Gly 5	Asp	As n 148(Asp)	Суз	Leu 1483	Asp	Asn	Ser	Asp	Glu	Ala	Pro	Ala

Leu Cys His Gln His Thr Cys Pro Ser Asp Arg Phe Lys Cys Glu Asn Asn Arg Cys Ile Pro Asn Arg Trp Leu Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asn Ser Glu Asp Glu Ser Asn Ala Thr Cys Ser Ala Arg Thr Cys Pro Pro Asn Gln Phe Ser Cys Ala Ser Gly Arg Cys Ile Pro Ile Ser Trp Thr Cys Asp Leu Asp Asp Asp Cys Gly Asp Arg Ser Asp Glu Ser Ala Ser Cys Ala Tyr Pro Thr Cys Phe Pro Leu Thr Gln Phe Thr Cys Asn Asn Gly Arg Cys Ile Asn Ile Asn Trp Arg Cys Asp Asn Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Ala Gly Cys Ser His Ser Cys Ser Ser Thr Gln Phe Lys Cys Asn Ser Gly Arg Cys Ile Pro Glu His Trp Thr Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Thr His Ala Asn Cys Thr Asn Gln Ala Thr Arg Pro Fro Gly Gly Cys His Thr Asp Glu Phe Gln Cys Arg Leu Asp Gly Leu Cys Ile Pro Leu Arg Trp Arg Cys Asp Gly Asp Thr Asp Cys Met Asp Ser Ser Asp Glu Lys Ser Cys Glu Gly Val Thr His Val Cys Asp Pro Ser Val Lys Phe Gly Cys Lys Asp Ser Ala Arg Cys Ile Ser Lys Ala Trp Val Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Glu Asp Asn Ser Asp Glu Glu Asn Cys Glu Ser Leu Ala Cys Arg Pro Pro Ser His Pro Cys Ala Asn Asn Thr Ser Val Cys Leu Pro Pro Asp Lys Leu Cys Asp Gly Asn Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Gly Glu Leu Cys Asp Gln Cys Ser Leu Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Asn Cys Ser Val Ala Pro Gly Glu Gly Ile Val Cys Ser Cys Pro Leu Gly Met Glu Leu Gly Pro Asp Asn His Thr Cys Gln Ile Gln

Ser Tyr Cys Ala Lys His Leu Lys Cys Ser Gln Lys Cys Asp Gln Asn Lys Phe Ser Val Lys Cys Ser Cys Tyr Glu Gly Trp Val Leu Glu Pro Asp Gly Glu Ser Cys Arg Ser Leu Asp Pro Phe Lys Pro Phe Ile Ile Phe Ser Asn Arg His Glu Ile Arg Arg Ile Asp Leu His Lys Gly Asp Tyr Ser Val Leu Val Pro Gly Leu Arg Asn Thr Ile Ala Leu Asp Phe His Leu Ser Gln Ser Ala Leu Tyr Trp Thr Asp Val Val Glu Asp Lys Ile Tyr Arg Gly Lys Leu Leu Asp Asn Gly Ala Leu Thr Ser Phe Glu Val Val Ile Gln Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Glu Gly Leu Ala Val Asp Trp Ile Ala Gly Asn Ile Tyr Trp Val Glu Ser Asn Leu Asp Gln Ile Glu Val Ala Lys Leu Asp Gly Thr Leu Arg Thr Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ile Glu His Pro Arg Ala Ile Ala Leu Asp Pro Arg Asp Gly Ile Leu Phe Trp Thr Asp Trp Asp Ala Ser Leu Pro Arg Ile Glu Ala Ala Ser Met Ser Gly Ala Gly Arg Arg Thr Val His Arg Glu Thr Gly Ser Gly Gly Trp Pro Asn Gly Leu Thr Val Asp Tyr Leu Glu Lys Arg Ile Leu Trp Ile Asp Ala Arg Ser Asp Ala Ile Tyr Ser Ala Arg Tyr Asp Gly Ser Gly His Met Glu Val Leu Arg Gly His Glu Phe Leu Ser His Pro Phe Ala Val Thr Leu Tyr Gly Gly Glu Val Tyr Trp Thr Asp Trp Arg Thr Asn Thr Leu Ala Lys Ala Asn Lys Trp Thr Gly His Asn Val Thr Val Val Gln Arg Thr Asn Thr Gln Pro Phe Asp Leu Gln Val Tyr His Pro Ser Arg Gln Pro Met Ala Pro Asn Pro Cys Glu Ala Asn Gly Gly Gln Gly Pro Cys Ser His Leu Cys Leu Ile Asn Tyr Asn Arg Thr

Val Ser Cys Ala Cys Pro His Leu Met Lys Leu His Lys Asp Asn Thr Thr Cys Tyr Glu Phe Lys Lys Phe Leu Leu Tyr Ala Arg Gln Met Glu Ile Arg Gly Val Asp Leu Asp Ala Pro Tyr Tyr Asn Tyr Ile Ile Ser Phe Thr Val Pro Asp Ile Asp Asn Val Thr Val Leu Asp Tyr Asp Ala Arg Glu Gln Arg Val Tyr Trp Ser Asp Val Arg Thr Gln Ala Ile Lys Arg Ala Phe Ile Asn Gly Thr Gly Val Glu Thr Val Val Ser Ala Asp Leu Pro Asn Ala His Gly Leu Ala Val Asp Trp Val Ser Arg Asn Leu Phe Trp Thr Ser Tyr Asp Thr Asn Lys Lys Gln Ile Asn Val Ala Arg Leu Asp Gly Ser Phe Lys Asn Ala Val Val Gln Gly Leu Glu Gln Pro His Gly Leu Val Val His Pro Leu Arg Gly Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Gly Asp Asn Ile Ser Met Ala Asn Met Asp Gly Ser Asn Arg Thr Leu Leu Phe Ser Gly Gln Lys Gly Pro Val Gly Leu Ala Ile Asp Phe Pro Glu Ser Lys Leu Tyr Trp Ile Ser Ser Gly Asn His Thr Ile Asn Arg Cys Asn Leu Asp Gly Ser Gly Leu Glu Val Ile Asp Ala Met Arg Ser Gln Leu Gly Lys Ala Thr Ala Leu Ala Ile Met Gly Asp Lys Leu Trp Trp Ala Asp Gln Val Ser Glu Lys Met Gly Thr Cys Ser Lys Ala Asp Gly Ser Gly Ser Val Val Leu Arg Asn Ser Thr Thr Leu Val Met His Met Lys Val Tyr Asp Glu Ser Ile Gln Leu Asp His Lys Gly Thr Asn Pro Cys Ser Val Asn Asn Gly Asp Cys Ser Gln Leu Cys Leu Pro Thr Ser Glu Thr Thr Arg Ser Cys Met Cys Thr Ala Gly Tyr Ser Leu Arg Ser Gly Gln Gln Ala Cys Glu Gly Val Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser

Val His Glu Gly Ile Arg Gly Ile Pro Leu Asp Pro Asn Asp Lys Ser Asp Ala Leu Val Pro Val Ser Gly Thr Ser Leu Ala Val Gly Ile Asp Phe His Ala Glu Asn Asp Thr Ile Tyr Trp Val Asp Met Gly Leu Ser Thr Ile Ser Arg Ala Lys Arg Asp Gln Thr Trp Arg Glu Asp Val Val Thr Asn Gly Ile Gly Arg Val Glu Gly Ile Ala Val Asp Trp Ile Ala Gly Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Gln Gly Phe Asp Val Ile Glu Val Ala Arg Leu Asn Gly Ser Phe Arg Tyr Val Val Ile Ser Gln Gly Leu Asp Lys Pro Arg Ala Ile Thr Val His Pro Glu Lys Gly Tyr Leu Phe Trp Thr Glu Trp Gly Gln Tyr Pro Arg Ile Glu Arg Ser Arg Leu Asp Gly Thr Glu Arg Val Val Leu Val Asn Val Ser Ile Ser Trp Pro Asn Gly Ile Ser Val Asp Tyr Gln Asp Gly Lys Leu Tyr Trp Cys Asp Ala Arg Thr Asp Lys Ile Glu Arg Ile Asp Leu Glu Thr Gly Glu Asn Arg Glu Val Val Leu Ser Ser Asn Asn Met Asp Met Phe Ser Val Ser Val Phe Glu Asp Phe Ile Tyr Trp Ser Asp Arg Thr His Ala Asn Gly Ser Ile Lys Arg Gly Ser Lys Asp Asn Ala Thr Asp Ser Val Pro Leu Arg Thr Gly Ile Gly Val Gln Leu Lys Asp Ile Lys Val Phe Asn Arg Asp Arg Gln Lys Gly Thr Asn Val Cys Ala Val Ala Asn Gly Gly Cys Gln Gln Leu Cys Leu Tyr Arg Gly Arg Gly Gln Arg Ala Cys Ala Cys Ala His Gly Met Leu Ala Glu Asp Gly Ala Ser Cys Arg Glu Tyr Ala Gly Tyr Leu Leu Tyr Ser Glu Arg Thr Ile Leu Lys Ser Ile His Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Asn Ala Pro Val Gln Pro Phe Glu Asp Pro Glu His

Met Lys Asn Val Ile Ala Leu Ala Phe Asp Tyr Arg Ala Gly Thr Ser Pro Gly Thr Pro Asn Arg Ile Phe Phe Ser Asp Ile His Phe Gly Asn Ile Gln Gln Ile Asn Asp Asp Gly Ser Arg Arg Ile Thr Ile Val Glu Asn Val Gly Ser Val Glu Gly Leu Ala Tyr His Arg Gly Trp Asp Thr Leu Tyr Trp Thr Ser Tyr Thr Thr Ser Thr Ile Thr Arg His Thr Val Asp Gln Thr Arg Pro Gly Ala Phe Glu Arg Glu Thr Val Ile Thr Met Ser Gly Asp Asp His Pro Arg Ala Phe Val Leu Asp Glu Cys Gln Asn Leu Met Phe Trp Thr Asn Trp Asn Glu Gln His Pro Ser Ile Met Arg Ala Ala Leu Ser Gly Ala Asn Val Leu Thr Leu Ile Glu Lys Asp Ile Arg Thr Pro Asn Gly Leu Ala Ile Asp His Arg Ala Glu Lys Leu Tyr Phe Ser Asp Ala Thr Leu Asp Lys Ile Glu Arg Cys Glu Tyr Asp Gly Ser His Arg Tyr Val Ile Leu Lys Ser Glu Pro Val His Pro Phe Gly Leu Ala Val Tyr Gly Glu His Ile Phe Trp Thr Asp Trp Val Arg Arg Ala Val Gln Arg Ala Asn Lys His Val Gly Ser Asn Met Lys Leu Leu Arg Val Asp Ile Pro Gln Gln Pro Met Gly Ile Ile Ala Val Ala Asn Asp Thr Asn Ser Cys Glu Leu Ser Pro Cys Arg Ile Asn Asn Gly Gly Cys Gln Asp Leu Cys Leu Leu Thr His Gln Gly His Val Asn Cys Ser Cys Arg Gly Gly Arg Ile Leu Gln Asp Asp Leu Thr Cys Arg Ala Val Asn Ser Ser Cys Arg Ala Gln Asp Glu Phe Glu Cys Ala Asn Gly Glu Cys Ile Asn Phe Ser Leu Thr Cys Asp Gly Val Pro His Cys Lys Asp Lys Ser Asp Glu Lys Pro Ser Tyr Cys Asn Ser Arg Arg Cys Lys Lys

Thr Phe Arg 3170	Gln Cys Ser 3175	Asn Gly Arg 3180	Cys Val Se	r Asn Met	Leu Trp
Cys Asn Gly 3185	Ala Asp Asp 3190	Cys Gly Asp 3195	Gly Ser Asy 3200	Glu Ile	Pro Cys
Asn Lys Thr 320	Ala Cys Gly 5	Val Gly Glu 0 321	Phe Arg Cys 5	s Arg Asp	Gly Thr
Cys Ile Gly 3220	Asn Ser Ser 3225	Arg Cys Asn 3230	Gln Phe Val	Asp Cys	Glu Asp
Ala Ser Asp 3235	Glu Met Asn 3240	Cys Ser Ala 3245	Thr Asp Cy:	s Ser Ser	Tyr Phe
Arg Leu Gly 3250	Val Lys Gly 3255	Val Leu Phe 3260	Gln Pro Cys	3 Glu Arg	Thr Ser
Leu Cys Tyr 3265	Ala Pro Ser 3270	Trp Val Cys 3275	Asp Gly Ala 3280	a Asn Asp	Cys Gly
Asp Tyr Ser 328	Asp Glu Arg 5 329	Asp Cys Pro 0 329	Gly Val Ly: 5	s Arg Pro	Arg Cys
Pro Leu Asn 3300	Tyr Phe Ala 3305	Cys Pro Ser 3310	Gly Arg Cys	s Ile Pro	Met Ser
Trp Thr Cys 3315	Asp Lys Glu 3320	Asp Asp Cys 3325	Glu His Gly	y Glu Asp	Glu Thr
His Cys Asn 3330	Lys Phe Cys 3335	Ser Glu Ala 3340	Gln Phe Glu	ı Cys Gln	Asn His
Arg Cys Ile 3345	Ser Lys Gln 3350	Trp Leu Cys 3355	Asp Gly Se 3360	r Asp Asp	Cys Gly
Asp Gly Ser 3365	Asp Glu Ala 5 337	Ala His Cys 0 337	Glu Gly Ly: 5	s Thr Cys	Gly Pro
Ser Ser Phe 3380	Ser Cys Pro 3385	Gly Thr His 3390	Val Cys Val	l Pro Glu	Arg Trp
Leu Cys Asp 3395	Gly Asp Lys 3400	Asp Cys Ala 3405	Asp Gly Ala	a Asp Glu	Ser Ile
Ala Ala Gly 3410	Cys Leu Tyr 3415	Asn Ser Thr 3420	Cys Asp Asp	Arg Glu	Phe Met
Cys Gln Asn 3425	Arg Gln Cys 3430	Ile Pro Lys 3435	His Phe Val 3440	L Cys Asp	His Asp
Arg Asp Cys 344	Ala Asp Gly 5 345	Ser Asp Glu 0 345.	Ser Pro Glu 5	ı C y s Glu	Tyr Pro
Thr Cys Gly 3460	Pro Ser Glu 3465	Phe Arg Cys 3470	Ala Asn Gly	y Arg Cys	Leu Ser
Ser Arg Gln 3475	Trp Glu Cys 3480	Asp Gly Glu 3485	Asn Asp Cys	s His Asp	Gln Ser
Asp Glu Ala 3490	Pro Lys Asn 3495	Pro His Cys 3500	Thr Ser Pro	o Glu His	Lys Cys

Asn Ala Ser Ser Gln Phe Leu Cys Ser Ser Gly Arg Cys Val Ala Glu Ala Leu Leu Cys Asn Gly Gln Asp Asp Cys Gly Asp Ser Ser Asp Glu Arg Gly Cys His Ile Asn Glu Cys Leu Ser Arg Lys Leu Ser Gly Cys Ser Gln Asp Cys Glu Asp Leu Lys Ile Gly Phe Lys Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe Arg Leu Lys Asp Asp Gly Arg Thr Cys Ala Asp Val Asp Glu Cys Ser Thr Thr Phe Pro Cys Ser Gln Arg Cys Ile Asn Thr His Gly Ser Tyr Lys Cys Leu Cys Val Glu Gly Tyr Ala Pro Arg Gly Gly Asp Pro His Ser Cys Lys Ala Val Thr Asp Glu Glu Pro Phe Leu Ile Phe Ala Asn Arg Tyr Tyr Leu Arg Lys Leu Asn Leu Asp Gly Ser Asn Tyr Thr Leu Leu Lys Gln Gly Leu Asn Asn Ala Val Ala Leu Asp Phe Asp Tyr Arg Glu Gln Met Ile Tyr Trp Thr Asp Val Thr Thr Gln Gly Ser Met Ile Arg Arg Met His Leu Asn Gly Ser Asn Val Gln Val Leu His Arg Thr Gly Leu Ser Asn Pro Asp Gly Leu Ala Val Asp Trp Val Gly Gly Asn Leu Tyr Trp Cys Asp Lys Gly Arg Asp Thr Ile Glu Val Ser Lys Leu Asn Gly Ala Tyr Arg Thr Val Leu Val Ser Ser Gly Leu Arg Glu Pro Arg Ala Leu Val Val Asp Val Gln Asn Gly Tyr Leu Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Asp His Ser Leu Ile Gly Arg Ile Gly Met Asp Gly Ser Ser Arg Ser Val Ile Val Asp Thr Lys Ile Thr Trp Pro Asn Gly Leu Thr Leu Asp Tyr Val Thr Glu Arg Ile Tyr Trp Ala Asp Ala Arg Glu Asp Tyr Ile Glu Phe Ala Ser Leu Asp Gly Ser Asn Arg His Val Val Leu Ser Gln Asp Ile Pro His Ile Phe Ala Leu Thr Leu Phe

Glu Asp Tyr Val Tyr Trp Thr Asp Trp Glu Thr Lys Ser Ile Asn Arg Ala His Lys Thr Thr Gly Thr Asn Lys Thr Leu Leu Ile Ser Thr Leu His Arg Pro Met Asp Leu His Val Phe His Ala Leu Arg Gln Pro Asp Val Pro Asn His Pro Cys Lys Val Asn Asn Gly Gly Cys Ser Asn Leu Cys Leu Leu Ser Pro Gly Gly Gly His Lys Cys Ala Cys Pro Thr Asn Phe Tyr Leu Gly Ser Asp Gly Arg Thr Cys Val Ser Asn Cys Thr Ala Ser Gln Phe Val Cys Lys Asn Asp Lys Cys Ile Pro Phe Trp Trp Lys Cys Asp Thr Glu Asp Asp Cys Gly Asp His Ser Asp Glu Pro Pro Asp Cys Pro Glu Phe Lys Cys Arg Pro Gly Gln Phe Gln Cys Ser Thr Gly Ile Cys Thr Asn Pro Ala Phe Ile Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gln Asp Asn Ser Asp Glu Ala Asn Cys Asp Ile His Val Cys Leu Pro Ser Gln Phe Lys Cys Thr Asn Thr Asn Arg Cys Ile Pro Gly Ile Phe Arg Cys Asn Gly Gln Asp Asn Cys Gly Asp Gly Glu Asp Glu Arg Asp Cys Pro Glu Val Thr Cys Ala Pro Asn Gln Phe Gln Cys Ser Ile Thr Lys Arg Cys Ile Pro Arg Val Trp Val Cys Asp Arg Asp Asn Asp Cys Val Asp Gly Ser Asp Glu Pro Ala Asn Cys Thr Gln Met Thr Cys Gly Val Asp Glu Phe Arg Cys Lys Asp Ser Gly Arg Cys Ile Pro Ala Arg Trp Lys Cys Asp Gly Glu Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Pro Lys Glu Glu Cys Asp Glu Arg Thr Cys Glu Pro Tyr Gln Phe Arg Cys Lys Asn Asn Arg Cys Val Pro Gly Arg Trp Gln Cys Asp Tyr Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Glu Ser Cys Thr Pro Arg Pro Cys Ser

Glu Ser Glu 4180	Phe Ser Cys 4185	Ala Asn Gly 4190	Arg Cys	Ile Ala	Gly Arg '	Irp
Lys Cys Asp 4195	Gly Asp His 4200	Asp Cys Ala 4205	Asp Gly	Ser Asp	Glu Lys A	Asp
Cys Thr Pro 4210	Arg Cys Asp 4215	Met Asp Gln 4220	Phe Gln	C ys Lys	Ser Gly H	His
Cys Ile Pro 4225	Leu Arg Trp 4230	Arg Cys Asp 4235	Ala Asp 4240	Ala Asp	Cys Met 2	Asp
Gly Ser Asp 424	Glu Glu Ala 5 425	Cys Gly Thr 0 425	Gly Val 5	Arg Thr	Cys Pro I	Leu
Asp Glu Phe 4260	Gln Cys Asn 4265	Asn Thr Leu 4270	Cys Lys	Pro Leu	Ala Trp 1	Lys
Cys Asp Gly 4275	Glu Asp Asp 4280	Cys Gly Asp 4285	Asn Ser	Asp Glu	Asn Pro (Glu
Glu Cys Ala 4290	Arg Phe Val 4295	Cys Pro Pro 4300	Asn Arg	Pro Phe	Arg Cys I	Lys
Asn Asp Arg 4305	Val Cys Leu 4310	Trp Ile Gly 4315	Arg Gln 4320	Cys Asp	Gly Thr A	Asp
Asn Cys Gly 432	Asp Gly Thr 5 433	Asp Glu Glu 0 433	Asp Cys 5	Glu Pro	Pro Thr A	Ala
His Thr Thr 4340	His Cys Lys 4345	Asp Lys Lys 4350	Glu Phe	Leu Cys	Arg Asn (Gln
Arg Cys Leu 4355	Ser Ser Ser 4360	Leu Arg Cys 4365	Asn Met	Phe Asp	Asp Cys (Gly
Asp Gly Ser 4370	Asp Glu Glu 4375	Asp Cys Ser 4380	Ile Asp	Pro Lys	Leu Thr S	Ser
Cys Ala Thr 4385	Asn Ala Ser 4390	Ile Cys Gly 4395	Asp Glu 4400	Ala Arg	Cys Val A	Arg
Thr Glu Lys 440	Ala Ala Tyr 5 441	Cys Ala Cys 0 441	Arg Ser 5	Gly Phe	His Thr V	Val
Pro Gly Gln 4420	Pro Gly Cys 4425	Gln Asp Ile 4430	Asn Glu	Cys Leu	Arg Phe (Gly
Thr Cys Ser 4435	Gln Leu Cys 4440	Asn Asn Thr 4445	Lys Gly	Gly His	Leu Cys S	Ser
Cys Ala Arg 4450	Asn Phe Met 4455	Lys Thr His 4460	Asn Thr	Cys Lys	Ala Glu (Gly
Ser Glu Tyr 4465	Gln Val Leu 4470	Tyr Ile Ala 4475	Asp Asp 4480	Asn Glu	Ile Arg S	Ser
Leu Phe Pro 448	Gly His Pro 5 449	His Ser Ala 0 449	Tyr Glu 5	Gln Ala	Phe Gln (Gly
Asp Glu Ser 4500	Val Arg Ile 4505	Asp Ala Met 4510	Asp Val	His Val	Lys Ala (Gly

Arg	Val 4515	Tyr 5	Trp	Thr 452(Asn)	Trp	His 4523	Thr 5	Gly	Thr	Ile	Ser	Tyr	Arg	Ser
Leu 45	Pro 30	Pro	Ala 49	Ala 535	Pro	Pro 45	Thr 540	Thr	Ser	Asn	Arg	His	Arg	Arg	Gln
Ile 4545	Asp	Arg	Gly 4550	Val)	Thr	His 4555	Leu 5	Asn	Ile 4560	Ser)	Gly	Leu	Lys	Met	Pro
Arg	Gly	Ile 4565	Ala 5	Ile	Asp 457(Trp)	Val	Ala 4575	Gly S	Asn	Val	Tyr	Trp	Thr	Asp
Ser	Gly 45	A rg 580	Asp	Val 45	Ile 585	Glu	Val 45	Ala 590	Gln	Met	Lys	Gly	Glu	Asn	Arg
Lys	Thr 4595	Leu	Ile	Ser 460(Gly)	Met	Ile 4605	Asp	Glu	Pro	His	Ala	Ile	Val	Val
Asp 46	Pro 10	Leu	Arg 4(Gly 615	Thr	Met 46	Tyr 520	Trp	Ser	Asp	Trp	Gly	Asn	His	Pro
Lys 4625	Ile	Glu	Thr 463(Ala)	Ala	Met 4635	Asp	Gly	Thr 464(Leu)	Arg	Glu	Thr	Leu	Val
Gln	Asp	Asn 4645	Ile 5	Gln	Trp 465(Pro)	Thr	Gly 4655	Leu 5	Ala	Val	Asp	Tyr	His	Asn
Glu	Arg 4(Le u 560	Tyr	Trp 46	Ala 665	Asp	Ala 4(Lys 570	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Ser	Ile
Arg	Leu 4675	Asn	Gly	Thr 4680	Asp)	Pro	Ile 4685	Val 5	Ala	Ala	Asp	Ser	Lys	Arg	Gly
Leu 46	Ser 90	His	Pro 4(Phe 595	Ser	Ile 47	Asp 700	Val	Phe	Glu	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Gly
Val 4705	Thr	Tyr	Ile 471(Asn)	Asn	Arg 4715	Val 5	Phe	Lys 472(Ile)	His	Lys	Phe	Gly	His
Ser	Pro	Leu 4725	Val 5	Asn	Leu 473(Thr)	Gly	Gly 4735	Leu 5	Ser	His	Ala	Ser	Asp	Val
Val	Leu 47	Tyr 40	His	Gln 47	His 745	Lys	Gln 47	Pro 750	Glu	Val	Thr	Asn	Pro	Cys	Asp
Arg	Lys 4755	Lys 5	Cys	Glu 476(Trp)	Leu	Cys 4763	Leu 5	Leu	Ser	Pro	Ser	Gly	Pro	Val
Cys 47	Thr 70	Cys	Pro 4	As n 775	Gly	Lys 47	Arg 780	Leu	Asp	Asn	Gly	Thr	Cys	Val	Pro
Val 4785	Pro	Ser	Pro 479(Thr)	Pro	Pro 4795	Pro 5	Asp	Ala 480(Pro)	Arg	Pro	Gly	Thr	Cys
Asn	Leu	Gln 4805	Cys 5	Phe	Asn 481(Gly)	Gly	Ser 4815	Cys 5	Phe	Leu	Asn	Ala	Arg	Arg
Gln	Pro 48	Lys 320	Cys	Arg 48	Cys 325	Gln	Pro 48	Arg 330	Tyr	Thr	Gly	Asp	Lys	Cys	Glu
Leu	Asp 4835	Gln 5	Cys	Trp 484(Glu)	His	Cys 4843	Arg 5	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Ala

Ser Pro Ser Gly Met Pro Thr Cys Arg Cys Pro Thr Gly Phe Thr Gly Pro Lys Cys Thr Gln Gln Val Cys Ala Gly Tyr Cys Ala Asn Asn Ser Thr Cys Thr Val Asn Gln Gly Asn Gln Pro Gln Cys Arg Cys Leu Pro Gly Phe Leu Gly Asp Arg Cys Gln Tyr Arg Gln Cys Ser Gly Tyr Cys Glu Asn Phe Gly Thr Cys Gln Met Ala Ala Asp Gly Ser Arg Gln Cys Arg Cys Thr Ala Tyr Phe Glu Gly Ser Arg Cys Glu Val Asn Lys Cys Ser Arg Cys Leu Glu Gly Ala Cys Val Val Asn Lys Gln Ser Gly Asp Val Thr Cys Asn Cys Thr Asp Gly Arg Val Ala Pro Ser Cys Leu Thr Cys Val Gly His Cys Ser Asn Gly Gly Ser Cys Thr Met Asn Ser Lys Met Met Pro Glu Cys Gln Cys Pro Pro His Met Thr Gly Pro Arg Cys Glu Glu His Val Phe Ser Gln Gln Gln Pro Gly His Ile Ala Ser Ile Leu Ile Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Leu Val Ala Gly Val Val Phe Trp Tyr Lys Arg Arg Val Gln Gly Ala Lys Gly Phe Gln His Gln Arg Met Thr Asn Gly Ala Met Asn Val Glu Ile Gly Asn Pro Thr Tyr Lys Met Tyr Glu Gly Gly Glu Pro Asp Asp Val Gly Gly Leu Leu Asp Ala Asp Phe Ala Leu Asp Pro Asp Lys Pro Thr Asn Phe Thr Asn Pro Val Tyr Ala Thr Leu Tyr Met Gly Gly His Gly Ser Arg His Ser Leu Ala Ser Thr Asp Glu Lys Arg Glu Leu Leu Gly Arg Gly Pro Glu Asp Glu Ile Gly Asp Pro Leu Ala <212> PRT <213> Virus del dengue tipo 2

<220> <221> DISULFURO

<210> 4 <211> 12

```
<222> (1)..(12)
      <223> enlace entre las cisteínas 1 y 12
      <400>4
      Cys Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Cys
       1
                5
                          10
 5
      <210> 5
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Virus del dengue tipo 2
      <220>
10
      <221>
      <222> (1)..(18)
      <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18
      <400>5
       Cys Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn
        1
                 5
                          10
                                     15
       Trp Cys
15
      <210> 6
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Virus del dengue tipo 2
      <220>
20
      <221> DISULFURO
      <222> (1)..(18)
      <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18
      <400>6
       Cys Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser
                  5
                             10
                                         15
       1
      Trp Cys
25
      <210>7
      <211>18
      <212> PRT
      <213> Virus del dengue tipo 3
     <220>
30
      <221> DISULFURO
      <222>(1)..(18)
      <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18
      400>7
       Cys Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn
                  5
                             10
                                          15
        1
       Trp Cys
35
      <210> 8
      <211> 18
      <212> PRT
40
      <213> Virus del dengue tipo 4
      <220>
      <221> DISULFURO
      <222> (1)..(18)
      <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18
```

<400>8

Cys Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asn Ser Ala Leu Thr Leu His 5 10 15 1 Trp Cys <210> 9 5 <211> 18 <212> PRT <213> Virus del dengue tipo 2 <220> <221> DISULFURO <222> (1)..(18) 10 <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18 <400> 9 Cys Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Ile Lys Ile Asn 1 5 10 15 Trp Cys <210> 10 15 <211> 18 <212> PRT <213> Virus de la fiebre amarilla <220> <221> DISULFURO 20 <222> (1)..(18) <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18 <400>10 Cys Ser Tyr Ile Ile Val Gly Arg Gly Asp Ser Arg Leu Thr Tyr Gln 1 5 10 15 Trp Cys <210> 11 25 <211> 18 <212> PRT <213> virus del Nilo Occidental <220> 30 <221> DISULFURO <222> (1)..(18) <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18 <400> 11 Cys Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His 1 5 10 15 Trp Cys <210> 12 35 <211> 18 <212> PRT <213> Virus de la encefalitis japonesa <220> 40 <221> DISULFURO <222> (1)..(18) <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18 <400>12

Cys Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His 1 5 10 15 Trp Cys <210> 13 <211> 14 <212> PRT 5 <213> El virus de la encefalitis transmitida por garrapatas <220> <221> DISULFURO <222> (1)..(14) <223> enlace entre las cisteínas 1 y 14 10 <400>13 Cys Asn Ile Ile Tyr Val Gly Glu Leu Ser His Gln Trp Cys 1 5 10 <210> 14 <211> 18 <212> PRT 15 <213> virus Kunjin <220> <221> DISULFURO <222> (1)..(18) <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18 20 <400>14 Cys Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His 5 10 1 15 Trp Cys <210> 15 <211> 14 25 <212> PRT <213> virus Powassan <220> <221> DISULFURO <222> (1)..(14) 30 <223> enlace entre las cisteínas 1 y 14 <400> 15 Cys Asn Ile Ile Tyr Val Gly Asp Leu Ser Gln Gln Trp Cys 5 1 10 <210> 16 <211> 14 35 <212> PRT <213> Virus de Langat <220> <221> DISULFURO <222> (1)..(14) 40 <223> enlace entre las cisteínas 1 y 14 <400> 16 Cys Asn Ile Ile Tyr Val Gly Asp Leu Asn His Gln Trp Cys 5 1 10 <210> 17 <211> 18 45 <212> PRT <213> virus de la encefalitis del valle de Murray

<220> <221> DISULFURO <222> (1)..(18) <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18 5 <400> 17 Cys Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His 1 5 10 15 Trp Cys <210>18 <211> 18 <212> PRT 10 <213> virus de la encefalitis de St. Louis <220> <221> DISULFURO <222> (1)..(18) <223> enlace entre las cisteínas 1 y 18 15 <400>18 - - -Cys Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Thr Thr Gln Ile Asn Tyr His 1 5 10 15 Trp Cys <210> 19 <211> 27 <212> DNA 20 <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Nde I <400> 19 catatggcca tggacaaact acagctc 27 <210> 20 25 <211>24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Xho I <400> 20 ctcgaggccg atggaacttc cttt 24 <210> 21 <211> 5706 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: codificación de plásmidos para la síntesis del dominio III a partir de la

40 <400>21

proteína E de la cepa Jamaica 1409 de serotipo 2 DV, promotor T7.

taatacgact	cactataggg	gaattgtgag	cggataacaa	ttcccctcta	gaaataattt	60
tgtttaactt	taagaaggag	atatacatat	ggccatggac	aaactacagc	tcaaaggaat	120
gtcatactct	atgtgtacag	gaaagtttaa	aattgtgaag	gaaatagcag	aaacacaaca	180
tggaacaata	gttatcagag	tacaatatga	aggggacggc	tctccatgta	agatcccttt	240
tgagataatg	gatttggaaa	aaagacacgt	cttaggtcgc	ctgattacag	ttaacccgat	300
cgtaacagaa	aaagatagcc	cagtcaacat	agaagcagaa	cctccattcg	gagacagcta	360
catcatcata	ggagtagagc	cgggacaatt	gaaactcaac	tggtttaaga	aaggaagttc	420
catcggcctc	gagcaccacc	accaccacca	ctgagatccg	gctgctaaca	aagcccgaaa	480
ggaagctgag	ttggctgctg	ccaccgctga	gcaataacta	gcataacccc	ttggggcete	540
taaacgggtc	ttgaggggtt	ttttgctgaa	aggaggaact	atatccggat	tggcgaatgg	600
gacgcgccct	gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	660
getacaettg	ccagegeeet	agegeeeget	cctttcgctt	tetteeette	ctttctcgcc	720
acgttcgccg	gctttccccg	tcaagctcta	aatcggggggc	tccctttagg	gttccgattt	780
agtgctttac	ggcacctcga	ccccaaaaaa	cttgattagg	gtgatggttc	acgtagtggg	840
ccatcgccct	gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacgtt	ctttaatagt	900
ggactcttgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggtctattc	ttttgattta	960
taagggattt	tgccgatttc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	1020
aacgcgaatt	ttaacaaaat	attaacgttt	acaatttcag	gtggcacttt	tcggggaaat	1080
gtgcgcggaa	cccctatttg	tttattttc	taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	1140
agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	1200
catttccgtg	tcgcccttat	tcccttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	ttttgctcac	1260
ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	1320
atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	ttegeecega	agaacgtttt	1380
ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcgg	tattatcccg	tattgacgcc	1440
gggcaagagc	aactcggtcg	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	tgagtactca	1500
ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	cagtgctgcc	1560
ataaccatga	gtgataacac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaag	1620
gagctaaccg	ctttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga	tcgttgggaa	1680
ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgcagcaatg	1740
gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	1800
ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttccg	1860
gctggctggt	ttattgctga	taaatctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	cggtatcatt	1920
gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	1980
caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaag	2040
cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	aaaacttcat	2100

ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	caaaatccct	2160
taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatettet	2220
tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	accgctacca	2280
gcggtggttt	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	aactggcttc	2340
agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	ccaccacttc	2400
aagaactctg	tagcaccocc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	agtggctgct	2460
accagtogco	ataagtcotg	tettaccoog	ttogactcaa	gacgatagtt	accogataag	2520
gegeageggt	coooctoaac	agaggattca	tocacacaoc	ccagettoga	gcgaacgacc	2580
	tgagatacct	acagegtgag	ctatgagaaa	gegeeaeget		2640
agaaaggcgg	acaggitaticc	agtaagcogc	aggetcogaa	caggagaggg	cacqaqqqaq	2700
cttccaggogg	gaaacgcctg	ggouugoggo	agggeeggaa	aatttcacca	cctctgaggggg	2760
aacatcat	ttttatata	ctcatcaca	ageceegeeg	tataaaaaa	caccagcaac	2820
accacctttt	tacgettect	agesttttas	tagaattta	ctcacatott	ettteetee	2880
ttatococto	attatataa	taaccatatt	accondition	agtgaggtga	taggataga	2940
caceaccaee	caaccaacca	carcoartea	ataaaaaaa	agegageega	acacctasta	3000
agatattta	taattaaaaa	tatatagaat	atttaaaaaa	aageggaaga	togaatataa	3060
cygtatttte	atatastaa	cecycycygc	accededed	gearacatge	agatagatag	2120
glacaalely	cetergatgee	gealagilaa	gecagcacac	accegetat	cyclacylya	3100
tataataaaa	getgegeete	gacaceegee	tatacceget	gaegegeeet	gacygyctty	2240
	geatecycli	acayacaayc	lglgacegic	Leeyyyayet	gcalgigica	2240
gaggttttca	cogleateac	cgaaacgcgc	gaggcagerg	cgglaaagel	taccagegeg	2260
gtcgtgaage	gattcacaga	tgtetgeetg	ttcatccgcg	tecagetegt	tgagtttete	3360
cagaagegtt	aatgtetgge	ttctgataaa	gcgggccatg	ttaagggcgg	tttttccctg	3420
tttggtCaCt	gatgeeteeg	tgtaaggggg	atttctgttc	atgggggtaa	tgataccgat	3480
gaaacgagag	aggatgetea	cgatacgggt	tactgatgat	gaacatgeee	ggttactgga	3540
acgttgtgag	ggtaaacaac	tggcggtatg	gatgcggcgg	gaccagagaa	aaatcactca	3600
gggtcaatgc	cagegetteg	ttaatacaga	tgtaggtgtt	ccacagggta	gccagcagca	3660
tcctgcgatg	cagatccgga	acataatggt	gcagggcgct	gacttccgcg	tttccagact	3720
ttacgaaaca	cggaaaccga	agaccattca	tgttgttgct	caggtcgcag	acgttttgca	3780
gcagcagtcg	cttcacgttc	gctcgcgtat	cggtgattca	ttctgctaac	cagtaaggca	3840
accccgccag	cctagccggg	tcctcaacga	caggagcacg	atcatgcgca	cccgtggggc	3900
cgccatgccg	gcgataatgg	cctgcttctc	gccgaaacgt	ttggtggcgg	gaccagtgac	3960
gaaggcttga	gcgagggcgt	gcaagattcc	gaataccgca	agcgacaggc	cgatcatcgt	4020
cgcgctccag	cgaaagcggt	cctcgccgaa	aatgacccag	agcgctgccg	gcacctgtcc	4080
tacgagttgc	atgataaaga	agacagtcat	aagtgcggcg	acgatagtca	tgccccgcgc	4140
ccaccggaag	gagctgactg	ggttgaaggc	tctcaagggc	atcggtcgag	atcccggtgc	4200
ctaatgagtg	agctaactta	cattaattgc	gttgcgctca	ctgcccgctt	tccagtcggg	4260
aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgcg	4320
tattgggcgc	cagggtggtt	tttctttca	ccagtgagac	gggcaacagc	tgattgccct	4380
tcaccgcctg	gccctgagag	agttgcagca	agcggtccac	gctggtttgc	cccagcaggc	4440
gaaaatcctg	tttgatggtg	gttaacggcg	ggatataaca	tgagetgtet	tcggtatcgt	4500
cgtatcccac	taccgagata	tccgcaccaa	cgcgcagccc	ggactcggta	atggcgcgca	4560
ttgcgcccag	cgccatctga	tcgttggcaa	ccagcatcgc	agtgggaacg	atgccctcat	4620
tcagcatttg	catggtttgt	tgaaaaccgg	acatggcact	ccagtcgcct	teccgttecg	4680
ctatcggctg	aatttgattg	cgagtgagat	atttatgcca	gccagccaga	cgcagacgcg	4740
ccgagacaga	acttaatggg	cccgctaaca	gcgcgatttg	ctggtgaccc	aatgcgacca	4800
gatgetecae	gcccagtcgc	gtaccgtctt	catgggagaa	aataatactq	ttgatgggtg	4860
tetggteaga	gacatcaaga	aataacocco	gaacattagt	gcaggcaget	tccacagcaa	4920
toocatecto	gtcatccage	ggatagttaa	tgatcagece	actgacgcgt	tacacaaaaa	4980
gattgtgcac	coccoctta	caggettega	caccacttca	ttctaccatc	gacaccacca	5040
cactageace	canttgatcg	acacaagatt	taatcgccgc	gacaatttgc	gacogcocot	5100
geoggeoeg	actogagetg	gcaacgccaa	tcagcaacga	ctatttaccc	accaattatt	5160
ataccacaca	attagaata	taattgacct	concetore	contropect	ttttcccccc	5220
ttttaaaaaa	aacotocoto	acataattaa	reaccorrect	aacontotoo	taarararar	5280
coccetecte	tacgregeter	tataaaatta	ctacycygga	attoacato	ctassttasa	5340
totottactc	cycyacatog	cacaacytta	CLYYLLCCAC	accaccacc	atgatatata	5340
aget at any -	gegetateat	yccataccgc	yaaayytttt	ycyccattcg	alygigiccog	5400
ggatetegae	Geletecett	alycgactcc	Lycattagga	ageageceag	Lagraggttg	546U
aggeegttga	geacegeege	cycaaggaat	ygtgeatgea	aggagatgge	geecaacagt	JJ2U
cccccggcca	cgggggcctgc	caccataccc	acgccgaaac	aagegeteat	gageeegaag	5580
tggcgagccc	gatettecce	atcggtgatg	tcggcgatat	aggcgccagc	aaccgcacct	5640
grggcgccgg	tgatgccggc	cacgatgcgt	ccggcgtaga	ggatcgagat	ctcgatcccg	5700
cgaaat			5706			

ES 2 645 679 T3

<210> 22 <211> 121 <212> PRT <213> Virus del dengue tipo 2 5 <400>22 Met Ala Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys 1 5 10 15 Thr Gly Lys Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly 20 25 30 Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys 35 40 45 Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg 50 60 55 Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn 75 65 70 80 Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Gly Val 85 90 95 Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile 100 105 110 Gly Leu Glu His His His His His His 120 115 <210> 23 <211> 27 <212> ADN 10 <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Nde I <400>23 catatgtact cgcgggagaa gaaccag 27 15 <210> 24 <211> 22 <212> ADN <213 Secuencia Artificial <220> 20 <223 Descripción de la secuencia artificial: contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Xho I <400> 24 ctcgagtcag agttcgttgt gc 22 <210> 25 <211> 6267 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: codificación de plásmidos para la síntesis de la proteína RAPR13 de origen humano, bajo el control del promotor T7. 30 <400> 25 ttaatacgac tcactatagg ggaattgtga gcggataaca attcccctct agaaataatt 60

ttgtttaact	ttaagaagga	gatataccat	gggcagcagc	catcatcatc	atcatcacag	120
cagcggcctg	gtgccgcgcg	gcagccatat	gtactcgcgg	gagaagaacc	ageceaagee	180
gtccccgaaa	cgcgagtccg	gagaggagtt	ccgcatggag	aagttgaacc	agctgtggga	240
qaaqqcccaq	cgactgcatc	ttcctcccqt	gaggetggee	gagetccacg	ctgatctgaa	300
gatacaggag	agggacgaac	tcgcctggaa	gaaactaaag	cttgacggct	tggacgaaga	360
togogagaag	gaagegagae	tcatacqcaa	cctcaatqtc	atcttggcca	agtatggtct	420
qqacqqaaaq	aaggacgete	ggcaggtgac	cagcaactcc	ctcagtggca	cccaqqaaqa	480
coooctooat	gaccccagge	togaaaagct	gtggcacaag	acaaaaacct	ctoogaaatt	540
ctccggcgaa	gaactogaca	agetetagea	ggagttectg	catcacaaaq	agaaagttca	600
cgagtacaac	atectactaa	agaccctgag	caggaccgaa	gaaatccacg	agaacgtcat	660
tageceteg	gacetgageg	acatcaagog			acacqqaqct	720
gaaggagaag	ctococagea	tcaaccaggg		ctacacagaa		780
gaactacaac	actgaggetg		acceagata	attgacctgt	aggacctore	840
gggggggggggg	aacctcacoo	acaaggagga	gaaaacatta	caddaddadc	tcaagcactt	900
craarccaaa	atcoacaage	acaaccacta	ccacaaacac	ctogagatta	cocacoacaa	960
actagacaa	acegagaage	tagacaacaa	coagcatata	aggagaeeg	acasasaaca	1020
geegaggeae	geagagageg	ccaaccacct	agagegegeg	ataaaaaaa	atotocagoa	1020
actatacaga	aggggggggg	ccaaggagee	gggccacacg	taaataaaaa	accegoagga	1140
acadaataa	aggatette	dtaacaaaaa	cccaaaacte	actapatta	attactacca	1200
ccaccaccya	taactaggetg	aaggaattag	ccgaaaggaa	geegageegg	agaattttt	1260
cyccyaycaa	caactagtat	aggattaga	ggeetetaaa	aggatataa	gggggccctt	1320
geegaaagga	gyaactatat	taggaggagg	gaacyygacy	agettageag	aggagtacca	1320
agegeggegg	tagatttatt		gtgaccycta	tacttyccay	tagaataaa	1440
actatopota		tttaaatta	acostetocto	atttaggett	actoccorcaa	1500
gelelaate	gggggetteet	trattarat	cgattragty	ecclacggea	celegaeeee	1500
aaaaaactig	actaggguga	cygillacyl	agtgggttat	tettetter	gacgyttttt	1620
egeeettiga	egilyyagie	cacyllell	aatagtygac	contitiona	adduggaada	1620
acacceaace	clatereggt	CLALLCLUL	gatttataag	ggatttgee	gattteggee	1740
	adaatgaget	gatttaacaa	adatttaacg	cgaattttaa	Caaaatatta	1900
acguttacaa	treaggrgg	caettttegg	ggaaatgtge	geggaaceee	tatttgttta	1000
tttttttaaa	tacattcaaa	tatgtateeg	ctcatgaatt	aattettaga	aaaactcatc	1000
gagcatcaaa	tgaaactgca	atttattcat	atcaggatta	tcaataccat	attttgaaa	1920
aageegttte	tgtaatgaag	gagaaaactc	accgaggcag	ttccatagga	tggcaagate	1980
clgglalcgg	Letgegatte	cgactcgtcc	addaldala	Caaccuatta	attteeete	2040
gtcaaaaata	aggttatcaa	gtgagaaatc	accatgagtg	acgactgaat	ccggtgagaa	2100
tggcaaaagt	ttatgcattt	ctttccagac	ttgttcaaca	ggecagecat	tacgetegte	2190
atcaaaatca	ctcgcatcaa	ccaaaccgtt	atteattegt	gattgegeet	gagcgagacg	2220
aaatacgcga	tegetgttaa	aaggacaatt	acaaacagga	atcgaatgca	accggcgcag	2280
gaacactgcc	agegeateaa	caatattttc	acctgaatca	ggatattett	ctaatacetg	2340
gaatgetgtt	ttcccgggga	tcgcagtggt	gagtaaccat	gcatcatcag	gagtacggat	2400
aaaatgettg	atggteggaa	gaggcataaa	tteegteage	cagtttagtc	tgaccatete	2460
atctgtaaca	tcattggcaa	CGCTACCTT	gecatgtttc	agaaacaact	etggegeate	2520
gggcttccca	tacaatcgat	agattgtcgc	acctgattgc	ccgacattat	cgcgagccca	2580
tttataccca	tataaatcag	catccatgtt	ggaatttaat	cgcggcctag	agcaagacgt	2640
tteeegttga	atatggetea	taacacccct	tgtattactg	tttatgtaag	cagacagttt	2700
tattgttcat	gaccaaaatc	ccttaacgtg	agttttcgtt	ccactgageg	tcagaccccg	2760
tagaaaagat	caaaggatet	tettgagate	CTTTTTTTT	gcgcgtaatc	tgetgettge	2820
aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcggtgg	tttgtttgcc	ggatcaagag	ctaccaacte	2880
ttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	2940
agccgtagtt	aggecaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	gectacatae	CTCGCTCTGC	3000
taatcctgtt	accagtggct	getgeeagtg	gcgataagtc	gtgtcttacc	gggttggact	3060
caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	aacggggggt	tcgtgcacac	3120
agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	cctacagcgt	gagetatgag	3180
aaagcgccac	gcttcccgaa	gggagaaagg	cggacaggta	tccggtaagc	ggcagggtcg	3240
gaacaggaga	gcgcacgagg	gagettecag	ggggaaacgc	ctggtatctt	tatagtcctg	3300
tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gattttgtg	atgctcgtca	ggggggggga	3360
gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacggtt	cctggccttt	tgetggeett	3420
ttgctcacat	gttettteet	gcgttatccc	ctgattctgt	ggataaccgt	attaccgcct	3480
ttgagtgagc	tgataccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	gcgcagcgag	tcagtgagcg	3540
aggaagcgga	agagcgcctg	atgcggtatt	ttctccttac	gcatctgtgc	ggtatttcac	3600
accgcatata	tggtgcactc	tcagtacaat	ctgctctgat	gccgcatagt	taagccagta	3660
tacactccgc	tatcgctacg	tgactgggtc	atggctgcgc	cccgacaccc	gccaacaccc	3720
gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	agetgtgaee	3780
gtctccggga	gctgcatgtg	tcagaggttt	tcaccgtcat	caccgaaacg	cgcgaggcag	3840

ctgcggtaaa	getcatcage	gtggtcgtga	agcgattcac	agatgtctgc	ctgttcatcc	3900
gcgtccagct	cgttgagttt	ctccagaagc	gttaatgtct	ggcttctgat	aaagcgggcc	3960
atgttaaggg	cggtttttc	ctgtttggtc	actgatgcct	ccgtgtaagg	gggatttctg	4020
ttcatggggg	taatgatacc	gatgaaacga	gagaggatgc	tcacgatacg	ggttactgat	4080
gatgaacatg	cccggttact	ggaacgttgt	gagggtaaac	aactggcggt	atggatgcgg	4140
cgggaccaga	gaaaaatcac	tcagggtcaa	tgccagcgct	tcgttaatac	agatgtaggt	4200
gttccacagg	gtagccagca	gcatcctgcg	atgcagatcc	ggaacataat	ggtgcagggc	4260
gctgacttcc	gcgtttccag	actttacgaa	acacggaaac	cgaagaccat	tcatgttgtt	4320
gctcaggtcg	cagacgtttt	gcagcagcag	tcgcttcacg	ttcgctcgcg	tatcggtgat	4380
tcattctgct	aaccagtaag	gcaaccccgc	cagcctagcc	gggtcctcaa	cgacaggagc	4440
acgatcatgc	gcacccgtgg	ggccgccatg	ccggcgataa	tggcctgctt	ctcgccgaaa	4500
cgtttggtgg	cgggaccagt	gacgaaggct	tgagcgaggg	cgtgcaagat	tccgaatacc	4560
gcaagcgaca	ggccgatcat	cgtcgcgctc	cagcgaaagc	ggtcctcgcc	gaaaatgacc	4620
cagagcgctg	ccggcacctg	tcctacgagt	tgcatgataa	agaagacagt	cataagtgcg	4680
gcgacgatag	tcatgccccg	cgcccaccgg	aaggagctga	ctgggttgaa	ggctctcaag	4740
ggcatcggtc	gagatcccgg	tgcctaatga	gtgagctaac	ttacattaat	tgcgttgcgc	4800
tcactgcccg	ctttccagtc	gggaaacctg	tcgtgccagc	tgcattaatg	aatcggccaa	4860
cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	cgccagggtg	gtttttcttt	tcaccagtga	4920
gacgggcaac	agctgattgc	ccttcaccgc	ctggccctga	gagagttgca	gcaagcggtc	4980
cacgctggtt	tgccccagca	ggcgaaaatc	ctgtttgatg	gtggttaacg	gcgggatata	5040
acatgagctg	tcttcggtat	cgtcgtatcc	cactaccgag	atatccgcac	caacgcgcag	5100
cccggactcg	gtaatggcgc	gcattgcgcc	cagcgccatc	tgatcgttgg	caaccagcat	5160
cgcagtggga	acgatgccct	cattcagcat	ttgcatggtt	tgttgaaaac	cggacatggc	5220
actccagtcg	ccttcccgtt	ccgctatcgg	ctgaatttga	ttgcgagtga	gatatttatg	5280
ccagccagcc	agacgcagac	gcgccgagac	agaacttaat	gggcccgcta	acagcgcgat	5340
ttgctggtga	cccaatgcga	ccagatgctc	cacgcccagt	cgcgtaccgt	cttcatggga	5400
gaaaataata	ctgttgatgg	gtgtctggtc	agagacatca	agaaataacg	ccggaacatt	5460
agtgcaggca	gcttccacag	caatggcatc	ctggtcatcc	agcggatagt	taatgatcag	5520
cccactgacg	cgttgcgcga	gaagattgtg	caccgccgct	ttacaggett	cgacgccgct	5580
tegttetace	atcgacacca	ccacgctggc	acccagttga	tcggcgcgag	atttaatcgc	5640
cgcgacaatt	gcgacggcgc	gtgcagggcc	agactggagg	tggcaacgcc	aatcagcaac	5700
gactgtttgc	ccgccagttg	ttgtgccacg	cggttgggaa	tgtaattcag	ctccgccatc	5760
gccgcttcca	ctttttcccg	cgttttcgca	gaaacgtggc	tggcctggtt	caccacgcgg	5820
gaaacggtct	gataagagac	accggcatac	tctgcgacat	cgtataacgt	tactggtttc	5880
acattcacca	ccctgaattg	actctcttcc	gggcgctatc	atgccatacc	gcgaaaggtt	5940
ttgcgccatt	cgatggtgtc	cgggatctcg	acgetetece	ttatgcgact	cctgcattag	6000
gaagcagccc	agtagtaggt	tgaggccgtt	gagcaccgcc	gccgcaagga	atggtgcatg	6060
caaggagatg	gcgcccaaca	gtcccccggc	cacgggggcct	gccaccatac	ccacgccgaa	6120
acaagcgctc	atgagcccga	agtggcgagc	ccgatcttcc	ccatcggtga	tgtcggcgat	6180
ataggcgcca	gcaaccgcac	ctgtggcgcc	ggtgatgccg	gccacgatgc	gtccggcgta	6240
gaggatcgag	atctcgatcc	cgcgaaa		6267		

<210> 26 <211> 344 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400>26

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro 1 5 10 15 Arg Gly Ser His Met Tyr Ser Arg Glu Lys Asn Gln Pro Lys Pro Ser 20 25 30 Pro Lys Arg Glu Ser Gly Glu Glu Phe Arg Met Glu Lys Leu Asn Gln 35 40 45 Leu Trp Glu Lys Ala Gln Arg Leu His Leu Pro Pro Val Arg Leu Ala 50 55 60 Glu Leu His Ala Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Asp Glu Leu Ala Trp 70 75 80 65 Lys Lys Leu Lys Leu Asp Gly Leu Asp Glu Asp Gly Glu Lys Glu Ala 85 90 95 Arg Leu Ile Arg Asn Leu Asn Val Ile Leu Ala Lys Tyr Gly Leu Asp 100 105 110

Gly Lys Lys Asp Ala Arg Gln Val Thr Ser Asn Ser Leu Ser Gly Thr 115 120 125 Gln Glu Asp Gly Leu Asp Asp Pro Arg Leu Glu Lys Leu Trp His Lys 130 135 140 Ala Lys Thr Ser Gly Lys Phe Ser Gly Glu Glu Leu Asp Lys Leu Trp 145 150 155 160 Arg Glu Phe Leu His His Lys Glu Lys Val His Glu Tyr Asn Val Leu 165 170 175 Leu Glu Thr Leu Ser Arg Thr Glu Glu Ile His Glu Asn Val Ile Ser 180 185 190 Pro Ser Asp Leu Ser Asp Ile Lys Gly Ser Val Leu His Ser Arg His 195 200 205 Thr Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Ser Ile Asn Gln Gly Leu Asp Arg 220 210 215 Leu Arg Arg Val Ser His Gln Gly Tyr Ser Thr Glu Ala Glu Phe Glu 225 230 235 240 Glu Pro Arg Val Ile Asp Leu Trp Asp Leu Ala Gln Ser Ala Asn Leu 255 245 250 Thr Asp Lys Glu Leu Glu Ala Phe Arg Glu Glu Leu Lys His Phe Glu 260 265 270 Ala Lys Ile Glu Lys His Asn His Tyr Gln Lys Gln Leu Glu Ile Ala 275 280 285 His Glu Lys Leu Arg His Ala Glu Ser Val Gly Asp Gly Glu Arg Val 290 295 300 Ser Arg Ser Arg Glu Lys His Ala Leu Leu Glu Gly Arg Thr Lys Glu 305 310 315 320 Leu Gly Tyr Thr Val Lys Lys His Leu Gln Asp Leu Ser Gly Arg Ile 325 330 335 Ser Arg Ala Arg His Asn Glu Leu 340

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar e identificar un compuesto que protege contra una infección causada por un flavivirus, que comprende determinar la capacidad de un compuesto para bloquear la interacción entre el dominio III de la glicoproteína E de la proteína de la envoltura viral del virus del dengue, correspondiente a los aminoácidos 294 a 392 de la SEQ. ID NO. 1., y el receptor alfa-2 de macroglobulina humana, o macroglobulina alfa-2 humana.

5

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el receptor de macroglobulina alfa-2 se identifica en la lista de secuencias como SEQ. ID NO. 3.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la macroglobulina alfa-2 se identifica en la lista de secuencias como SEQ. ID NO. 2.

- 4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho flavivirus es el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el virus de la encefalitis del valle Murray, el virus del Nilo occidental, el virus Kunjin, el virus Powasan, virus Langat o el virus de la encefalitis de Saint Louis.
- 5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho compuesto se une a un fragmento de la secuencia del receptor para el virus que comprende cualquiera de los fragmentos ubicados entre los residuos de aminoácido 25 a 66, o 70 a 110, o 852 a 892, o 893 a 933, o 934 a 973, o 974 a 1013, o 1014 a 1053, o 1060 a 1099, o 1102 a 1142, o 1143 a 1182, o 2522 a 2563, o 2564 a 2602 o 2603 a 2641 o 2642 a 2690 o 2694 a 2732 o 2733 a 2771 o 2772 a 2814 o 2816 a 2855 o 2856 a 2899 o 2902 a 2940 o 3332 a 3371 o 3372 a 3410 o 3411 a 3450 o 3451 a 3491 o 3492 a 3533 o 3534 a 3572 o 3573 a 3611 o 3612 a 3649 o 3652 a 3692 o 3693 a 3733 o 3739 a 3778 de la secuencia identificada en la lista de secuencias como SEQ ID NO. 3.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho compuesto es un anticuerpo receptor de macroglobulina anti-alfa-2, o un ligando competitivo del receptor de macroglobulina alfa-2, o la proteína RAP, o la secuencia identificada en la lista de secuencias como SEQ. ID NO. 26 (RAPR13).

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho compuesto se obtiene mediante síntesis química, o mediante técnicas de ADN recombinante, o de una fuente natural.

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho compuesto bloquea la interacción entre la proteína identificada en la lista de secuencias como SEQ. ID. 1 con uno o más de los residuos definidos como un parche de unión a ligando de la proteína identificada en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 3, en donde dicho parche de unión a ligando está definido por los residuos W45, D48, E50 y D52 ;, o R90 , N93, V95

30 y D97 ;, o W871, D874, D876 y D878 ;, o W912, D915, D917 y D919 ;, o W953, D956, D958 y D960 ;, o W994, D997, D999 y D1001 ;, o W1032 , D1035, D1037 y D1039 ;, o W1080, D1083, D1085 y D1087 ;, o W1123, D1126, D1128 y D1130 ;, o K1164, D1167, N1169 y D1171 ;, o L2542, D2545, V2547 y H2549 ;, o L2583 , N2586, A2588 y D2590 ;, o S2622, N2625, F2627 y D2629 ;, o W2671, D2674, A2676 y D2678 ;, o W2713, D2716, E2718 y D2720 ;, o W2751, D2754, S2756 y D2758 ;, o W2792, D2795, D2797 y D2799 ;, o F2835, D2838, D2840 y D2842 ;, o
35 W2876, D2879, E2881 y D2883 ;, o L2922, N2925, Q2927 y D2929 ;, o W3351, D3354, E3356 y D3398 ;, o F3431, N3434, Q3436 y N3438 ;, o W3471, D3474, D3476 y D3478 ;, o W3512, D3515, E3517 y D3519 ;, o W3553, D3556, D3558 y D3560; o W3592, D3595, D3597 y D3599 ;, o W3630, D3633, D3635 y D3637 ;, o W3671, D3674, E3676 y D3678 ;, o R3714, D3717, T3619 y N3621 ;, o L3759, N3762, F3764 y D3766.

9. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el bloqueo de la interacción del virus con el 40 receptor comprende bloquear la expresión de la proteína identificada en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 3.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la expresión de la proteína identificada en la lista de secuencia como SEQ. ID NO. 3 está bloqueado por la interferencia de ARN.

11. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicho método comprende:

 a) la incubación del receptor de flavivirus de la secuencia SEQ. ID NO. 3 junto con una preparación que contiene el dominio III de la proteína de envoltura viral del Virus de Dengue, que corresponde a los aminoácidos 294 a 392 de la SEQ ID NO: 1 y el compuesto de bloqueo,

b) la cuantificación de la proteína de envoltura viral unida al receptor y

c) la comparación con la cantidad de proteína de envoltura viral unida al receptor en ausencia del compuesto de bloqueo.

50 12. Un péptido para su uso como un compuesto antiviral que bloquea la infección de las células por flavivirus, en el que dicho péptido tiene una estructura química descrita por la fórmula: Nt-C1-F2-F3-F4-F5-F6-T7-T8-T9- T10-T11-T12-G13-G14-G15-G16-G17-C18-Ct en el que,

Nt: es una extensión N-terminal opcional, formada por un grupo químico unido covalentemente al grupo N-terminal,

ES 2 645 679 T3

tal como una acetilación, o una metilación, o cualquier acilación, o un péptido, o polietilenglicol;

C1: es cisteína, lisina, ácido glutámico o ácido aspártico, en el que, cuando C1 es cisteína, C18 es cisteína y las dos cisteínas forman un puente disulfuro para formar con ello un péptido cíclico, en el que cuando C1 es lisina C18 es ácido glutámico o ácido aspártico mediante el cual dicha lisina está unido covalentemente mediante un enlace amida

5 a la cadena lateral de ácido glutámico o ácido aspártico en la posición C18, y en donde cuando C1 es ácido glutámico o ácido aspártico, C18 es lisina por lo que dicho ácido glutámico o ácido aspártico se une covalentemente por un enlace amida a la cadena lateral de la lisina en la posición C18;

F2: serina, asparagina, valina, isoleucina, treonina, fenilalanina, tirosina;

- F3: tirosina, asparagina, isoleucina;
- 10 F4: isoleucina, valina, treonina, fenilalanina, tirosina;
 - F5: valina, isoleucina, tirosina, treonina, fenilalanina;
 - F6: isoleucina, valina, treonina, fenilalanina, tirosina;
 - T7: glicina;
 - T8: valina, alanina, isoleucina, serina, treonina, arginina;
- 15 T9: glicina, ácido glutámico;

T10: ácido glutámico, ácido aspártico, treonina, asparagina, prolina;

- T11: lisina, arginina, asparagina, glicina, serina, treonina, glutamina;
- T12: glutamina, alanina, arginina;
- T13: isoleucina, leucina, valina, fenilalanina, treonina;
- 20 T14: lisina, arginina, asparagina, treonina;
 - T15: leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, tirosina, treonina, histidina;
 - T16: asparagina, ácido aspártico, serina, histidina, glutamina;
 - T17: triptófano, fenilalanina, tirosina;
- C18: es cisteína, lisina, ácido glutámico o ácido aspártico, en donde cuando C18 es cisteína, C1 también es cisteína y ambas cisteínas C1 y C18 forman un puente disulfuro, forman de este modo un péptido cíclico, en el que cuando C18 es lisina, C1 es ácido glutámico o ácido aspártico por el que dicha lisina está unida covalentemente mediante un enlace de amida a la cadena lateral de ácido glutámico o ácido aspártico en la posición C1, y en la que cuando C18 es ácido glutámico o ácido aspártico, C1 es lisina por lo que dicho ácido glutámico o ácido aspártico se une covalentemente por un enlace de amida a la cadena lateral de lisina en la posición C1;
- 30 Ct: es una extensión C-terminal opcional, un grupo químico unido covalentemente al grupo carbonilo terminal, acetilación, metilación, péptido, polietilenglicol, acilación.

13. Un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, identificado en la lista de secuencias como SEQ. ID NOs. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18.

- 14. Un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que dicho péptido es el principio activo de una composición farmacéutica.
 - 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho método comprende:

a) El uso de las coordenadas atómicas de un modelo de la estructura tridimensional de un péptido que tiene una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en una conformación de acuerdo con la estructura de una horquilla beta antiparalela que incluye un giro beta en el bucle de conexión entre las cadenas beta.

40 b) El uso de las coordenadas atómicas de un modelo de la estructura tridimensional de uno de los dominios de unión de ligandos de la secuencia identificada en la lista de secuencia como SEQ. ID NO. 3, que se ha determinado experimentalmente o modelado por medios computacionales.

c) Un procedimiento computacional de acoplamiento molecular que permite la reproducción de los detalles atómicos de la interacción de las estructuras descritas en el paso a) con las estructuras descritas en el paso b).

45 d) El uso del procedimiento de acoplamiento computacional descrito en 18c para la selección de una base de datos

ES 2 645 679 T3

de estructuras moleculares de aquellos compuestos que reproducen las características de la interacción descrita en el paso c), como agentes bloqueadores para la infección del virus.

16. El uso *in vitro* de los compuestos que bloquean la interacción viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14 para la determinación de la susceptibilidad de una célula y/o un organismo a la infección por el virus del dengue.

5

17. Un compuesto para uso en la prevención o el tratamiento de la infección con un flavivirus, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de macroglobulina anti-alfa-2 y un fragmento del mismo, anticuerpo antirreceptor de macroglobulina alfa-2, un ligando para el receptor de macroglobulina alfa-2 y un péptido de unión a macroglobulina alfa-2, en el que dicho compuesto bloquea la interacción entre la proteína de entendimo anti-alfa-2 y un fragmento de unión a macroglobulina alfa-2, en el que dicho compuesto bloquea la interacción entre la proteína de entendimo de unión entre la proteína de entendimo de unión entre la proteína de entendimo de unión entre la proteína de entendimo de entendimo de unión entre la proteína de entendimo de entend

10 envoltura viral (E) de un flavivirus y macroglobulina alfa-2 humana (A2M) identificada en la lista de secuencias como SEQ. ID NO. 2 o en el que dicho compuesto bloquea la interacción entre la proteína de envoltura viral (E) de un flavivirus y el receptor de macroglobulina alfa-2 humano (A2MR).

18. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho compuesto es el principio activo de una composición farmacéutica.

15 19. El uso *in vitro* de un compuesto seleccionado entre un anticuerpo macroglobulina anti-alfa-2, un ligando para la macroglobulina alfa-2 o un péptido de unión a macroglobulina alfa-2 que bloquea la interacción de la proteína de envoltura viral (E) de un flavivirus con alfa-2 macroglobulina (A2M) identificada en la lista de secuencias como SEQ. ID NO. 2 para la determinación de la susceptibilidad de un organismo a la infección por el virus del dengue.

20. Péptidos identificados en la lista de secuencias como SEQ. ID NOs. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 20 y 18.

21. Péptidos de acuerdo con la reivindicación 20, en los que dichos péptidos son los compuestos que interfieren con la interacción del virus con el receptor celular, preferiblemente el receptor celular identificado en la lista de secuencias como SEQ. ID NO. 3.

22. Péptidos de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, en los que dichos péptidos son el principio activo de una composición farmacéutica con propiedades antivirales.



Figura 1





Masa (Da)



Figura 4





Figura 5



Figura 6



Figura 7



Figura 8

Figura 9

				Ŧ	8 8	1			-1
				* .	¥ ¥	÷.	**		
31	TTCSP-VO-FA	- CPD	-OTTOTOTO	WDC	1	non	CONPA-1	- propo	13
32	OPCOP-NE-NN	-CLC	-VIICIBNG	-WRC	Magur	NDCP1	DOSDER-1	BICPU	42
23	POCOP-CR-FA	- CB-	NEDCICIORD	WP C	navy	DCU	DISDE	NLCHO	41
24	UTCD	CP.	NNDCIQUE	-MLC	nana	DCG	CRODER-1		41
35	PTCPP-NO-PS	-Ch-	-RODCIDIS	-1170-04		DCG	DODDO-P	NGCIV	41
- 36	PTCPPLTO-FT	. (1)	NODOTNIN	NDC	DND	mag	NODE		40
27	HECS.	- CN -	-SGDCIDEU	-5770	nam	meet	NODE	AUCTH	40
20	GGCHT-DR-RO	OPT.	-DOLCIPSI	NDC		TD CM	Nacus-	- RACIA	40
20	HUCD P-SVERG	-080	-GADCIFDA	-MUCH	nana	DCM	NODE	- DNCDG	40
210	LACE	- C2N	- 000 - 000 000 - 000	WT.C	NONT	DCG	MODE	PICes	40
811	SCOD ACDR - FF	- CAM	NGPCINDS	1.70	DOWN	DCG1	NO ODDEC	VCNG	40
812	BDOW FTED O	-ce	-MODCUGHM	TMC	1/231	non	CASERTE.	Chy Chy	30
311	TACC	- 00-	-DOPCIONS	SPC	NOR	merri	DACORNY.		20
3.14	THORSEYPDLOUF ONLED	משיאם	Tel CVape	-55701	1211	move	VSDE-	PDCDC	30
216	DDCD	-CD-	- CODCINES	-NPC	OVDI	DCB		TUCNY	32
316	VPCG	CON	UD_CICKO	-WI.C	naet	DCG	CODE	U-CRC	40
A10	VTCC	-CPG	THUCUPED	-MLC	nani	DCM	DGADEST	ACCLV	43
219	STCDD-BB-FM	-CON	-DO-CIPIU	-FVC	DUD	DCAL	DOGDES-I	R-CEV	40
310	PTCC	- C2 -	NGPCT. GGD	OWRC	DOP	men	DOGDES - I	ENDUCTS	44
320	UTCN	-05-	-SCPCVARA	-LLC	NGOT	DCG	DESDERG.	CH-	30
301	CNCTA-SO-FV	CTN	D. FCIPPN	WYC	OTEI	ncat	hugher_	D-CPE	40
122	PTCPP-CO-PO	-08-	TGT CTHES	-FIC	DODE	mcol	DUSDE	ANCDT	30
322	WCLASSES P.SO.PK	CTN.	TUPCIPCI	PROM	NGOT	NCG	GEDE	POCPE	40
124	UTCL	-05-	TERCIPRU	-WVC	DRDA	mevi	DGSDR - F	ANCTO	41
325	MTCGV-DR-PP	- CED	-GODOTDED	-100 (1	DOIRE	Deel	VGSDEP - 1	RECDE	42
326	PTCP	-CY-	NNPCVPGP	-WOC	DYDA	mca	NSDER -	In CTP	30
127	DDCG	-CA-	NGRCTLGR	-WRC	DODE	IDCAL	GSDEK -I	CTP	30
120	PPCDM-DO-PO	-cr-	-SCHCIPLP	-WPC	DIDI	DCM	DGSDE	RACGT	30
320	PTCD	- CNN	T-LCEPLA	-WV C	DGIET	DCG	DNSDEN-F	BECAR	41
230	PVCP	- CEN	-DRUCTNIG	-800	DOTT	NCG	OGTOR	BDCEP	41
131	THCKDKKR-FL	-CR-	NOPCLESS	-LRC	NMPT	DCG	GSDERD.	CSI	40
1999 L	1	20.				10.			
	A							4	

1 mm

69



Figura 10



Figura 12

	Péptido	Secuencia	Región correspondiente en el dominio III de VD2
-	HIII2Cs	CIIGVEPGQLKC	379-388
	pepDIII-1	GCGVEPGQC	381-386
	pepDIII-2	KGMSYSMCTGKFKngQYEGDGSPCKIP	295-307/325-336

в






ES 2 645 679 T3





suero











Figura 17

Figura 18

DV1	SYIVVGAGEKALKLSW
DV2	SYIIIGVEPGQLKLNW
DV3	SNIVIGIGDKALKINW
DV4	SYIVIGVGNSALTLHW
YFV	SYIIVGRGDSRLTYQW
WNV	SYIVVGRGEQQINHHW
MVE	SYIVVGRGDKQINHHW
KUNJ	SYIVVGRGEQQINHHW
JAE	SYIVVGRGDKQINHHW
SLE	SYIVVGRGTTQINYHW
TBE	NIIYVGELSHQW
LAN	NIIYVGDLNHQW
POW	NIIYVGDLSQQW



Figura 20





Figura 21



