

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 827**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2015** **PCT/EP2015/066419**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016** **WO16009044**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2015** **E 15738909 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020** **EP 3169701**

54 Título: **Péptidos que incluyen un dominio de unión de la subunidad de la fosfoproteína (P) viral a la nucleoproteína (N0) libre de ARN viral**

30 Prioridad:

18.07.2014 EP 14306168

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

25.03.2021

73 Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (20.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%);
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD (20.0%);
ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON (ENS LYON) (20.0%) y
UNIVERSITE GRENOBLE ALPES (20.0%)

72 Inventor/es:

VOLCHKOV, VIKTOR;
JAMIN, MARC;
LAWRENCE, PHILIP y
YABUKARSKI, FILIP

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 813 827 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos que incluyen un dominio de unión de la subunidad de la fosfoproteína (P) viral a la nucleoproteína (N⁰) libre de ARN viral

CAMPO DE LA INVENCION:

- 5 La invención se refiere a péptidos aislados que incluyen un dominio de unión de la subunidad de la fosfoproteína viral (P) a la nucleoproteína libre de ARN viral (N⁰) que tiene la propiedad de inhibir la replicación de virus de la subfamilia *Paramyxovirinae* (como Henipavirus, Rubulavirus o Morbillivirus). Estos péptidos aislados se pueden usar para la prevención o el tratamiento de infección por *Paramyxovirinae*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

- 10 Los *Paramyxoviridae* son una gran familia de virus de ARN de cadena negativa no segmentado (NNV) asociados con enfermedades respiratorias humanas (por ejemplo, virus sincitial respiratorio (RSV), virus de parainfluenza humana) y con enfermedades comunes de la infancia tales como el sarampión y las paperas. Debido a las relaciones filogenéticas, *Paramyxoviridae* se dividen en dos subfamilias, los *Paramyxovirinae* y los *Pneumovirinae*, y se clasifican en el orden *Mononegavirales* con las familias *Rhabdoviridae*, *Bornaviridae* y *Filoviridae*¹⁰. El virus Nipah (NiV) es emblemático de los virus emergentes; extendiéndose de sus huéspedes murciélagos naturales en el Sudeste Asiático, este virus causa brotes de enfermedades respiratorias y encefálicas en diversos mamíferos, incluyendo seres humanos¹. Su tasa de mortalidad, que puede superar el 70% en seres humanos, su potencial de transmisión de persona a persona, y la ausencia de vacuna o tratamiento antiviral específico clasifican al NiV entre los patógenos de nivel 4 de bioseguridad (BSL-4).
- 20 El ARN genómico de NiV, al igual que el de todos los NNV, está condensado por un homopolímero de nucleoproteína (N), formando nucleocápsides helicoidales largas (NC). Estos complejos de ribonucleoproteínas son las plantillas biológicamente activas usadas para la síntesis de ARN por la ARN polimerasa viral dependiente de ARN^{2,3}, y de este modo, la replicación de estos virus requiere el suministro continuo de moléculas de N sin ensamblar para encapsidar las moléculas de ARN de la progenie de sentido positivo y negativo⁴.
- 25 Según la capacidad de las NC de los NNV para proteger el ARN genómico frente a nucleasas, las proteínas N comprenden dos dominios globulares, N-terminal (N_{NTD}) y C-terminal (N_{CTD}), que envuelven completamente la molécula de ARN⁵⁻⁸ (Figura 1a). El homopolímero N se estabiliza mediante contactos laterales y mediante el intercambio de los subdominios N-terminal (N_{TARM}) y C-terminal (C_{TARM}) entre protómeros adyacentes⁵⁻⁸. La N de *Paramyxovirinae* tiene una cola C-terminal desordenada larga adicional (N_{TAIL}) que se extiende fuera de la NC y se une al dominio C-terminal de P (P_{XD})¹¹⁻¹³. El fuerte empaquetamiento del ARN plantea la hipótesis de que N debe abrirse y cerrarse para alojar el ARN dentro del surco de unión durante el proceso de ensamblaje de la NC y para liberar transitoriamente la plantilla de ARN al paso de la ARN polimerasa, pero, hasta ahora, no hay pruebas de una conversión entre formas abiertas y cerradas de N.
- 30 En ausencia de otras proteínas virales, N tiene una fuerte tendencia a polimerizarse y ensamblarse en los ARN celulares. En *Paramyxoviridae*, pero también en *Rhabdoviridae*, y quizás en todos los NNV, una proteína viral actúa como una chaperona específica de la N naciente, y la mantiene en una forma competente para el ensamblaje (N⁰), evitando tanto su polimerización como su interacción con los ARN celulares^{9,14}. Las proteínas P de *Paramyxoviridae* y *Rhabdoviridae* son proteínas modulares multifuncionales, que comprenden una región N-terminal larga intrínsecamente desordenada (PNTR) y una región C-terminal (PCTR) con un dominio de multimerización (PMD) conectado por un enlazador flexible a un dominio de unión de NC (PXD)^{11,15,16} (Fig. 1a), y por lo tanto, son altamente flexibles en disolución¹⁷. En ambas familias, una región N-terminal corta de P es suficiente para satisfacer ambos papeles de la chaperona^{9,18}. Aquí, los inventores estudian el complejo nuclear soluble de N⁰-P de NiV para comprender el mecanismo de ensamblaje de la NC.
- 35 Cuando se expresa en células humanas, este dominio de unión de P a N⁰, que comprende los primeros 40 aa de P de NiV, es capaz de inhibir la replicación del virus Nipah. La mutagénesis basada en la estructura válida al complejo N⁰-P como la diana para la actividad inhibidora del péptido P, y para el desarrollo de fármacos contra miembros altamente patógenos de la subfamilia *Paramyxovirinae*, incluyendo NiV. La conservación de la secuencia en la interfaz de unión entre N y P entre diversos miembros de la subfamilia *Paramyxovirinae* plantea la posibilidad de desarrollar un fármaco de amplio espectro contra varios virus.
- 40 La secuencia polipeptídica de proteínas virales, o ácidos nucleicos que codifican un polipéptido derivado de fosfoproteína, tal como la fosfoproteína del sarampión, se ha dado a conocer en la técnica y en bases de datos referenciadas, tales como la base de datos UniProtKB (E7DWI2).

El documento WO2002000694 da a conocer polipéptidos que pueden unirse a la nucleoproteína.

Sigue existiendo la necesidad de inhibir la replicación viral de *Paramyxovirinae*.

- 55 También existe la necesidad de tratar o prevenir una infección por *Paramyxovirinae*.

SUMARIO:

La invención proporciona un péptido aislado de 100 aminoácidos como máximo, que tiene la capacidad de inhibir la replicación viral de Paramyxovirinae, que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula (I):

Valina-Xaa1-Xaa2-Glicina-Leucina-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8, en la que:

- 5 Xaa1 es glutamina (Q), serina (S) o asparagina (N), lisina (K), o un aminoácido polar equivalente;
- Xaa2 es ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), asparagina (N), lisina (K), o un aminoácido (o ácido) equivalente cargado negativamente;
- Xaa3 es ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), lisina (K), glutamina (Q), serina (S) o asparagina (N);
- Xaa4 es cisteína (C), isoleucina (I);
- 10 Xaa5 es isoleucina (I), leucina (L) o valina (V) o un aminoácido alifático apolar equivalente;
- Xaa6 es glutamina (Q), lisina (K), arginina (R) o ácido aspártico (D);
- Xaa7 es alanina (A) o fenilalanina (F), o un aminoácido apolar equivalente;
- Xaa8 es isoleucina (I), leucina (L) o valina (V), o un aminoácido alifático apolar equivalente.

- 15 En realizaciones preferidas, Xaa5 es isoleucina (I), y Xaa8 es isoleucina (I). En realizaciones preferidas, Xaa1 es asparagina (N) o glutamina (Q), Xaa2 es ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E), Xaa3 es asparagina (N) o ácido glutámico (E), Xaa4 es isoleucina (I) o cisteína (C), Xaa5 es isoleucina (I), Xaa6 es ácido aspártico (D) o glutamina (Q), Xaa7 es fenilalanina (F) o alanina (A), y Xaa8 es isoleucina (I).

La invención también proporciona un péptido aislado de 100 aminoácidos como máximo, que tiene la capacidad de inhibir la replicación viral de Paramyxovirinae, que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (II):

- 20 Yaa1-Yaa2-Yaa3-Yaa4-Yaa5-Valina-Xaa1-Xaa2-Glicina-Leucina-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Yaa6-Yaa7-Yaa8, en la que
- Xaa1-Xaa2 Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8 se definen anteriormente
- Yaa1 es ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), o un aminoácido ácido equivalente.
- Yaa2 es glutamina (Q) o lisina (K),
- 25 Yaa3 es alanina (A), leucina (L) o tirosina (Y),
- Yaa4 es ácido glutámico (E), tirosina (Y) o arginina (R),
- Yaa5 es asparagina (N), histidina (H) o leucina (L),
- Yaa6 es glutamina (Q), lisina (K), o arginina (R),
- Yaa7 es lisina (K), alanina (A) o ácido glutámico (E),
- 30 Yaa8 es asparagina (N), ácido glutámico (E) o serina (S).

En realizaciones preferidas, Yaa1 es ácido aspártico (D). En realizaciones preferidas, Yaa1 es ácido aspártico (D), Yaa2 es lisina (K) o glutamina (Q), Yaa3 es leucina (L) o alanina (A), Yaa4 es ácido glutámico (E), Yaa5 es leucina (L) o asparagina (N), Yaa6 es glutamina (Q), Yaa7 es lisina (K), y Yaa8 es asparagina (N).

- 35 En una realización preferida, el péptido aislado comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3), o la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de valina en la posición 7 hasta el resto de isoleucina en la posición 17 en SEQ ID NO: 1 P7-17 de SEQ ID NO:1

En algunas realizaciones, el péptido aislado se une con al menos un péptido de penetración celular,

También se engloban polinucleótidos que comprenden o consisten en una secuencia nucleotídica que codifica un péptido según la invención,

- 40 La invención se refiere además a métodos para preparar o generar los péptidos de la invención.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un péptido de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y al uso de los péptidos o la composición farmacéutica según la invención para tratar o prevenir la infección por Paramyxovirinae.

La invención se refiere además a un péptido aislado de 100 aminoácidos como máximo, para uso en un método para prevenir y/o tratar una infección por Paramyxovirinae; comprendiendo dicho péptido aislado una secuencia de aminoácidos de fórmula (I).

DESCRIPCIÓN DETALLADA:

- 5 Los inventores han identificado la secuencia de la subunidad de la Fosfoproteína P viral en la región N-terminal que interactúa con su pareja, la nucleoproteína viral libre de ARN no ensamblada (N⁰) (SEQ ID NO.1: MDKLELVNDGLNIIDFIQKNQKEIQKTYGRSSIQQPSIKD, posiciones 1-40 de la secuencia de Fosfoproteína P de Nipah viral depositada en la base de datos Swiss-Prot con el número de acceso Q9IK91). Este dominio de unión de N⁰ corresponde a las posiciones de aminoácidos 1-40. Este dominio de unión de P a N⁰, cuando se expresa en las
- 10 células, es capaz de inhibir la replicación del virus Nipah. Los inventores han identificado la pareja proteica molecular de este péptido (la nucleoproteína N⁰ viral no ensamblada) y han resuelto la estructura cristalina del complejo. Los inventores han obtenido pruebas de que el péptido compite con la fosfoproteína P nativa por la unión a esta pareja proteica. La interfaz entre la fosfoproteína P y la nucleoproteína N⁰ se conserva entre varios miembros de la subfamilia viral *Paramyxovirinae* (incluyendo los virus del sarampión y las paperas).
- 15 Los inventores también han generado péptidos aislados más cortos de esta subunidad de fosfoproteína P 1-40 de Nipah con diferentes longitudes: entre 11 y 37 aminoácidos (P6-40, P11-40; P1-20; P20-35 y P7-17) que tienen la capacidad de inhibir la interacción de fosfoproteína P / nucleoproteína N⁰, y consecutivamente inhibir la replicación viral.
- 20 Los inventores han generado además péptidos aislados a partir de la subunidad de fosfoproteína P de CDV, que consiste en los restos 1 a 40 (SEQ ID NO.2: MAEEQAYHVSKGLECLKALRENPPDIEEIQEVSSLRDQTC, posiciones 1-40 de la secuencia de fosfoproteína P de CDV viral (cepa de referencia NCBI NC_001921.1)) y péptidos más cortos P1-22, P9-19, que exhiben una actividad similar a la subunidad de fosfoproteína P 1-40 del virus Nipah.
- Los inventores han generado además, basándose en esta secuencia conservada de la subunidad de fosfoproteína P entre los miembros de la subfamilia viral *Paramyxovirinae*, un péptido de consenso que incluye los restos conservados
- 25 (en negrita) y los mejores restos en las otras posiciones (SEQ ID NO.3: DQAEENVQEGLECIQAIQKN).
- Los inventores han generado además péptidos aislados a partir de la subunidad de fosfoproteína P del virus del sarampión, que consiste en los restos 1 a 40 (SEQ ID NO.4: MAEEQARHVKNGLCEIRALKAEPISGLAIEEAMAAWSEIS, posiciones 1-40 de la secuencia de fosfoproteína P de MeV viral depositada en la base de datos Swiss-Prot con el número de acceso (Q76VZ7_MEASE) y el péptido más
- 30 corto P9-19, que exhibe una actividad similar a la subunidad de fosfoproteína P 1-40 del virus Nipah.
- Los inventores han encontrado así una nueva terapia dirigida para tratar la infección viral por miembros de la subfamilia *Paramyxovirinae* sin terapia dirigida disponible. Dicha invención es particularmente ventajosa para tratar infecciones por rubulavirus, henipavirus, morbilivirus.

Definiciones:

- 35 A lo largo de la memoria descriptiva, se emplean varios términos y se definen en los siguientes párrafos.
- Como se usa aquí, el término "*Paramyxovirinae*" denota una subfamilia de los *Paramyxoviridae*. Los miembros de esta subfamilia son virus con cubierta con un genoma de ARN monocatenario, negativo, no segmentado, encapsidado por una nucleoproteína (N) codificada viralmente dentro de una nucleocápside helicoidal. La transcripción y replicación de esta plantilla (N:ARN) se llevan a cabo mediante un complejo de ARN polimerasa dependiente de ARN viral,
- 40 compuesto de la fosfoproteína (P) y la proteína grande (L) (revisado por Lamb y Kolakofsky, 2001). La asociación de P con la forma monomérica soluble de N (N⁰) evita su autoensamblaje ilegítimo en el ARN celular. "*Paramyxovirinae*" incluye los principales patógenos humanos, tales como el virus de la parainfluenza y el virus del sarampión (MV),

Los diferentes géneros "*Paramyxovirinae*" son:

- 45 Género Aquaparamyxovirus (especie tipo paramixovirus del salmón del Atlántico; otros incluyen paramixovirus del salmón del Pacífico)
- Género Avulavirus (especie tipo virus de la enfermedad de Newcastle)
- Género Ferlavirus (virus Fer-de-Lance)
- Género Henipavirus (especie tipo Hendravirus; otros incluyen el virus Nipah)
- 50 Género Morbillivirus (especie tipo virus del sarampión; otros incluyen virus de la peste bovina, virus del moquillo canino, virus del moquillo focino, virus de la peste ovina)
- Género Respirovirus (especie tipo virus Sendai; otros incluyen los virus 1 y 3 de la parainfluenza humana, así como algunos de los virus del resfriado común)

Género Rubulavirus (especie tipo virus de las paperas; otros incluyen virus Achimota 1 y 2, virus 2 y 4 de la parainfluenza humana, virus 5 de la parainfluenza del simio, virus de Menangle, virus de Tioman, Tuhokovirus 1, 2 y 3)

Virus similares al género TPMV (especie paramyxovirus tipo Tupaia: otras especies virus de Mossman, virus Nariva y virus Salem)

Como se usa aquí, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales o no naturales en sus estereoisómeros D y L para aminoácidos quirales. Se entiende que se refiere tanto a aminoácidos como a los restos de aminoácidos correspondientes, tal como están presentes, por ejemplo, en la estructura peptídica. Los aminoácidos naturales y no naturales son bien conocidos en la técnica. Los aminoácidos naturales comunes incluyen, sin limitación, alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), y valina (Val). Los aminoácidos poco comunes y no naturales incluyen, sin limitación, alilglicina (AllylGly), norleucina, norvalina, bifenilalanina (Bip), citrulina (Cit), 4-guanidinofenilalanina (Phe(Gu)), homoarginina (hArg), homolisina (hLys), 2-naftilalanina (2-Nal), ornitina (Orn) y pentafluorofenilalanina.

Los aminoácidos se clasifican típicamente en una o más categorías, que incluyen polares, hidrófobos, ácidos, básicos y aromáticos, según sus cadenas laterales. Los ejemplos de aminoácidos polares incluyen aquellos que tienen grupos funcionales de cadena lateral tales como hidroxilo, sulfhidrilo, y amida, así como los aminoácidos ácidos y básicos. Los aminoácidos polares incluyen, sin limitación, asparagina, cisteína, glutamina, histidina, selenocisteína, serina, treonina, triptófano y tirosina. Los ejemplos de aminoácidos hidrófobos o no polares incluyen aquellos restos que tienen cadenas laterales alifáticas apolares, tales como, sin limitación, leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, prolina, metionina y fenilalanina. Los ejemplos de restos de aminoácidos básicos incluyen aquellos que tienen una cadena lateral básica, tal como un grupo amino o guanidino. Los restos de aminoácidos básicos incluyen, sin limitación, arginina, homolisina y lisina. Los ejemplos de restos de aminoácidos ácidos incluyen aquellos que tienen un grupo funcional de cadena lateral ácido, tal como un grupo carboxi. Los restos de aminoácidos ácidos incluyen, sin limitación, ácido aspártico y ácido glutámico. Los aminoácidos aromáticos incluyen aquellos que tienen un grupo de cadena lateral aromático. Los ejemplos de aminoácidos aromáticos incluyen, sin limitación, bifenilalanina, histidina, 2-naftilalanina, pentafluorofenilalanina, fenilalanina, triptófano y tirosina. Se observa que algunos aminoácidos se clasifican en más de un grupo; por ejemplo, la histidina, el triptófano y la tirosina se clasifican como aminoácidos tanto polares como aromáticos. Los aminoácidos se pueden clasificar además como aminoácidos no cargados o cargados (positiva o negativamente). Los ejemplos de aminoácidos cargados positivamente incluyen, sin limitación, lisina, arginina e histidina. Los ejemplos de aminoácidos cargados negativamente incluyen, sin limitación, ácido glutámico y ácido aspártico. Las personas no especializadas en la técnica conocen aminoácidos adicionales que se clasifican en cada uno de los grupos anteriores.

“Aminoácido equivalente” significa un aminoácido que puede ser sustituido por otro aminoácido en los compuestos peptídicos según la invención sin ninguna pérdida apreciable de función. Las personas no especializadas en la técnica reconocerán aminoácidos equivalentes. La sustitución de aminoácidos similares se realiza sobre la base de la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral, por ejemplo con respecto al tamaño, la carga, la hidrofilia y la hidrofobia como se describe aquí. La frase “o un aminoácido equivalente del mismo”, cuando se usa después de una lista de aminoácidos individuales, significa un equivalente de uno o más de los aminoácidos individuales incluidos en la lista.

Los términos N y C de los péptidos descritos aquí pueden protegerse contra la proteólisis. Por ejemplo, el termino N puede estar en forma de un grupo acetilo, y/o el termino C puede estar en forma de un grupo amida. También se prevén modificaciones internas de los péptidos para que sean resistentes a la proteólisis, por ejemplo en las que al menos un enlace peptídico -CONH se modifica y se reemplaza por un enlace reducido (CH₂NH), un enlace retro-inverso (NHCO), un enlace metilen-oxi (CH₂-O), un enlace tiometileno (CH₂-S), un enlace carba (CH₂CH₂), un enlace cetometileno (CO-CH₂), un enlace hidroxietileno (CHOH-CH₂), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o también un enlace -CH=CH. Los péptidos descritos aquí también pueden protegerse contra la proteólisis mediante la técnica de péptidos grapados, como se describe por Walensky et al. Science. 2004, 305, 1466-70.

En otro aspecto de la invención, los péptidos se unen covalentemente a una molécula de polietilenglicol (PEG) mediante su término C o un resto de lisina, en particular un PEG de 1500 o 4000 MW, para una disminución del aclaramiento urinario y en las dosis terapéuticas usadas, y para un aumento de la vida media en el plasma sanguíneo. En aún otra realización, la vida media del péptido aumenta al incluir el péptido en un material polimérico biodegradable y biocompatible para microesferas formadoras de sistemas de administración de fármacos. Los polímeros y copolímeros son, por ejemplo, poli (D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) (como se ilustra en el documento US2007/0184015, SoonKap Hahn et al).

Las expresiones “péptido de penetración celular” o “CPP” se usan indistintamente, y se refieren a péptidos de penetración celular catiónicos, también denominados péptidos de transporte, péptidos portadores, o dominios de transducción de péptidos. El CPP, como se muestra aquí, tiene la capacidad de inducir la penetración celular de un péptido fusionado al CPP dentro del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de las células de un determinada

población de cultivo celular, incluyendo todos los números enteros intermedios, y permite la translocación macromolecular dentro de múltiples tejidos in vivo tras la administración sistémica. Un péptido de penetración celular también puede referirse a un péptido que, cuando se pone en contacto con una célula en condiciones apropiadas, pasa del entorno externo al entorno intracelular, incluyendo el citoplasma, orgánulos tales como mitocondrias, o el núcleo de la célula, en condiciones significativamente mayores que la difusión pasiva. Dichos péptidos penetrantes pueden ser los descritos en Fonseca S.B. et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61: 953-964, Johansson et al., *Methods in Molecular Biology*, 2011, Vol. 683, Capítulo 17, Bechara y Sagan, (2013) *FEBS letters* 587, 1693-1702.; Jones y Sayers (2012), *Journal of controlled release* : official journal of the Controlled Release Society 161, 582-591; Khafagy et al. y Morishita, (2012) *Advanced drug delivery reviews* 64, 531-539; Malhi y Murthy, (2012) *Expert opinion on drug delivery* 9, 909-935, en el documento WO2004/011595 y en el documento WO2003/011898. Todos esos CPP se incorporan como referencia.

Por "condiciones rigurosas", se entienden las condiciones de temperatura y fuerza iónica que permiten la hibridación específica entre dos fragmentos de ácido nucleico complementarios y que limitan la unión no específica (Sambrook et al. *Molecular Cloning*, Segunda edición (1989), 9.47-9.62). Las condiciones de temperatura generalmente están comprendidas entre ($T_m - 5^\circ\text{C}$) y ($T_m - 10^\circ\text{C}$), siendo T_m la temperatura de fusión teórica, que se define como la temperatura a la que se separa el 50% de las hebras emparejadas. Para secuencias que comprenden más de 30 bases, T_m se define por la fórmula: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ G+C}) + 16,6 \log (\text{concentración de cationes}) - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - (600/\text{número de bases})$. Para secuencias que comprenden menos de 30 bases, T_m se define por la fórmula: $T_m = 4 (\text{G+C}) + 2 (\text{A+T})$.

Como se usa aquí, la expresión "farmacéuticamente aceptable", y las variaciones gramaticales de la misma, ya que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente, y representan que los materiales son capaces de administrarse a o sobre un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos no deseables tales como náuseas, mareos, malestar gástrico, y similares.

El término "paciente" o "sujeto" se refiere a un mamífero humano o no humano, preferiblemente un ratón, gato, perro, mono, caballo, ganado (es decir, vaca, oveja, cabra, búfalo), incluyendo hombres, mujeres, adultos y niños.

Como se usa aquí, el término "tratamiento" o "terapia" incluye tratamiento curativo y/o profiláctico. Más particularmente, el tratamiento curativo se refiere a cualquier alivio, mejora y/o eliminación, reducción y/o estabilización (por ejemplo, no progresar a etapas más avanzadas) de un síntoma, así como al retraso en la progresión de un síntoma de un determinado trastorno. El tratamiento profiláctico se refiere a cualquiera de: detener el inicio, reducir el riesgo de desarrollo, reducir la incidencia, retrasar el inicio, reducir el desarrollo, así como aumentar el tiempo hasta la aparición de los síntomas de un trastorno en particular.

Péptidos aislados

La presente descripción da a conocer nuevos péptidos aislados derivados de la fosfoproteína P N-terminal del virus Paramyxovirinae, que tienen capacidad para inhibir la interacción de fosfoproteína P / nucleoproteína N⁰ del virus Paramyxovirinae; y/o inhibir la replicación viral de Paramyxovirinae.

En un aspecto, la invención proporciona un péptido aislado de 100 aminoácidos como máximo, que tiene la capacidad de inhibir la replicación viral de Paramyxovirinae, que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula (I):

Valina-Xaa1-Xaa2-Glicina-Leucina-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8,

en la que:

Xaa1 es glutamina (Q), serina (S), asparagina (N), lisina (K) o un aminoácido polar equivalente.

Xaa2 es ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), asparagina (N), lisina (K), o un aminoácido (o ácido) equivalente cargado negativamente,

Yaa1 es ácido aspártico (D), ácido glutámico (E) o un aminoácido ácido equivalente,

Yaa2 es glutamina (Q) o lisina (K),

Yaa3 es alanina (A), leucina (L) o tirosina (Y),

Yaa4 es ácido glutámico (E), o tirosina (Y) o arginina (R),

Yaa5 es asparagina (N), histidina (H) o leucina (L),

Yaa6 es glutamina (Q), lisina (K) o arginina (R),

Yaa7 es lisina (K), alanina (A) o ácido glutámico (E),

Yaa8 es asparaginas (N), ácido glutámico (E) o serina (S).

En realizaciones preferidas, Yaa1 es ácido aspártico (D). En realizaciones preferidas, Yaa1 es ácido aspártico (D), Yaa2 es lisina (K) o glutamina (Q), Yaa3 es leucina (L) o alanina (A), Yaa4 es ácido glutámico (E), Yaa5 es leucina (L) o asparagina (N), Yaa6 es glutamina (Q), Yaa7 es lisina (K), y Yaa8 es asparagina (N).

- 5 En una realización preferida, el péptido comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3 DQAEENVQEGLECIQAIQKN) o la secuencia de aminoácidos que oscila desde el resto de valina en la posición 7 al resto de isoleucina en la posición 17 en SEQ ID NO: 1 P7-17 de SEQ ID N01.

Preferiblemente, un péptido aislado según la invención tiene la capacidad (i) de inhibir la interacción de fosfoproteína P / nucleoproteína N⁰ del virus *Paramyxovirinae*; y/o (ii) de inhibir la replicación viral de *Paramyxovirinae*.

- 10 Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente si el péptido aislado es biológicamente activo. Por ejemplo, la capacidad para inhibir la interacción de fosfoproteína P / nucleoproteína N⁰ se puede determinar, por ejemplo, evaluando la formación del complejo del fragmento N⁰-P que conduce a la solubilización de N a través de la inhibición de la oligomerización como se muestra por los cambios en la localización celular y la ausencia de la aparición de puntos de N como se evidencia por los estudios de inmunofluorescencia (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2 y la Fig. 1d). La capacidad de asociarse con nucleoproteína N⁰ se puede determinar analizando la co-localización con la nucleoproteína N⁰ en estudios de inmunofluorescencia, y/o evaluando la unión de la nucleoproteína N⁰ en el extracto celular, por ejemplo usando el protocolo de co-sedimentación descrito en Rodrigues-Ferreira et al. (2009, PLoS One. 4(10):e7239 2009).

- 20 La capacidad para inhibir la replicación viral se puede determinar, por ejemplo, midiendo los títulos de crecimiento viral para virus cultivados en presencia de inhibidores, y/o evaluando la abolición de la formación de sincitios mediante experimentos (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo + Figuras 3b,c). La formación de sincitios, que es un sello distintivo de la infección por paramixovirus, se puede determinar usando el ensayo cuantitativo de sincitio basado en luciferasa descrito en Barbeau B et al. (J Virol. 1998 Sep;72(9):7125-36.).

- 25 Como se usa aquí, un fragmento "biológicamente activo" se refiere a un fragmento que exhibe al menos una, preferiblemente todas, las actividades biológicas de un péptido de SEQ ID NO: 1, siempre que el fragmento biológicamente activo retenga la capacidad para inhibir la replicación viral. El fragmento biológicamente activo se puede caracterizar, por ejemplo, por cuanto es capaz de inhibir la interacción de fosfoproteína P / nucleoproteína N⁰ cuando se evalúa mediante experimentos de co-localización (véanse Ejemplo 2 y Fig. 1d), y/o de inhibir la replicación viral cuando se evalúa a través de la medida de títulos de replicación viral y/o experimentos de formación de sincitios y/o cuantificación mediante qPCR del ARN o ARNm genómico viral (véanse Ejemplo y Figuras 3b,c).

- 30 En una realización particular, la invención proporciona un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en:

i) la secuencia de aminoácidos que consiste en MDKLELVNDGLNIIDFIQKNQKEIQKTYGRSSIQQPSIKD (SEQ ID NO: 1);

ii) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de leucina en la posición 6 hasta el resto de ácido aspártico en la posición 40 en SEQ ID NO: 1 P6-40 de SEQ ID N01;

- 35 iii) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de leucina en la posición 11 hasta el resto de ácido aspártico en la posición 40 en SEQ ID NO: 1 P11-40 de SEQ ID N01;

iv) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de metionina en la posición 1 hasta el resto de asparagina en la posición 20 en SEQ ID NO: 1 P1-20 de SEQ ID N01;

- 40 v) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de asparagina en la posición 20 hasta el resto de glutamina en la posición 35 en SEQ ID NO: 1 P20-35 de SEQ ID N01;

vi) la secuencia de aminoácidos que consiste en MAEEQAYHVSKGLECLKALRENPPDIEEIQEVSSLRDQTC (SEQ ID NO: 2);

vii) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de metionina en la posición 1 hasta el resto de asparagina en la posición 22 en SEQ ID NO: 2 P1-22 de SEQ ID N02;

- 45 viii) la secuencia de aminoácidos que consiste en DQAEENVQEGLECIQAIQKN (SEQ ID NO: 3)

ix) la secuencia de aminoácidos que consiste en MAEEQARHVKNKNGLECIKALKAEPISLAIEEAMAAWSEIS (SEQ ID NO: 4) P40 MeV

x) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de valina en la posición 9 hasta el resto de leucina en la posición 19 en SEQ ID NO: 4 P9-19 de SEQ ID N04.

- 50 xi) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la secuencia de (i) a (x), preferiblemente una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la secuencia de (i) a (x).

Un péptido “sustancialmente homólogo” a un péptido de referencia puede derivar de la secuencia de referencia mediante una o más sustituciones conservativas. Preferiblemente, estos péptidos homólogos no incluyen dos restos de cisteína, de modo que se evita la ciclación. Dos secuencias de aminoácidos son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando uno o más restos de aminoácidos se reemplazan por un resto biológicamente similar, o cuando más del 80% de los aminoácidos son idénticos, o más de alrededor de 90%, preferiblemente más de alrededor de 95%, son similares (funcionalmente idénticos). Preferiblemente, las secuencias similares, idénticas u homólogas se identifican por alineación usando, por ejemplo, el programa de compilación GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los programas conocidos en la técnica (BLAST, FASTA, etc.). El porcentaje de identidad se puede calcular realizando una alineación global por pares basada en el algoritmo de alineación de Needleman-Wunsch para encontrar la alineación óptima (incluyendo los espacios vacíos) de dos secuencias a lo largo de toda su longitud, por ejemplo usando Needle, y usando la matriz BLOSUM62 con una penalización de apertura de espacio de 10 y penalización de extensión de espacio de 0,5.

La expresión “sustitución conservativa”, como se usa aquí, denota la sustitución de un resto de aminoácido por otro, sin alterar la conformación y función globales del péptido, incluyendo, pero sin limitarse a, la sustitución de un aminoácido por uno que tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, forma, hidrofobia, aromático, y similares). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, arginina, histidina y lisina son aminoácidos básicos hidrófilos, y pueden ser intercambiables. De manera similar, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, se puede sustituir por leucina, metionina o valina. Los aminoácidos hidrófilos neutros, que pueden sustituirse entre sí, incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina.

Por “sustituido” o “modificado”, la presente invención incluye aquellos aminoácidos que han sido alterados o modificados a partir de aminoácidos naturales.

Como tal, debe entenderse que, en el contexto de la presente invención, una sustitución conservativa se reconoce en la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares.

Según la invención, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; o 99% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos. La identidad de secuencia de aminoácidos se determina preferiblemente usando un algoritmo de alineación de secuencia adecuado y los parámetros predeterminados, tal como BLAST P (Karlin y Altschul, 1990).

En algunas realizaciones, el péptido aislado de la invención comprende 100 aminoácidos como máximo (y al menos 9). En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende 100; 99; 98; 97; 96; 95; 94; 93; 92; 91; 90; 89; 88; 87; 86; 85; 84; 83; 82; 81; 80; 79; 78; 77; 76; 75; 74; 73; 72; 71; 70; 69; 68; 67; 66; 65; 64; 63; 62; 61; 60; 59; 58; 57; 56; 55; 54; 53; 52; 51; 50; 49; 48; 47; 46; 45; 44; 43; 42; 41; 40; 39; 38; 37; 36; 35; 34; 33; 32; 31; 30; 29; 28; 27; 26; 25; 24; 23; 22; 21; 20; 19; 18; 17; 16; 15; 14; 13; 12; 11; 10 o 9 aminoácidos. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende menos de 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende menos de 30 aminoácidos. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende menos de 25 aminoácidos. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende menos de 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende menos de 15 aminoácidos.

Péptido quimérico

En algunas realizaciones, el péptido de fosfoproteína P aislado se une con al menos un péptido de penetración celular (CPP), formando un péptido quimérico.

En una realización preferida, el péptido de penetración celular comprende o consiste en:

péptido Tat, péptido de poliarginina, péptido HA2-R9, péptido de penetratina, péptido de transportano, péptido Vectocell®, péptido de maurocalcina, péptido de decalisina, péptido PTD4 derivado de VIH-Tat, péptido de motivo de translocación del virus de la hepatitis B (PTM), péptido mPrP1-28, POD, pVEC, EB1, Rath, CADY, histatina 5, péptido Antp, péptido Cyt86-101, péptido DPT.

Por “péptido Tat” se entiende un péptido que tiene la secuencia RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 5 péptido 2 Tat) o YGRKKRRQRRR, (SEQ ID NO: 6).

Por “péptido de poliarginina”, se entiende un péptido que consta de al menos 9 argininas. Preferiblemente, un péptido de poliarginina es un péptido que tiene la secuencia R₉ (SEQ ID NO: 7) o R₁₁ (SEQ ID NO: 8).

Por “péptido HA2-R₉”, se entiende un péptido que tiene la secuencia GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG-R₉ (SEQ ID NO: 9).

Por “péptido de penetratina”, se entiende un péptido que tiene la secuencia RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 10).

Por "péptido de transportano" se entiende un péptido que tiene la secuencia GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 11).

Por "péptido Vectocell®", se entiende un péptido que se origina a partir de proteínas de unión a heparina humana y/o anticuerpos anti-ADN.

- 5 Por "péptido de maurocalcina", se entiende un péptido que tiene la secuencia GDCLPHLKLCKENKDCCSKKCKRRGTNIEKRCR (SEQ ID NO: 12).

Por "péptido de decalisina", se entiende un péptido que tiene la secuencia KKKKKKKKKK (K₁₀) (SEQ ID NO: 13).

Por "péptido PTD4 derivado de VIH-Tat", se entiende un péptido que tiene la secuencia YARAAARQARA (SEQ ID NO: 14).

- 10 Por "péptido de motivo de translocación del virus de la hepatitis B (PTM)", se entiende un péptido que tiene la secuencia PLSSIFSRIGDP (SEQ ID NO: 15).

Por "péptido mPrP1-28", se entiende un péptido que tiene la secuencia MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP (SEQ ID NO: 16).

Por "péptido POD", se entiende un péptido que tiene la secuencia GGG(ARKKAAKA)₄ (SEQ ID NO: 17).

- 15 Por "péptido pVEC" se entiende un péptido que tiene la secuencia LLILRRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO: 18).

Por "péptido EB1" se entiende un péptido que tiene la secuencia LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWKKK (SEQ ID NO: 19).

Por "péptido Rath" se entiende un péptido que tiene la secuencia TPWWRLWTKWHHKRRDLPRKPE (SEQ ID NO: 20).

Por "péptido CADY" se entiende un péptido que tiene la secuencia GLWRALWRLLRSLWRLLWRA (SEQ ID NO: 21).

- 20 Por "péptido de histatina 5", se entiende un péptido que tiene la secuencia DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY (SEQ ID NO: 22).

Por "péptido Antp", se entiende un péptido que tiene la secuencia RQIKIWFQNRMRMKWKK (SEQ ID NO: 23).

Por "péptido Cyt86-101", se entiende un péptido que tiene la secuencia KKKEERADLIAYLKKA (SEQ ID NO: 24).

Por "péptido DPT", se entiende un péptido que tiene la secuencia VKKKKIKREIKI (SEQ ID NO: 25)

- 25 En otra realización preferida, el péptido de fosfoproteína P está unido a dos, tres o más péptidos penetrantes.

Como péptido aislado, el péptido quimérico según la invención tiene la capacidad de inhibir la interacción de fosfoproteína P / nucleoproteína N^o del virus Paramyxovirinae; y/o de inhibir la replicación viral de Paramyxovirinae.

Ácidos nucleicos

- 30 La invención también se refiere a un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia nucleotídica que codifica un péptido aislado según la invención.

En una realización, el polinucleótido comprende o consiste en una secuencia nucleotídica seleccionada de:

- SEQ ID NO: 26 (5'-ATGGATAAATTGGAAGTACTAGTCAATGATGGCCTCAATATTATTGACTTTATTCAGA AGAACCAAAAAGAAATACAGAAGACATACGGACGATCAAGTATTCAACAACCCA GCATCAAAGAT -3'); P40 Nipah
- 35 - SEQ ID NO: 27 (5'-ATGGCAGAGGAACAGGCCTACCATGTCAGCAAAGGGCTGGAATGCCTCAAAGCC CTCAGAGAGAATCCTCCTGACATTGAGGAGATTCAAGAGGTCAGCAGCCTCAGA GACCAAACCTGC - 3'); P40 CDV
- SEQ ID NO: 28 (5'-ATGGCAGAAGAGCAGGCACGCCATGTCAAAAACGGACTGGAATGCATCCGGGCT CTCAAGGCCGAGCCCATCGGCTCACTGGCCATCGAGGAAGCTATGGCAGCATGGT CAGAAATATCA - 3'); P40 MeV
- 40

que codifica respectivamente el péptido de secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 4.

La invención también se refiere a polinucleótidos con secuencias nucleotídicas complementarias a una de las secuencias descritas anteriormente y a secuencias que se hibridan con dichos polinucleótidos en condiciones rigurosas.

La invención se refiere además a un constructo genético que consiste en o comprende un polinucleótido como se define aquí, y secuencias reguladoras (tales como promotor o promotores, potenciador o potenciadores, terminador o terminadores, etc.) que permiten la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de un péptido según la invención en una célula hospedante.

Los constructos genéticos de la invención pueden ser ADN o ARN, y son preferiblemente ADN bicatenario. Los constructos genéticos de la invención también pueden estar en una forma adecuada para la transformación de la célula hospedante u organismo hospedante previsto, en una forma adecuada para la integración en el ADN genómico de la célula hospedante deseada, o en una forma adecuada para la replicación independiente, mantenimiento y/o herencia en el organismo hospedante previsto. Por ejemplo, los constructos genéticos de la invención pueden estar en forma de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral, o un transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que puede proporcionar expresión in vitro y/o in vivo (por ejemplo, en una célula hospedante, organismo hospedante y/o sistema de expresión adecuados).

En un aspecto preferido pero no limitante, un constructo genético de la invención comprende i) al menos un ácido nucleico de la invención; operativamente conectado a ii) uno o más elementos reguladores, tales como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado; y opcionalmente también iii) uno o más elementos adicionales de constructos genéticos conocidos per se; en el que las expresiones “elemento regulador”, “promotor”, “terminador” y “operativamente conectado” tienen su significado habitual en la técnica (como se describe adicionalmente aquí); y en el que dichos “elementos adicionales” presentes en los constructos genéticos pueden ser, por ejemplo, secuencias 3'-o 5'-UTR, secuencias líder, marcadores de selección, marcadores de expresión / genes informadores, y/o elementos que pueden facilitar o aumentar (la eficiencia de) la transformación o integración. Estos y otros elementos adecuados para tales constructos genéticos quedarán claros para el experto, y pueden depender, por ejemplo, del tipo de constructo usado, la célula hospedante o el organismo hospedante pretendido; la manera en que se expresarán las secuencias nucleotídicas de la invención de interés (por ejemplo, mediante expresión constitutiva, transitoria, o inducible); y/o la técnica de transformación a usar. Por ejemplo, se pueden usar de manera esencialmente análoga, secuencias reguladoras, promotores y terminadores conocidos per se para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de dominio (único) y fragmentos ScFv).

Preferiblemente, en los constructos genéticos de la invención, dicho al menos un ácido nucleico de la invención y dichos elementos reguladores, y opcionalmente dicho uno o más elementos adicionales, están “operativamente enlazados” entre sí, por lo que generalmente se quiere decir que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor se considera “operativamente enlazado” a una secuencia codificante si dicho promotor es capaz de iniciar o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o la expresión de una secuencia codificante (en el que dicha secuencia codificante debe entenderse como “bajo el control de” dicho promotor). Generalmente, cuando dos secuencias nucleotídicas están operativamente enlazadas, estarán en la misma orientación, y normalmente también en el mismo marco de lectura. Por lo general, también serán esencialmente contiguas, aunque esto también puede no ser necesario.

Preferiblemente, los elementos reguladores y adicionales de los constructos genéticos de la invención son tales que son capaces de proporcionar su función biológica pretendida en la célula hospedante u organismo hospedante previsto.

Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debería ser “operable” en la célula hospedante u organismo hospedante previsto, lo que significa que (por ejemplo) dicho promotor debería ser capaz de iniciar o de otro modo controlar/regular la transcripción y/o la expresión de una secuencia nucleotídica como se define aquí, por ejemplo una secuencia codificante, a la que está operativamente enlazada.

Algunos promotores particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, promotores conocidos per se para la expresión en las células hospedantes mencionadas aquí; y en particular, promotores para la expresión en las células bacterianas.

Un marcador de selección debe ser tal que permita, es decir, en condiciones de selección adecuadas, que las células hospedantes y/o los organismos hospedantes que se hayan transformado (con éxito) con la secuencia nucleotídica de la invención se distingan de las células/organismos que no han sido transformados (con éxito). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de tales marcadores son genes que proporcionan resistencia contra antibióticos (tales como kanamicina o ampicilina), genes que proporcionan resistencia a la temperatura, o genes que permiten que la célula hospedante o el organismo hospedante se mantengan en ausencia de ciertos factores, compuestos y/o componentes (alimenticios) en el medio que son esenciales para la supervivencia de las células u organismos no transformados.

Una secuencia líder debe ser tal que, en la célula hospedante u organismo hospedante pretendido, permita las modificaciones postraduccionales deseadas, y/o tal que dirija el ARNm transcrito a una parte u orgánulo deseado de una célula. Una secuencia líder también puede permitir la secreción del producto de expresión de dicha célula. Como tal, la secuencia líder puede ser cualquier prosequencia, presequencia, o secuencia prepro, operable en la célula u organismo hospedante.

Un marcador de expresión o un gen informador debe ser tal que, en la célula u organismo hospedante, permita la detección de la expresión de una secuencia génica o nucleotídica presente en el constructo genético. Un marcador de expresión también puede permitir opcionalmente la localización del producto expresado, por ejemplo en una parte u orgánulo específico de una célula y/o en una célula o células, tejido o tejidos, órgano u órganos, o parte o partes específicos de un organismo multicelular. Dichos genes informadores también pueden expresarse como una fusión proteica con la secuencia de aminoácidos de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, incluyen proteínas fluorescentes tales como GFP.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de promotores, terminadores y elementos adicionales adecuados incluyen aquellos que se pueden usar para la expresión en las células huésped mencionadas aquí; y en particular, los que son adecuados para la expresión en células bacterianas, tales como los mencionados aquí. Para algunos (más) ejemplos no limitantes de los promotores, marcadores de selección, secuencias líder, marcadores de expresión y otros elementos que pueden estar presentes/pueden usarse en los constructos genéticos de la invención, tales como terminadores, potenciadores transcripcionales y/o traduccionales, y/o factores de integración, se hace referencia a los manuales generales tales como Sambrook et al. Otros ejemplos quedarán claros para la persona experta.

Los constructos genéticos de la invención se pueden proporcionar generalmente uniando adecuadamente la o las secuencias nucleotídicas de la invención a uno o más elementos adicionales descritos anteriormente, por ejemplo usando las técnicas descritas en los manuales generales tales como Sambrook et al.

A menudo, los constructos genéticos de la invención se obtendrán insertando una secuencia nucleotídica de la invención en un vector (de expresión) adecuado conocido per se.

Los ácidos nucleicos de la invención y/o los constructos genéticos de la invención se pueden usar para transformar una célula hospedante o un organismo hospedante, es decir, para la expresión y/o producción de los péptidos de la invención.

De este modo, en otro aspecto, la invención se refiere a un hospedante o célula hospedante que expresa (o que en circunstancias adecuadas es capaz de expresar) un péptido de la invención; y/o que contiene un polinucleótido de la invención o un constructo genético de la invención. Los huéspedes o células hospedantes adecuados serán claros para la persona experta, y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada, o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado, por ejemplo: una cepa bacteriana, que incluye, pero no se limita a, cepas gramnegativas, tales como cepas de *Escherichia coli*; de *Proteus*, por ejemplo de *Proteus mirabilis*; de *Pseudomonas*, por ejemplo de *Pseudomonas fluorescens*; y cepas grampositivas, tales como cepas de *Bacillus*, por ejemplo de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus brevis*; de *Streptomyces*, por ejemplo de *Streptomyces lividans*; de *Staphylococcus*, por ejemplo de *Staphylococcus carnosus*; y de *Lactococcus*, por ejemplo de *Lactococcus lactis*; una célula fúngica, que incluye, pero no se limita a, células de especies de *Trichoderma*, por ejemplo de *Trichoderma reesei*; de *Neurospora*, por ejemplo de *Neurospora crassa*; de *Sordaria*, por ejemplo de *Sordaria macrospore*; de *Aspergillus*, por ejemplo de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus sojae*; o de otros hongos filamentosos; una célula de levadura, que incluye, pero no se limita a, células de especies de *Saccharomyces*, por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*; de *Schizosaccharomyces*, por ejemplo de *Schizosaccharomyces pombe*; de *Pichia*, por ejemplo de *Pichia pastoris* o de *Pichia methanolica*; de *Hansenula*, por ejemplo de *Hansenula polymorpha*; de *Kluyveromyces*, por ejemplo de *Kluyveromyces lactis*; de *Arxula*, por ejemplo de *Arxula adenivorans*; de *Yarrowia*, por ejemplo de *Yarrowia lipolytica*; una célula o línea celular anfibia, tal como los ovocitos de *Xenopus*; una célula o línea celular derivada de insecto, tal como células/líneas celulares derivadas de lepidópteros, que incluyen, pero no se limitan a, células de *Spodoptera SF9* y *Sf21*, o células/líneas celulares derivadas de *Drosophila*, tales como células Schneider y Kc; una planta o célula vegetal, por ejemplo en plantas de tabaco; y/o una célula o línea celular de mamífero, por ejemplo una célula o línea celular derivada de un ser humano, una célula o una línea celular de mamíferos, incluyendo, pero no se limita a, células CHO, células BHK (por ejemplo, células BHK-21), y células o líneas celulares humanas tales como células HeLa, COS (por ejemplo COS-7) y células PER.C6.

Método de preparación de péptidos

La invención se refiere además a métodos para preparar o generar los péptidos de la invención.

Los péptidos de la invención pueden producirse mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, incluyendo tecnologías de síntesis química y tecnologías recombinantes.

Ejemplos de tecnologías de síntesis química son la síntesis en fase sólida y la síntesis en fase líquida. Como síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al extremo C-terminal del péptido a sintetizar se une a un soporte insoluble en disolventes orgánicos, y por repetición alterna de reacciones, aquel en el que los aminoácidos con sus grupos aminos y los grupos funcionales de la cadena lateral protegidos con grupos protectores apropiados se condensan uno por uno en orden desde el extremo C al extremo N, y aquel en el que se liberan los aminoácidos unidos a la resina o al grupo protector de los grupos amino de los péptidos, la cadena peptídica se extiende así de esta manera. Los métodos de síntesis en fase sólida se clasifican en gran medida por el método de tBoc y el método de Fmoc, según el tipo de grupo protector usado. Los grupos protectores usados típicamente incluyen tBoe (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxicarbonilo), Bzl (bencilo), Fmoc (9-

fluorenilmetoxycarbonilo), Mbh (4,4'-dimetoxidibenzhidrio), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo), Trt (tritrilo), Tos (tosilo), Z (benciloxycarbonilo) y Clz-Bzl (2,6-diclorobencilo) para los grupos amino; NO₂ (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidino; y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo). Después de la síntesis del péptido deseado, se somete a la reacción de desprotección y se corta del soporte sólido. Tal reacción de corte peptídico puede llevarse a cabo con fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico para el método de Boc, y con TFA para el método de Fmoc.

Alternativamente, el péptido se puede sintetizar usando técnicas recombinantes. En este caso, se usa un ácido nucleico y/o un constructo genético según la invención como se describe anteriormente.

El método de producción del péptido puede comprender opcionalmente las etapas de purificar dicho péptido, modificar químicamente dicho péptido, y/o formular dicho péptido en una composición farmacéutica.

Composiciones farmacéuticas

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un péptido de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Más particularmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido aislado de la invención o un péptido quimérico de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El péptido se formula en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersos en la misma es bien conocida en la técnica, y no necesita limitarse en base a la formulación. Normalmente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas; sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución, o suspensiones, en líquido antes del uso. La preparación también se puede emulsionar. En particular, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en forma de dosificación sólida, por ejemplo cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, grageas o gránulos.

La elección del vehículo y el contenido de sustancia activa en el vehículo se determinan generalmente según la solubilidad y las propiedades químicas del compuesto activo, el modo particular de administración, y las disposiciones que deben observarse en la práctica farmacéutica. Por ejemplo, para preparar comprimidos, pueden usarse excipientes tales como lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dicálcico, y agentes disgregantes tales como almidón, ácidos alginicos y ciertos silicatos complejos combinados con lubricantes tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco. Para preparar una cápsula, es ventajoso usar lactosa y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se usan suspensiones acuosas, pueden contener agentes emulsionantes o agentes que facilitan la suspensión. También se pueden usar diluyentes tales como sacarosa, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol y cloroformo, o mezclas de los mismos.

La dosificación la selecciona la persona experta, de modo que se logre un efecto antiinfeccioso, y depende de la vía de administración y la forma de dosificación que se use. La dosis diaria total de un péptido, administrada a un sujeto en dosis únicas o divididas, puede estar en cantidades, por ejemplo, de alrededor de 0,001 a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal al día, y preferiblemente 0,01 a 10 mg/kg/día. Las composiciones de unidades de dosificación pueden contener tales cantidades de submúltiplos de las mismas que se pueden usar para completar la dosis diaria. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, que incluyen el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo y la vía de administración, las tasas de absorción y excreción, combinación con otros medicamentos, y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando.

Aplicaciones terapéuticas

El péptido aislado y el péptido quimérico como se definieron anteriormente, la composición farmacéutica de la invención se puede usar para tratar la infección por Paramyxovirinae.

De este modo, la invención también se refiere a un péptido o un péptido quimérico de la invención para uso en el tratamiento de infección por Paramyxovirinae.

En particular, el péptido aislado o un péptido quimérico de la invención pueden tener la capacidad de disminuir la carga de virus en un sujeto de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.

La invención también proporciona un método de tratamiento de una infección por Paramyxovirinae en un paciente que lo necesita, método el cual comprende administrar a dicho paciente un péptido aislado o un péptido quimérico de la invención.

La infección por Paramyxovirinae se debe a un virus que pertenece al género seleccionado entre infección por rubulavirus, infección por avulavirus, infección por henipavirus, infección por virus similar a henipavirus, infección por morbilivirus, infección por virus similar a morbilivirus (virus similares a TPMV), o infección por ferlavivirus.

La infección por Henipavirus es en particular, pero no se limita a, una infección por el virus Nipah (NiV) o por el virus Hendra (HeV).

La infección por Morbillivirus es en particular, pero no se limita a, una infección por el virus del sarampión (MeV) o el virus de la peste bovina.

- 5 La infección por rubulavirus es en particular, pero no se limita a, una infección por el virus de las paperas y los virus de la parainfluenza tipo 2, 4.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

FIGURAS:

- 10 Figura 1: Estructura del complejo N⁰-P reconstituido de NiV en disolución y en cristal. (a) Arquitectura esquemática de las proteínas N y P de NiV. N_{NTD}, dominio N-terminal del núcleo de N; N_{CTD}, dominio C-terminal del núcleo de N; N_{TARM}, brazo N-terminal de N; C_{TARM}, brazo C-terminal de N; P_{NTR}, región N-terminal de P; P_{CTR}, región C-terminal de P; P_{MD}, dominio de multimerización de P; P_{XD}, dominio X C-terminal de P. Las cajas y líneas muestran dominios estructurados y regiones intrínsecamente desordenadas, respectivamente. Las flechas muestran los constructos recombinantes usados en este trabajo. (b) Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con detección en línea por dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS) y refractometría (RI). El recuadro muestra una SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie. La masa molecular teórica calculada para un complejo heterodimérico es de 45.613 Da. (c) Perfil de intensidad de diferencia de espectros de HSQC ¹H-¹⁵N de P₁₀₀ marcada con ¹⁵N, en aislamiento y en complejo con N⁰. (d) Imágenes de fluorescencia de células transfectadas 293T que expresan N de NiV, péptido de tipo salvaje P40 en fusión con GFP, o ambas proteínas (paneles inferiores). Las imágenes son representativas de uno de los tres experimentos independientes. Las barras de escala (paneles de la izquierda) representan 10 μm. (e) Vista de la estructura cristalina del complejo de NiV N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ con representación de boceto. N₃₂₋₃₈₃ se muestra junto con P₅₀. Se indica la ubicación de algunos elementos de la estructura secundaria y del brazo del terminal N y del brazo y la cola del terminal C. Se indican los restos C- y N-terminales del fragmento P.

- Figura 2: La comparación de las proteínas N de NiV y RSV revela un cambio conformacional de abierto a cerrado. (a) Vista de las estructuras de NiV N y RSV N (código PDB 2WJ8; ref 5) alineadas en orientaciones similares. (b) Comparaciones estructurales de NiV N₃₂₋₃₈₃ en su estructura cristalina (panel izquierdo) y en una conformación cerrada hipotética (panel derecho) con RSV N tomado del complejo tipo NC (código PDB 2WJ8; ref 5). Se muestran NiV N₃₂₋₃₈₃, RSV N, y el ARN unido a RSV N. Las líneas en el panel izquierdo muestran la dirección del eje α_{N9} en cada proteína. La forma cerrada hipotética de NiV N se obtuvo alineando independientemente NiV N_{NTD} y N_{CTD} en los dominios correspondientes de RSV N. (c) Vista frontal del sitio de unión del ARN en RSV N con una representación de boceto. Los restos que interactúan con el ARN y se conservan en varios miembros de *Paramyxovirinae* (K170, R184, R185, R338 e Y337) se muestran en representación de palitos. (d) Vista frontal del surco de unión del ARN putativo de NiV N en sus conformaciones abierta e cerrada hipotética. Los restos correspondientes a los mostrados en la Figura 2c se muestran con representación de palito (K178, R192, R193, R352 e Y354). (e) Vista lateral del sitio de unión del ARN en RSV N con una representación de boceto. Se muestran en amarillo dos restos de glicina (G241 y G245) que forman una superficie plana en la hélice α_{N9} y que interactúan con la base 1 de los seis nucleótidos unidos a cada protómero de N. (f) Alineación de secuencia múltiple entre varios miembros de la subfamilia *Paramyxovirinae*: MeV, virus del sarampión (Morbillivirus); MuV, virus de las paperas (Rubulavirus); NDV, virus de la enfermedad de Newcastle (Avulavirus). (g) Vista lateral del surco de unión del ARN putativo de NiV N en sus conformaciones abierta y cerrada hipotética. La molécula de ARN (mostrada) está acoplada contra NiV N_{CTD} como en RSV NC.

- Figura 3: Conservación del interfaz N⁰-P e inhibición de la replicación de NiV por un péptido P de unión a N⁰. (a) Vista del complejo de NiV N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ con representaciones de superficie y de conservación para N₃₂₋₃₈₃, y con representaciones de boceto y palitos para P₅₀. La conservación en N derivada de la alineación de múltiples secuencias se muestra en la superficie de NiV N. Las cadenas laterales de restos conservados en la región N-terminal de P se muestran en representación de palitos. (b) Cuantificación del efecto de la expresión de péptidos sobre la replicación viral. Título viral medido 48 h después de la infección con NiV (MOI 0,01) en el sobrenadante de cultivo de células 293T transfectadas con cantidades variables (2 μg a 0,125 μg; barras 1 a 5) de plásmidos que codifican GFP sola (Control), P_{40-wt}, P_{40-G10R} o P_{40-117R}. Se muestran las medias de tres experimentos independientes. Las barras de error representan s.d. (n = 6; ensayo de ANOVA: * indica valores para los cuales P < 0,05). Ø indica ausencia de plásmido. (c) Análisis visual de la formación de sincitios en células infectadas con NiV que expresan GFP (Control) o GFP-P_{40-wt} o -P_{40-G10R}. Las flechas muestran ejemplos de formación típica de sincitios. Las imágenes son representativas de las obtenidas en uno de tres experimentos independientes. Las barras de escala (paneles de la izquierda) representan 50 μm.

Figura 4: Actividades de chaperonas de NiV P. (a) Vista superior de un protómero de N de RSV dentro del complejo de N-ARN, mostrado con representación de superficie para N_{CORE} alineado con N_{CTD} del complejo de NiV N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ (códigos PDB 2WJ8 y 4BKK; ref 5). El N_{TARM} del protómero N_{i-1} de N de RSV y el C_{TARM} del protómero N_{i+1} de

N de RSV se muestran con una representación de boceto. Solamente P₅₀ del complejo de NiV se muestra con representación de boceto. El recuadro muestra la localización del protómero de RSV N dentro de la NC. (b) Vista frontal de la misma superposición estructural. El recuadro muestra la localización del protómero de RSV N dentro de la NC. (c) Vista de NiV P₅₀ unido a N_{CTD} en el complejo N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ con representación de boceto. Se muestra el pasador en N_{CTD}. La C_α de restos que hacen contacto entre P₅₀ y N_{CTD} se muestran para P₅₀ o N₃₂₋₃₈₃⁰ como esferas. Las flechas indican las conexiones entre P₅₀ y las hélices α_{C1} , η_{C1} , α_{C2} y α_{C4} de N_{CTD}. (d) Alineación de múltiples secuencias entre varios miembros de la subfamilia *Paramyxovirinae*. (e) Superposición estructural del complejo de RSV N-ARN y NiV N₃₂₋₃₈₃ con representación de boceto. Los restos Y258 y G305 de NiV N y los restos Y251 y G295 de RSV N se muestran con representación de palitos. La flecha indica la rotación hipotética de Y258 tras la liberación de P.

Figura 5: Inhibición de la replicación de NiV o CDV por un péptido de unión a N⁰ de P. A. Péptidos derivados del región de unión a N⁰ de P (P₄₀) de NiV inhiben el crecimiento viral tanto de NiV como de CDV. Se transfectaron células 293T con 1 µg de plásmido que codifica w.t. P₄₀-CDV en fusión con GFP (P₄₀-CDV), w.t. P₄₀-NiV ya sea en fusión con GFP (P₄₀-NiV) o por separado (pCG P₄₀-NiV), GFP sola (MOCK) o sin plásmido (NT). 24 horas más tarde, las células se infectaron con NiV (barras negras) o CDV (barras blancas) (MOI 0,01). Los títulos de virus en los sobrenadantes de cultivo se midieron 48 h después de la infección. B. La inhibición de la replicación de CDV por péptidos derivados tanto de NiV como de CDV depende de la dosis. Las células se transfectaron como anteriormente con cantidades decrecientes de plásmidos "P" en el intervalo de 1 µg a 0,5 µg como se indica, o 1 µg de plásmido que codifica GFP (MOCK) o plásmido vacío (NT). 24 h después de la transfección, las células se infectaron con CDV (MOI 0,01). Se midieron los títulos de virus en los sobrenadantes de cultivo 72 h después de la infección.

EJEMPLOS:

EJEMPLO 1:

Material y métodos

Reconstitución del complejo nuclear de N⁰-P. Constructos que comprenden los restos 1-50 (P₅₀) de P y restos 32-383 (N₃₂₋₃₈₃) o 32-402 de N (N₃₂₋₄₀₂) del aislado malasio UMMC1 del virus Nipah (números Uniprot Q91K91 y Q91K92) se clonaron en el vector pETM40 en fusión con una etiqueta de proteína de unión a maltosa (MBP) N-terminal. Todas las proteínas se expresaron en células Rosetta BL21 (DE3) de *E. coli*. Las células se hicieron crecer a 37°C en medio LB hasta que la D.O. alcanzó 0,6, y la expresión proteica se indujo toda la noche a 20°C mediante adición de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM. Las células se cosecharon, y el pelete se suspendió en amortiguador A para el constructo P (amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 7,5 que contiene NaCl 150 mM, arginina 50 mM, glutamato 50 mM y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 0,5 mM) y en amortiguador B para constructos de N (amortiguador Tris-HCl a pH 7,5 que contiene NaCl 150 mM). Todos los amortiguadores se suplementaron con cóctel completo de inhibidores de proteasa (Roche). Las células se rompieron mediante ultrasonidos, y el extracto crudo se aclaró por centrifugación a 45.000 g a 4°C durante 20 min. El sobrenadante se cargó en una columna de resina de amilosa (New England Biolabs) equilibrada en amortiguador A o B. La columna se lavó con 10 volúmenes de amortiguador A o B que contenían NaCl 500 mM, y la proteína se eluyó con maltosa 50 mM (Sigma) en amortiguador A o B.

La proteína de fusión P-MBP se escindió con proteasa TEV para eliminar la etiqueta de MBP. La proteasa se añadió en una relación en peso aproximada de 100:1 (proteína de fusión: TEV), y la digestión se realizó en amortiguador A toda la noche a 4°C. Después de concentrar usando concentradores Vivaspín (GE Healthcare) con un corte de 3 kDa, la disolución de proteína se cargó en una columna S75 Superdex (GE Healthcare) equilibrada en amortiguador A a 4°C. El péptido P purificado se mezcló con N-MBP purificada, y la mezcla se incubó toda la noche a 4°C. Después de concentrar, la disolución se cargó en una columna S75 Superdex equilibrada en amortiguador A. Se reunieron las fracciones que contienen el complejo N⁰-MBP-P, y la etiqueta de MBP se escindió mediante incubación toda la noche a 4°C en presencia de proteasa TEV en una relación en peso de 100:1. La disolución se concentró y se cargó en una columna S75 Superdex (GE Healthcare) acoplada a una columna corta de resina de amilosa (NEB) equilibrada en amortiguador B, para eliminar completamente la MBP escindida. Las fracciones que contienen los complejos N⁰-P se reunieron, y se concentraron usando concentradores Amicon (Millipore) con un corte de 10 kDa. Durante el procedimiento de purificación, se comprobó la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE.

Un constructo que comprende los restos 1-100 (P₁₀₀) de P se clonó en el vector pET28 con una etiqueta His C-terminal, y se expresó en células Rosetta BL21 (DE3) de *E. coli*. Para producir P₁₀₀ sin marcar, las células se hicieron crecer a 37°C en medio LB hasta que la D.O. alcanzó 0,6, y la expresión de la proteína se indujo toda la noche a 20°C mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM. Para el P₁₀₀ marcado con ¹³C-¹⁵N, las células se hicieron crecer en medio mínimo M9 suplementado con vitaminas MEM (Gibco), con 1,0 g.l⁻¹ de ¹⁵NH₄Cl y 4,0 g.l⁻¹ de ¹³C glucosa como se describió previamente²⁴. Las células se cosecharon, y el pelete se suspendió en amortiguador A suplementado con cóctel completo de inhibidores de proteasa (Roche). Las células se rompieron mediante sonicación, y el extracto bruto se aclaró por centrifugación a 45.000 g a 4°C durante 20 min. El sobrenadante se cargó en una columna de resina His Select (Sigma) preequilibrada en amortiguador A. La columna se lavó con 10 volúmenes de amortiguador A que contenía NaCl 500 mM e imidazol (Sigma) 10 mM, y la proteína se eluyó en

amortiguador A que contenía imidazol 300 mM. Las fracciones que contenían el péptido se reunieron, y se concentraron usando concentradores Vivaspin (GE Healthcare) con un corte de 5 kDa. La disolución se cargó en una columna S200 Superdex equilibrada en amortiguador A a 4°C. Las fracciones que contenían el péptido se reunieron y se concentraron. Para los experimentos de RMN, el complejo N₃₂₋₄₀₂⁰-P₁₀₀ se reconstituyó como se describió anteriormente, y el amortiguador A se intercambiaba con amortiguador Bis-Tris 20 mM a pH 6,0 que contenía NaCl 150 mM, arginina 50 mM, glutamato 50 mM y TCEP 0,5 mM.

Para producir una selenometionina sustituida de N₃₂₋₃₈₃, las células se hicieron crecer a 37°C en medio mínimo M9 suplementado con vitaminas MEM (Gibco), con 1,0 g.l⁻¹ de NH₄Cl y 2,0 g.l⁻¹ de glucosa hasta que la D.O. alcanzó 0,6. Después, la temperatura se redujo hasta 20°C, y el cultivo se suplementó con una mezcla de aminoácidos que contenía 100 mg de Lys, 100 mg de Phe, 100 mg de Thr, 50 mg de Ile, 50 mg de Leu, 50 mg de Val y 50 mg de SelenoMet por litro de medio, y se incubó durante 45 minutos. La expresión de la proteína se indujo toda la noche a 20°C mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM. El derivado de selenometionina se purificó como se describió anteriormente.

Experimentos de SEC-MALLS. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con la detección en línea por dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS) y refractometría (RI) es un método para medir la masa molecular absoluta de una partícula en disolución que es independiente de sus dimensiones y forma²⁵. La SEC se realizó con una columna S200 Superdex (GE Healthcare) equilibrada con amortiguador Tris-HCl 20 mM que contenía NaCl 150 mM. La columna se calibró con proteínas estándar globulares. Las separaciones se realizaron a 20°C con un caudal de 0,5 ml.min⁻¹. La detección de dispersión de luz láser multiangular en línea (MALLS) se realizó con un detector DAWN-HELEOS II (Wyatt Technology Corp.) usando un láser que emite a 690 nm, y la concentración de proteína se midió en línea mediante el uso de medidas de índice de refracción diferencial usando un detector Optilab T-rEX (Wyatt Technology Corp.) y un incremento del índice de refracción, dn/dc , de 0,185 ml.g⁻¹. Las masas molares medias ponderales (Mw) se calcularon usando el software ASTRA (Wyatt Technology Corp.). Para la determinación del tamaño, la columna se calibró con proteínas de radio de Stokes conocido (R_s)²⁶.

Experimentos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño. Los datos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) se recopilaron en la línea de luz BioSAXS (BM29) del ESRF (http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/MX/About_our_beamlines/BM29). La dispersión del amortiguador solo se midió antes y después de cada medida de la muestra, y se utilizó para restar el fondo usando el programa PRIMUS del paquete ATSAS²⁷. Los datos de dispersión se recopilaron a diferentes concentraciones que oscilan desde 0,3 mg.ml⁻¹ hasta 0,6 mg.ml⁻¹ para P₁₀₀, y de 0,55 mg.ml⁻¹ hasta 2,4 mg.ml⁻¹ para el complejo N⁰-P. No se observó ningún efecto entre partículas dependiente de la concentración. R_g se estimó a valores de Q bajos usando la aproximación de Guinier. Los modelos de perlas de baja resolución *ab initio* del complejo N⁰-P se calcularon a partir de la función de distribución de distancia P(r) ($D_{max} = 10$ nm) usando el programa DAMMIN²⁸. 20 modelos de baja resolución, obtenidos de reconstrucciones independientes, se alinearon, se promediaron, y se filtraron con el programa DAMAVER²⁹. La estructura cristalina se acopló dentro del sobre usando el programa SUPCOMB²⁹.

Espectroscopia de RMN. La asignación espectral de P₁₀₀ de proteína P de NiV se obtuvo a 25°C en amortiguador Bis-Tris 20 mM a pH 6,0 que contenía NaCl 150 mM, arginina 50 mM, glutamato 50 mM y TCEP 0,5 mM usando un conjunto de experimentos de triple resonancia tipo BEST³⁰. Los experimentos de RMN se adquirieron a una frecuencia de ¹H de 800 MHz. Se adquirieron un total de seis experimentos: HNCO, HN(CA)CO intrarresto, HN(CO)CA y HNCA intrarresto, HN(COCA)CB y HN(CA)CB intrarresto. Todos los espectros se procesaron en NMRPipe³¹, se analizaron en Sparky³², y la asignación automática de los sistemas de espín se realizó usando MARS³³ seguido de verificación manual. El espectro de HSQC de ¹H-¹⁵N de P₁₀₀ se comparó con el espectro del complejo purificado de N₃₂₋₃₈₃⁰P₁₀₀. La relación de intensidades de las resonancias en los dos espectros se utilizó para cartografiar el sitio de unión de N⁰ en P₁₀₀. Los desplazamientos químicos dependen de los ángulos diédricos ϕ y ψ de la cadena principal, y en sistemas desordenados, son muy sensibles a la presencia de estructura secundaria transitoria, comúnmente expresada en términos de propensión a estructura secundaria (SSP)^{34,35}. La puntuación de SSP para P₁₀₀ aislado reveló la presencia de varias hélices α fluctuantes.

Cristalografía. Se usaron diferentes constructos de N y P para reconstituir los análogos N⁰-P, pero solo cristalizó el complejo N₃₂₋₃₈₃⁰P₅₀. Las condiciones iniciales de cristalización para el complejo N₃₂₋₃₈₃⁰P₅₀ se identificaron en el High Throughput Crystallization Laboratory de la EMBL Grenoble Outstation (<https://htxlab.embl.fr>). Los agrupamientos de placas obtenidos en PEG 3350 al 22%, KBr 0,2 M se usaron para hacer crecer el cristal del derivado de selenometionina del complejo N₃₂₋₃₈₃⁰P₅₀ mediante el método de microsiembra. Un agrupamiento de placa de proteína nativa se trituró en 50 μ l de disolución de estabilización (Tris HCl 20 mM a pH 8 que contiene 22% de PEG 3350, KBr 0,2 M y NaCl 0,2 M), usando el kit Seed Bead (Hampton Research). El lote de siembra se diluyó en serie (5, 25, 100, 1000 veces), y las gotas se obtuvieron mezclando 0,5 μ l del lote de siembra resultante, 1 μ l de disolución de proteína y 1 μ l de disolución de precipitante. Los cristales usados para la recogida de datos se obtuvieron con concentraciones proteicas de 10 a 20 mg.ml⁻¹ en presencia de PEG 3350 al 16-18% y KBr 0,2 M, y se congelaron con glicerol al 15% como crioprotector. Los datos de difracción de rayos X se recogieron en la línea de haz ID29 del ESRF a una longitud de onda de 0,9793 Å y a una temperatura de 100 K, y se procesaron con el paquete XDS³⁶. Las fases iniciales se obtuvieron usando la dispersión anómala para átomos de selenio mediante el método SAD con el programa HKL2MAP³⁷. Se construyó inicialmente un modelo con el programa Autobuild³⁸ a partir del paquete de phenix³⁹ y

posteriormente refinado con el programa phenix³⁹, y subsiguiente se refinó con el programa phenix.refine⁴⁰ y Coot⁴¹. La geometría del modelo final se verificó con MolProbity⁴². En el modelo, 97,0% de restos tienen ángulos diédricos de cadena principal en la región favorecida en la gráfica de Ramachandran, 2,77% caen en las regiones permitidas, y 0,23% son valores atípicos. Parte del bucle $\alpha_{N5}-\alpha_{N6}$ no es visible en la densidad electrónica del cristal. Las figuras se han generado con PyMol⁴³ y Chimera⁴⁴. Los modos normales de baja frecuencia de N⁰ se calcularon con el Elastic Network Model⁴⁵. Las alineaciones de múltiples secuencias se realizaron con MAFFT⁴⁶.

Construcción de plásmido. Las secuencias que corresponden a los restos de NiV P, CDV P o MeV P se clonaron en el marco con GFP en el vector pEGFP-C2 (CLONTECH Laboratories) para producir el constructo pEGFP-P40 y derivados (P6-40, P11-40; P1-20; P12-35 y P7-17 de NiV P, y P1-22, P9-19 de CDV P, y P9-19 de MeV P). Las variantes de NiV P, P40-G10R y P40-I17R, se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida al sitio usando el kit QuickChange XL (Stratagene). El péptido de consenso se produjo mediante clonación por PCR en el mismo vector pEGFP-C2.

Localización intracelular de N y P₄₀. Células HEK 293T se obtuvieron de ATCC (HEK 293T/17 - ATCC CRL-11268). Las líneas celulares se estudiaron de forma habitual para determinar la contaminación por micoplasma. Células 293T se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, PAA laboratories) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS) (PerbioHyclone). Para la transfección, las células se hicieron crecer durante 24 h hasta una confluencia de ~50%, y se transfectaron con 0,5 μ g de plásmido que codifica N, GFP-P_{40-wt}, o ambos (o plásmido vacío como control), usando el reactivo de transfección Turbofect (Thermoscientific) a relaciones 4:1 de reactivo:ADN según lo recomendado. Después de 48 horas, las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 3,7% en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) durante 45 min, después se trataron durante 30 min con 50 mmol.l⁻¹ de NH₄Cl, y finalmente, durante otros 40 min en Triton X100 al 0,1% en PBS. La inmunofluorescencia de N se realizó con un anticuerpo anti-N de conejo específico de henipavirus de nuestro laboratorio (a una dilución 1/1000, la especificidad del anticuerpo se determinó mediante inmunofluorescencia como se muestra, y mediante transferencia Western y anticuerpo secundario Alexa Fluor 555 (Life Technologies) a una dilución 1/1000. Para la tinción nuclear, se usó 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluido en PBS que contiene seroalbúmina bovina (BSA) al 1%. Tras varias etapas de lavado, se hicieron fotos usando un microscopio fluorescente Zeiss 200M. Las imágenes se analizaron mediante Axiovision Software (Zeiss) e ImageJ software⁴⁷.

Inhibición de la replicación viral. Todos los experimentos con el virus Nipah se realizaron en INSERM "Laboratoire Jean Merieux" (Lyon, Francia) en un laboratorio de contención de nivel 4 de bioseguridad (BSL-4). Las células HEK 293T se hicieron crecer como se describió anteriormente durante 24 h hasta una confluencia de ~40%. Inicialmente, las células se transfectaron con plásmidos que codifican P₄₀ de tipo salvaje en fusión con GFP, variantes de P₄₀ (P_{40-G10R} o P_{40-I17R}) en fusión con GFP, o pEGFP solo como un control, usando reactivo Turbofect como se describió anteriormente. En cada caso, la cantidad de plásmido varió de 2 μ g a 0,125 μ g. 24 h después de la transfección, las células se infectaron con NiV (aislado malasio UMMC1) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. 1 h después de la infección (p.i.), el inóculo del virus se retiró y se volvió a colocar con medio DMEM que contenía FCS al 3%. Los sobrenadantes de cultivo y los lisados celulares se recogieron a 48 h p.i. para la titulación de TCID₅₀, y el crecimiento del virus se evaluó visualmente inspeccionando en busca de la formación de sincitios. Se realizaron imágenes de fluorescencia con GFP usando un microscopio fluorescente Zeiss 200M. Las imágenes se analizaron mediante Axiovision Software (Zeiss). Para la determinación de TCID₅₀ mediante Kärber, se usaron diluciones en serie de diez veces de los sobrenadantes del cultivo viral para infectar células Vero E6 de la misma manera como se describió anteriormente, y se leyó 48 h p.i. Las diferencias significativas se calcularon usando un ensayo de ANOVA cuando fue posible, n = 6.

EJEMPLO 2:

Resultados

Reconstitución de un complejo nuclear funcional de NiV N⁰-P

Los inventores reconstituyeron varias variantes estructurales del complejo de NiV N⁰-P usando péptidos que abarcan la región de unión a N⁰ de P y moléculas de N recombinantes, truncadas en la NT_{ARM} y el CT_{ARM} y NT_{TAIL}. Mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS) (Fig. 1b), y mediante dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), encontramos que estos complejos nucleares reconstituidos N⁰-P son heterodímeros compactos con una forma general de haba típica de otras proteínas NNV N¹⁸.

Los inventores cartografiaron la región de P que interactúa directamente con N⁰ mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Para ello, expresamos y purificamos un péptido de 100 aminoácidos correspondiente a la región N-terminal de P (P₁₀₀), y caracterizamos sus propiedades estructurales. Mediante SEC-MALLS, demostramos que el péptido es monomérico en disolución, y que tanto su radio hidrodinámico medido por SEC como su radio de giro medido por SAXS eran mayores de lo esperado para una proteína globular de esta masa molecular. Además, la escasa dispersión del desplazamiento químico de las resonancias de amida en el espectro de RMN de coherencia cuántica única heteronuclear (HSQC) era típica de una proteína desordenada, pero después de asignar el espectro de RMN, el parámetro de propensión a la estructura secundaria (SSP), calculado a partir de los desplazamientos químicos secundarios C α y C β , indicó la presencia de cinco hélices α fluctuantes. Analizamos entonces el espectro HSQC de P100

unido a N₃₂₋₃₈₃. En un complejo de este tamaño (~50 kDa), las señales de RMN se ensanchan fuertemente en muestras protonadas, impidiendo su detección, pero en el espectro HSQC observamos resonancias correspondientes a restos 50 a 100, lo que indica que esta región permanece flexible en el complejo, y que la región de unión a N⁰ está comprendida dentro de los primeros cincuenta aminoácidos N-terminales de P (Fig. 1c).

En consecuencia, los inventores demostraron que un péptido correspondiente a los primeros cuarenta restos de P (P₄₀) es suficiente para mantener a N en forma soluble *in vitro* (Fig. 1d). En células humanas que expresan N de NiV sola, observamos una distribución puntuada que puede atribuirse a las propiedades inherentes de autoensamblaje de la proteína. En células que coexpresan tanto N como P fusionada con GFP₄₀ (P₄₀-GFP) en una relación de 1:1, observamos una distribución notablemente homogénea de N en la célula y la colocalización de N con P₄₀, lo que sugiere que el complejo N⁰-P₄₀ se forma en el entorno intracelular y conduce a la solubilización de N (Fig. 1d).

Estructura cristalina del complejo nuclear NiV N⁰-P

El complejo NiV N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ cristalizó en el grupo espacial P2₁2₁2₁ con tres heterodímeros en la unidad asimétrica. Determinamos la estructura a una resolución de 2,5 Å mediante el método SAD (Fig. 1e). NiV N exhibió la estructura de dos dominios característica de NNV N⁵⁻⁸, definiendo un surco básico que puede unirse al ARN. A pesar de la baja conservación global de la secuencia, el núcleo de N podría dividirse en cuatro partes diferentes, N_{NTD1}, N_{NTD2}, N_{NTD3} y N_{CTD}, de los cuales tres parecen tener un pliegue conservado entre diferentes familias de NNV (Fig. 2a)^{5-7,19}. Sobre la base de su localización en la estructura, definimos diez motivos conservados entre la mayoría de los miembros del *Paramyxovirinae*, y les asignamos roles estructurales o funcionales.

La región de chaperona N-terminal de P se estabiliza al unirse a su pareja N⁰, pero solo los primeros 35 restos de P, correspondientes a la primera hélice fluctuante observada en disolución (hélice α_{P1}), eran visibles en la estructura cristalina del complejo N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀. En el complejo, esta región formó una hélice de 2,9 nm de longitud (hélice α_{P1a} : aa 1-19) con una torsión de 90° en el resto N20, que conduce a una hélice corta (hélice α_{P1b} : aa 21-28) (Fig. 1e). La hélice larga α_{P1a} se acopló a un surco hidrófobo poco profundo de N_{CTD} formado por hélices α_{C1} , η_{C1} y α_{C2} del motivo 6 conservado (aa 265-305), y la hélice corta se acopla a la parte superior de N_{CTD} (motivo 10) (Fig. 1e). El complejo implica múltiples contactos hidrófobos y ocho enlaces de hidrógeno para una superficie total enterrada en la interacción de 1,440 Å².

NiV N está en una conformación abierta en el complejo N⁰-P

Comparando la estructura de NiV N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ con la de RSV N en complejo con ARN⁵, encontramos que el pliegue de N se conserva (Fig. 2a, pero que el supuesto surco de unión a ARN de NiV N⁰ está abierto, inclinándose N_{NTD} unos 30° desde N_{CTD} (Fig. 2b). Observamos que un resto de Tyr (Y337) y cuatro de los cinco restos básicos (K170, R184, R185, R338 y R342) que interactúan con el ARN en RSV N (Fig. 2c) están presentes en posiciones equivalentes (Y354 y K178, R192, R193, R352, respectivamente) en la hélice α_{N5} , el bucle α_{N5} - α_{N6} , la hélice α_{N6} y el bucle α_{C3} - α_{C4} de NiV N (Fig. 2d) y se conservan entre *Paramyxovirinae*. Sin embargo, están demasiado separados en NiV N⁰ para interactuar concurrentemente con una molécula de ARN. Alineaciones 3D independientes de NiV N_{NTD} y N_{CTD} con RSV N llevó estos restos a posiciones similares en ambas proteínas (Fig. 2b y 2d), sugiriendo un mecanismo común de cambio conformacional entre conformaciones abiertas y cerradas que implica un movimiento de bisagra entre N_{CTD} y N_{NTD}, según las simulaciones en modo normal.

Unión a ARN y la regla de los seis

En las NCs de RSV, cada N interactúa con siete nucleótidos (nt), y la base 1 se empaqueta en la superficie plana de la hélice α_{N9} formada por dos restos de glicina (G241 y G245) (Fig. 2e)⁵. Sin embargo, en la subfamilia *Paramyxovirinae*, N se une a solo seis nt, y el genoma obedece a una regla de los seis, es decir, un requisito estricto para que su genoma consista en un múltiplo de seis nt^{20,21}. En la forma cerrada putativa de NiV N, encontramos que varios restos en la hélice α_{N6} (motivo 3 conservado) (Fig. 2f), y D254 en hélice α_{N9} (motivo 5 conservado), impiden un empaquetamiento similar de la base 1 (Fig. 2g). La presencia del motivo 3, que se conserva estrictamente en el subfamilia *Paramyxovirinae*, pero está ausente en la subfamilia *Neumovirinae*, podría así explicar por qué la proteína N de los *Paramyxovirinae* se une solamente a seis nt, y por qué estos virus obedecen la regla de los seis.

Conservación de la interfaz de unión de N⁰-P

Las fosfoproteínas del NNV varían mucho en longitud y secuencia de aminoácidos²², y la conservación de secuencias generalmente se vuelve indetectable más allá del nivel de la familia. Sin embargo, un estudio reciente identificó restos en la región N-terminal de P que se conservan entre la mayoría de los miembros de los *Paramyxovirinae* a pesar de una relación evolutiva distante global²³. La mayoría de estos restos conservados parecían ser restos clave para la interacción con N⁰ (Fig. 3a), mientras que el cartografiado de la conservación de restos entre *Paramyxovirinae* sobre la superficie de NiV N revela una fuerte conservación del sitio de unión para P (Fig. 3a). Estos resultados sugieren de este modo una arquitectura estructural conservada del complejo N⁰-P entre diferentes géneros de la subfamilia, y amplían el alcance de nuestra estructura nuclear de NiV N⁰-P.

Inhibición de la replicación de NiV

Los inventores encontraron que la expresión del péptido P fusionado con GFP₄₀ en células humanas (HEK293T) antes de la infección inhibe significativamente el crecimiento viral de una manera dependiente de la dosis, y elimina la formación de sincitios, siendo este último un sello distintivo de la infección por NiV (Fig. 3b-c). Usamos la estructura cristalina de N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ para diseñar variantes peptídicas que desestabilicen la interfaz entre N⁰ y P₅₀, y encontramos que las variantes en las que los restos conservados G10 o 117 mutan a arginina (G10R, I17R) eran menos eficaces para inhibir la replicación viral. Estos resultados apoyaron así la especificidad de la interacción observada en el cristal. (Fig. 3b-c). Debido a que el complejo nuclear N⁰-P reconstituido carece de una gran parte de la molécula de P, principalmente el dominio de tetramerización y las regiones de unión tanto a polimerasa como a NC, planteamos la hipótesis de que P₄₀ podría inhibir el crecimiento viral atrapando N⁰ en un complejo no productivo.

Las funciones de chaperona de P

Para comprender las funciones de chaperona de P_{NTR}, usamos el complejo de RSV N-ARN como modelo para el complejo de NiV N-ARN (Fig. 4a, 4b). Cuando alineamos N_{CTD} de NiV N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ con el N_{CTD} de un protómero de N del complejo de RSV N-ARN, descubrimos que la hélice α_{P1b} compete con el CT_{ARM} del protómero N_{i+1} por el mismo sitio de unión en la superficie de N (Fig. 4a), mientras que hélice α_{P1a} compete con el NT_{ARM} del protómero N_{i-1} (Fig. 4b). De este modo, un primer papel de P es evitar la polimerización de N al interferir con la unión de los subdominios intercambiados. La estructura del complejo de NiV N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ también sugirió que el P unido previene el ensamblaje de NC y la unión a ARN al atrapar N⁰ en una conformación abierta sin interferir directamente con el ARN (Fig. 2g). El cierre de la molécula requiere que las hélices α_{N5} y α_{N9} roten alrededor de pivotes cerca de la unión N_{NTD}-N_{CTD} (Fig. 2b), y de ese modo, que el pasador formado por hélices α_{C2} , η_{C2} , η_{C3} , η_{C4} se aleje del núcleo de N_{CTD}. Proponemos que al unir hélices α_{C1} , η_{C1} , α_{C2} y α_{C4} (Fig. 4c), P rigidiza todo el dominio N_{CTD} y previene cambios conformacionales globales en N. Además, la cadena lateral voluminosa de Y258, un resto altamente conservado entre *Paramyxoviridae* (Fig. 4d), apunta al interior del surco de unión al ARN, evitando que el ARN entre en contacto cercano con la superficie de la proteína (Fig. 4e). En el complejo de RSV N-ARN, Y251, ubicado de manera similar al final de la hélice α_{N9} , apunta en la dirección opuesta, y se acopla a la cadena de un resto de glicina en la hélice α_{C2} . También se conserva una glicina en esta posición en NiV N, lo que sugiere que la cadena lateral de tirosina se aleja al unirse al ARN (Fig. 4e), pero en el complejo N⁰-P, el movimiento de Y258 se ve impedido por la presencia del extremo N-terminal de P. Alternativamente, Y258 podría interactuar con una de las bases de ARN.

Discusión:

Los inventores presentan la estructura del complejo nuclear N⁰-P del virus Nipah, revelando que N⁰ sin ensamblar se mantiene en una conformación abierta, y proporcionando pruebas experimentales de que NNV N cambia entre conformaciones abiertas y cerradas durante el ensamblaje de NC. En el complejo N⁰-P, la región de unión a N⁰ N-terminal de P previene la polimerización de N al ocupar los sitios de unión para los subdominios intercambiados de N adyacente, y evita la encapsidación de ARN al formar un puente con N_{CTD} y obstaculizar el cierre de la molécula. Proponemos un posible escenario para el ensamblaje de moléculas de N⁰ a lo largo del ARN viral recién sintetizado mediante un mecanismo concertado de transferencia de N⁰ desde el complejo N⁰-P a la molécula de ARN naciente, que implica la liberación de P y el cierre del surco de unión al ARN. En una primera etapa, asumimos que se forma un complejo de encuentro con la molécula de ARN insertada holgadamente en la cavidad abierta. En una segunda etapa concertada, se libera P, y N atrapa la molécula de ARN. La liberación de P de la N unida al ARN libera el sitio de unión para el NT_{ARM} de la siguiente molécula de N entrante. Tras la formación del complejo de encuentro con el siguiente complejo N⁰-P, el NT_{ARM} de la N entrante se puede unir a la N previamente ligado. El CT_{ARM} de la N unida puede unirse a la N entrante y ayudar a desplazar el péptido P. En un segundo proceso o proceso concomitante, se libera P, y N se cierra sobre el ARN. El NT_{ARM} de la primera molécula de N unida bloquea la segunda N en su conformación cerrada al unir en forma de puente N_{NTD} con N_{CTD}.

Los inventores confirmaron que la región corta de unión a N⁰ de P es suficiente para acompañar a N⁰ y mantenerla en forma soluble, pero P₄₀ inhibió la replicación viral, lo que indica que la región N-terminal de P no es suficiente para permitir el ensamblaje de NC, y sugiere la participación de otras regiones de P en este proceso. P es una molécula multifuncional, altamente flexible, que también posee sitios de unión para L o para las NCs, y de este modo es plausible que las interacciones con estas otras proteínas virales sean necesarias para posicionar correctamente el complejo N⁰-P en el sitio de síntesis de ARN viral. La unión de N⁰-P a la NC, como se sugiere en la Figura 5c, elevaría la concentración local alrededor del sitio de síntesis de ARN, y de ese modo favorecería la encapsidación del ARN viral.

La inhibición exitosa de la infección por NiV por el péptido de unión a N⁰ de P sugiere que la cavidad de unión a P en N puede seleccionarse específicamente como diana para diseñar inhibidores de la replicación de NiV. La estructura del complejo nuclear N⁰-P proporciona la base estructural para diseñar moléculas pequeñas que podrían prevenir la formación del complejo. La fuerte conservación de la interfaz de unión sugiere que la estructura de NiV N₃₂₋₃₈₃⁰-P₅₀ es un buen modelo estructural para el complejo N⁰-P de otros paramyxovirus de importancia médica, y que posiblemente podría desarrollarse un fármaco de amplio espectro frente a varios virus.

EJEMPLO 3:**Materiales y métodos:**

Construcción de plásmido. Las secuencias correspondientes a los restos de NiV P o CDV P (cepa de referencia, Genbank NC_001921.1) se clonaron en el marco con GFP en el vector pEGFP-C2 (CLONTECH Laboratories) para producir los constructos pEGFP-P40-NIV y pEGFP-P40-CDV, o en el vector pCG (ref – Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. Tanaka M, Herr W. Cell. 1990 feb 9;60(3):375-86. 10.1016/0092-8674(90)90589-7) que contiene un sitio de multiclonación GFP-IRES. Este vector permite la expresión simultánea tanto de GFP como del péptido p40 por separado pero a partir del mismo transcrito de ARN bi-cistrónico después de la transfección en células de mamífero.

Inhibición de la replicación viral con NIV y CDV. Células 293T se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, PAA laboratories) suplementado con suero fetal de ternera al 10% (FCS) (PerbioHyclone). Todos los experimentos con el virus Nipah se realizaron en el INSERM "Laboratoire Jean Mérieux" (Lyon, Francia) en un laboratorio de contención de nivel de bioseguridad 4 (BSL4). Todos los experimentos con el virus del moquillo canino se realizaron bajo confinamiento de nivel 2 de bioseguridad en una cabina de bioseguridad de cultivo celular reservada para trabajar con material infeccioso. Las células se cultivaron como se describió anteriormente durante 24 h hasta una confluencia de ~40%. Inicialmente, las células se transfectaron con plásmidos que codifican w.t. P₄₀-NIV en fusión con GFP (vector pEGFP) o expresado por separado (del vector IRES bicistrónico pCG, descrito anteriormente), o w.t. P₄₀-CDV en fusión con GFP (vector pEGFP) o pEGFP/pCG solo como control, usando Turbofect siguiendo las recomendaciones del fabricante. 24 h después de la transfección, las células se infectaron con NiV (aislado malasio UMMC1) o con CDV a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. El inóculo del virus se eliminó 1 h después de la infección (p.i.) y se reemplazó por medio DMEM que contenía FCS al 3%. Los sobrenadantes de cultivo y los lisados celulares se recogieron a las 48 h p.i. para la titulación de TCID₅₀, y el crecimiento del virus se evaluó visualmente inspeccionando en busca de la formación de sincitios. Se tomaron imágenes de fluorescencia de GFP usando un microscopio fluorescente Zeiss 200M. Las imágenes se analizaron mediante Axiovision Software (Zeiss). Para la determinación TCID₅₀ mediante Kärber, se usaron diluciones en serie de diez veces de los sobrenadantes del cultivo viral para infectar células Vero E6 de la misma manera como se describió anteriormente, y se leyó 48 h p.i.

Resultados:

Inhibición de la replicación de NiV o CDV por un N^o-péptido de unión de P.

Los inventores demostraron que los péptidos derivados del región de unión a N^o de P (P₄₀) de NiV inhiben el crecimiento viral tanto de NiV como de CDV (Figura 5A). Los inventores también demostraron que la inhibición de la replicación de CDV por péptidos derivados tanto de NiV como de CDV depende de la dosis (Figura 5B).

REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

1 Chua, K. B. et al. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. Science 288, 1432-1435 (2000).

2 Morin, B., Rahmeh, A. A. y Whelan, S. P. Mechanism of RNA synthesis initiation by the vesicular stomatitis virus polymerase. Embo J. 31, 1320-1329 (2012).

3 Arnheiter, H., Davis, N. L., Wertz, G., Schubert, M. y Lazzarini, R. A. Role of the nucleocapsid protein in regulating vesicular stomatitis virus RNA synthesis. Cell 41, 259-267 (1985).

4 Patton, J. T., Davis, N. L. y Wertz, G. W. N protein alone satisfies the requirement for protein synthesis during RNA replication of vesicular stomatitis virus. J. Virol. 49, 303-309 (1984).

5 Tawar, R. G. et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. Science 326, 1279-1283 (2009).

6 Albertini, A. A. et al. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. Science 313, 360-363 (2006).

7 Green, T. J., Zhang, X., Wertz, G. W. y Luo, M. Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. Science 313, 357-360 (2006).

8 Desfosses, A., Goret, G., Estrozi, L. F., Ruigrok, R. W. y Gutsche, I. Nucleoprotein-RNA orientation in the measles virus nucleocapsid by three-dimensional electron microscopy. J. Virol. (2010).

9 Curran, J., Marq, J. B. y Kolakofsky, D. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. J. Virol. 69, 849-855 (1995).

- 10 Pringle, C. R. The order Mononegavirales--current status. *Arch Virol* 142, 2321-2326 (1997).
- 11 Karlin, D., Ferron, F., Canard, B. y Longhi, S. Structural disorder and modular organization in Paramyxovirinae N and P. *J. Gen. Virol.* 84, 3239-3252 (2003).
- 5 12 Jensen, M. R. et al. Intrinsic disorder in measles virus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9839-9844 (2011).
- 13 Communie, G. et al. Atomic resolution description of the interaction between the nucleoprotein and phosphoprotein of Hendra virus. *PLoS Pathog* 9, e1003631 (2013).
- 14 Mavrikis, M. et al. Rabies virus chaperone: identification of the phosphoprotein peptide that keeps nucleoprotein soluble and free from non-specific RNA. *Virology* 349, 422-429 (2006).
- 10 15 Gérard, F. C. A. et al. Modular organization of rabies virus phosphoprotein. *J. Mol. Biol.* 388, 978-996 (2009).
- 16 Habchi, J., Mamelli, L., Darbon, H. y Longhi, S. Structural disorder within Henipavirus nucleoprotein and phosphoprotein: from predictions to experimental assessment. *PLoS One* 5, e11684 (2010).
- 17 Leyrat, C. et al. Ensemble structure of the modular and flexible full-length vesicular stomatitis virus phosphoprotein. *J. Mol. Biol.* 423, 182-197 (2012).
- 15 18 Leyrat, C. et al. Structure of the vesicular stomatitis virus N-P complex. *PLoS Pathog* 7, e1002248 (2011).
- 19 Ruigrok, R. W., Crepin, T. y Kolakofsky, D. Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr Opin Microbiol* 14, 504-510 (2011).
- 20 Calain, P. y Roux, L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J. Virol.* 67, 4822-4830 (1993).
- 20 21 Halpin, K., Bankamp, B., Harcourt, B. H., Bellini, W. J. y Rota, P. A. Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay. *J. Gen. Virol.* 85, 701-707 (2004).
- 22 Karlin, D. y Belshaw, R. Detecting remote sequence homology in disordered proteins: discovery of conserved motifs in the N-termini of Mononegavirales phosphoproteins. *PLoS One* 7, e31719 (2012).
- 25 23 Marley, J., Lu, M. y Bracken, C. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J. Biomol. NMR* 20, 71-75 (2001).
- 24 Wyatt, P. J. Submicrometer Particle Sizing by Multiangle Light Scattering following Fractionation. *J. Colloid Interface Sci.* 197, 9-20 (1998).
- 25 Uversky, V. N. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* 32, 13288-13298 (1993).
- 30 26 Konarev, P., Petoukhov, M., Volchkov, V. y Svergun, D. I. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* 39, 277-286 (2006).
- 27 Svergun, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* 76, 2879-2886 (1999).
- 35 28 Volkov, V. V. y Svergun, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* 36, 860-864 (2003).
- 29 Lescop, E., Schanda, P. y Brutscher, B. A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment. *J. Magn. Reson.* 187, 163-169 (2007).
- 30 Delaglio, F. et al. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277-293 (1995).
- 40 31 SPARKY 3 (University of California, San Francisco, 2003).
- 32 Jung, Y. S. y Zweckstetter, M. Mars - robust automatic backbone assignment of proteins. *J. Biomol. NMR* 30, 11-23 (2004).
- 33 Marsh, J. A., Singh, V. K., Jia, Z. y Forman-Kay, J. D. Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between alpha- and gamma-synuclein: implications for fibrillation. *Protein Sci* 15, 2795-2804 (2006).
- 45 34 Jensen, M. R., Salmon, L., Nodet, G. y Blackledge, M. Defining conformational ensembles of intrinsically disordered and partially folded proteins directly from chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 1270-1272 (2010).

- 35 Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125-132 (2010).
- 36 Pape, T. y Schneider, T. R. HKL2MAP: a graphical user interface for phasing with SHELX programs *J. Appl. Cryst.* 37, 843-844 (2004).
- 5 37 Terwilliger, T. C. et al. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64, 61-69 (2008).
- 38 Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221 (2010).
- 39 Afonine, P. V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68, 352-367 (2012).
- 10 40 Emsley, P. y Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132 (2004).
- 41 Chen, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 12-21 (2010).
- 42 The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA, 2002).
- 15 43 Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25, 1605-1612 (2004).
- 44 Laskowski, R. A. y Swindells, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 2778-2786 (2011).
- 20 45 Suhre, K. y Sanejouand, Y. H. ElNemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Res* 32, W610-614 (2004).
- 46 Katoh, K. y Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30, 772-780 (2013).
- 47 Gouet, P., Robert, X. y Courcelle, E. ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 31, 3320-3323 (2003).
- 25 48 Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J. y Ram, S. J. Image Processing with ImageJ. *Biophoton. Int.* 11, 36-42 (2004).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSERTM
- <120> PÉPTIDOS QUE INCLUYEN UN DOMINIO DE UNIÓN DE LA SUBUNIDAD DE LA FOSFOPROTEÍNA (P) VIRAL A LA NUCLEOPROTEÍNA (N0) VIRAL
- 30 <130> BIO14104 VOLCHKOV
- <160> 36
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 40
- 35 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> PI-40 Nipah
- <400> 1

ES 2 813 827 T3

Met Asp Lys Leu Glu Leu Val Asn Asp Gly Leu Asn Ile Ile Asp Phe
1 5 10 15

Ile Gln Lys Asn Gln Lys Glu Ile Gln Lys Thr Tyr Gly Arg Ser Ser
20 25 30

Ile Gln Gln Pro Ser Ile Lys Asp
35 40

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> PI-40 CDV

<400> 2

Met Ala Glu Glu Gln Ala Tyr His Val Ser Lys Gly Leu Glu Cys Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Arg Glu Asn Pro Pro Asp Ile Glu Glu Ile Gln Glu Val
20 25 30

Ser Ser Leu Arg Asp Gln Thr Cys
35 40

10 <210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido de consenso

<400> 3

Asp Gln Ala Glu Asn Val Gln Glu Gly Leu Glu Cys Ile Gln Ala Ile
1 5 10 15

Gln Lys Asn

<210> 4

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PI-40 MeV

<400> 4

ES 2 813 827 T3

Met Ala Glu Glu Gln Ala Arg His Val Lys Asn Gly Leu Glu Cys Ile
1 5 10 15

Arg Ala Leu Lys Ala Glu Pro Ile Gly Ser Leu Ala Ile Glu Glu Ala
20 25 30

Met Ala Ala Trp Ser Glu Ile Ser
35 40

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido TAT 2

<400> 5

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

10 <210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido Tat

<400> 6

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 7

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de poliarginina R9

<400> 7

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

25 <210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> péptido de poliarginina R11

<400> 8

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 9

5 <211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido HA2-R9 peptide

10 <400> 9

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25 30

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de penetratina

<400> 10

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

20 <210> 11

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> péptido de transportano

<400> 11

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 12

<211> 33

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de maurocalcina

<400> 12

Gly Asp Cys Leu Pro His Leu Lys Leu Cys Lys Glu Asn Lys Asp Cys
1 5 10 15

Cys Ser Lys Lys Cys Lys Arg Arg Gly Thr Asn Ile Glu Lys Arg Cys
5 20 25 30

Arg

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido de decalisina

<400> 13

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10

15 <210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido PTD4 derivado de HIV-Tat

<400> 14

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 15

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de motivo de translocación del virus de la hepatitis B (PTM)

<400> 15

30 Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro
1 5 10

<210> 16

<211> 28

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido mPrPI-28
 5 <400> 16
 Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
 1 5 10 15
 Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro
 20 25
 <210> 17
 <211> 35
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido POD
 <400> 17
 Gly Gly Gly Ala Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Arg Lys Lys Ala
 1 5 10 15
 Ala Lys Ala Ala Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Arg Lys Lys Ala
 20 25 30
 Ala Lys Ala
 35
 15 <210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> péptido pVEC
 <400> 18
 Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala
 1 5 10 15
 His Ser Lys
 <210> 19
 <211> 23
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido EB1

ES 2 813 827 T3

<400> 19

Leu Ile Arg Leu Trp Ser His Leu Ile His Ile Trp Phe Gln Asn Arg
1 5 10 15

Arg Leu Lys Trp Lys Lys Lys
20

<210> 20

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido Rath

<400> 20

Thr Pro Trp Trp Arg Leu Trp Thr Lys Trp His His Lys Arg Arg Asp
1 5 10 15

10 Leu Pro Arg Lys Pro Glu
20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido CADY

<400> 21

Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu
1 5 10 15

Leu Trp Arg Ala
20

<210> 22

20 <211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido de histatina 5

25 <400> 22

Asp Ser His Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His Glu
1 5 10 15

Lys His His Ser His Arg Gly Tyr
20

<210> 23

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> péptido Antp
 <400> 23
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 24
 <211> 16
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido Cyt86-101
 <400> 24
 Lys Lys Lys Glu Glu Arg Ala Asp Leu Ile Ala Tyr Leu Lys Lys Ala
 1 5 10 15
 15 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> péptido DPT
 <400> 25
 Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile
 1 5 10
 <210> 26
 25 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia nucleotídica de P40 de Nipah
 30 <400> 26
 atggataaat tggaactagt caatgatggc ctcaatatta ttgactttat tcagaagaac 60
 caaaaagaaa tacagaagac atacggacga tcaagtattc aacaaccag catcaaagat 120
 <210> 27
 <211> 120

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica de P40 de CDV

5 <400> 27

atggcagagg aacaggccta ccatgtcagc aaagggctgg aatgcctcaa agccctcaga 60

gagaatcctc ctgacattga ggagattcaa gaggtcagca gcctcagaga ccaaacctgc 120

<210> 28

<211> 120

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica de P40 de MeV

<400> 28

atggcagaag agcaggcacg ccatgtcaaa aacggactgg aatgcatccg ggctctcaag 60

gccgagccca tcggctcact ggccatcgag gaagctatgg cagcatggtc agaaatatca 120

15 <210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> N189-205 Nipah

<400> 29

Ser Glu Thr Arg Arg Trp Ala Lys Tyr Val Gln Gln Lys Arg Val Asn

1 5 10 15

Pro

<210> 30

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> N191-207 Mev

<400> 30

Ser Glu Leu Arg Arg Trp Ile Lys Tyr Thr Gln Gln Arg Arg Val Val

1 5 10 15

30 Gly

<210> 31

ES 2 813 827 T3

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> N191-207 Muv
 <400> 31
 Ser Ala Asp Arg Arg Phe Ala Lys Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 32
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> N189-205 NDV
 <400> 32
 Ser Glu Thr Arg Arg Ile Asn Lys Tyr Met Gln Gln Gly Arg Val Gln
 1 5 10 15
 15 Lys
 <210> 33
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> N253-273 Nipah
 <400> 33
 Ser Asp Ile Gly Asn Tyr Val Glu Glu Thr Gly Met Ala Gly Phe Phe
 1 5 10 15
 25 Ala Thr Ile Arg Phe
 20
 <210> 34
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> N253-273 Mev
 <400> 34

ES 2 813 827 T3

Cys Asp Ile Asp Thr Tyr Ile Val Glu Ala Gly Leu Ala Ser Phe Ile
1 5 10 15

Leu Thr Ile Lys Phe
20

<210> 35

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> N253-273 Muv

<400> 35

Gly Asp Ile Gly Lys Tyr Ile Glu Asn Ser Gly Leu Thr Ala Phe Phe
1 5 10 15

Leu Thr Leu Lys Tyr
20

10 <210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> N251-271 NDV

<400> 36

Gly Asp Val Asp Ser Tyr Ile Arg Asn Thr Gly Leu Thr Ala Phe Phe
1 5 10 15

Leu Thr Leu Lys Tyr
20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de 100 aminoácidos como máximo, que tiene la capacidad de inhibir la replicación viral de Paramyxovirinae, que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula (I):

Valina-Xaa1-Xaa2-Glicina-Leucina-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8, en la que:

- 5 Xaa1 es glutamina (Q), serina (S) o asparagina (N), lisina (K), o un aminoácido polar equivalente;
 Xaa2 es ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), asparagina (N), lisina (K), o un aminoácido (o ácido) equivalente cargado negativamente;
 Xaa3 es ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), lisina (K) o glutamina (Q), serina (S) o asparagina (N);
 Xaa4 es cisteína (C), isoleucina (I);
- 10 Xaa5 es isoleucina (I), leucina (L) o valina (V) o un aminoácido alifático apolar equivalente;
 Xaa6 es glutamina (Q), lisina (K), arginina (R) o ácido aspártico (D);
 Xaa7 es alanina (A), o fenilalanina (F), o un aminoácido apolar equivalente;
 Xaa8 es isoleucina (I), leucina (L) o valina (V), o un aminoácido alifático apolar equivalente.

2. El péptido aislado de la reivindicación 1, en el que:

- 15 Xaa1 es asparagina (N) o glutamina (Q);
 Xaa2 es ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E);
 Xaa3 es asparagina (N) o ácido glutámico (E);
 Xaa4 es isoleucina (I) o cisteína (C);
 Xaa5 es isoleucina (I);
- 20 Xaa6 es ácido aspártico (D) o glutamina (Q);
 Xaa7 es fenilalanina (F) o alanina (A);
 Xaa8 es isoleucina (I).

3. El péptido aislado según la reivindicación 1, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en:

- 25 i) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de valina en la posición 7 hasta el resto de isoleucina en la posición 17 en SEQ ID NO: 1,
 ii) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de valina en la posición 9 hasta el resto de leucina en la posición 19 en SEQ ID NO: 2,
 iii) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la secuencia de (i) o (ii), preferiblemente una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la secuencia de (i) o (ii).

30 4. El péptido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (II):

Yaa1-Yaa2-Yaa3-Yaa4-Yaa5-Valina-Xaa1-Xaa2-Glicina-Leucina-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Yaa6-Yaa7-Yaa8, en la que

Xaa1-Xaa2 Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8 son como se definen en la reivindicación 1;

- 35 Yaa1 es ácido aspártico (D), ácido glutámico (E) o un aminoácido ácido equivalente;
 Yaa2 es glutamina (Q) o lisina (K);
 Yaa3 es alanina (A), leucina (L) o tirosina (Y);
 Yaa4 es ácido glutámico (E), tirosina (Y) o arginina (R);
 Yaa5 es asparagina (N), histidina (H) o leucina (L);
- 40 Yaa6 es glutamina (Q), lisina (K), o arginina (R);

Yaa7 es lisina (K), alanina (A) o ácido glutámico (E);

Yaa8 es asparagina (N), ácido glutámico (E) serina (S).

5. El péptido aislado según la reivindicación 4, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 i) la secuencia de aminoácidos que consiste en MDKLELVNDGLNIIDFIQKNQKEIQKTYGRSSIQQPSIKD (SEQ ID NO: 1);
- ii) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de leucina en la posición 6 hasta el resto de ácido aspártico en la posición 40 en la SEQ ID NO:1;
- iii) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de leucina en la posición 11 hasta el resto de ácido aspártico en la posición 40 en SEQ ID NO:1;
- 10 iv) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de metionina en la posición 1 hasta el resto de asparagina en la posición 20 en SEQ ID NO:1;
- v) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de asparagina en la posición 20 hasta el resto de glutamina en la posición 35 en SEQ ID NO:1;
- 15 vi) la secuencia de aminoácidos que consiste en MAEEQAYHVSKGLECLKALRENPPDIEEIQEVSSLRDQTC (SEQ ID NO: 2);
- vii) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de metionina en la posición 1 hasta el resto de asparagina en la posición 22 en SEQ ID NO: 2;
- viii) la secuencia de aminoácidos que consiste en DQAEENVQEGLECIQAIQKN (SEQ ID NO: 3)
- 20 ix) la secuencia de aminoácidos que consiste en MAEEQARHVKNGLCIRALKAEPIGSLAIEEAMAAWSEIS (SEQ ID NO: 4)
- x) una secuencia de aminoácidos que abarca desde el resto de valina en la posición 9 hasta el resto de leucina en la posición 19 en SEQ ID NO:4
- xi) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la secuencia de (i) a (x), preferiblemente una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la secuencia de (i) a (x).

25 6. Un polinucleótido que comprende o consiste en un ácido nucleico que codifica un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un método para producir un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho método comprende las etapas de:

- 30 a) cultivar una célula recombinante que comprende un vector recombinante que comprende un polinucleótido como se define en la reivindicación 6 en condiciones que permitan la expresión del péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
- b) opcionalmente, purificar el péptido obtenido en la etapa a).

35 8. El péptido aislado según la reivindicación 1 a 5, para uso para prevenir y/o tratar una infección por Paramyxovirinae; en particular, para uso para prevenir y/o tratar una infección por Paramyxovirinae seleccionada del grupo que consiste en: infección por Rubulavirus, infección por Avulavirus, infección por Henipavirus, infección por virus similar a Henipavirus, infección por Morbillivirus, infección por virus similar a Morbillivirus (virus similares a TPMV), infección por Respirovirus, o infección por Ferlavirus.

9. El péptido aislado para uso según la reivindicación 8, en el que:

- dicha infección por Avulavirus es una infección por el virus de la enfermedad de Newcastle;
- 40 dicha infección por Henipavirus es una infección por el virus Nipah (NiV) o por el virus Hendra (HeV);
- dicha infección por Morbillivirus es una infección por el virus del sarampión (MeV), el virus de la peste bovina, el virus del moquillo canino, el virus del moquillo focino, o el virus de la peste ovina;
- dicha infección por virus similar a TPMV es una infección por el paramixovirus de Tupaia, el virus de Mossman, el virus Nariva o el virus Salem;
- 45 dicha infección por Ferlavirus es una infección por el virus Fer-de-Lance;

dicha infección por Rubulavirus es una infección por el virus de las paperas, los virus parainfluenza tipos 2, 4, el virus Achimota 1 y 2, el virus parainfluenza 5 del simio, el virus de Menangle, el virus de Tioman, o el Tuhokovirus 1, 2 y 3;

dicha infección por Respirovirus es una infección por el virus Sendai, los virus 1 y 3 de la parainfluenza humana.

- 5 10. Una composición farmacéutica que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
11. El péptido aislado según la reivindicación 1, que comprende 79 aminoácidos como máximo.
12. Un péptido aislado de 100 aminoácidos como máximo, para uso en un método para prevenir y/o tratar una infección por Paramyxovirinae; comprendiendo dicho péptido aislado una secuencia de aminoácidos de fórmula (I):
- 10 Valina-Xaa1-Xaa2-Glicina-Leucina-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8, en la que:
Xaa1 es glutamina (Q), serina (S), asparagina (N), lisina (K), o un aminoácido polar equivalente;
Xaa2 es ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), asparagina (N), lisina (K), o un aminoácido equivalente cargado negativamente (o ácido);
Xaa3 es ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), lisina (K) o glutamina (Q), serina (S) o asparagina (N);
- 15 Xaa4 es cisteína (C), isoleucina (I);
Xaa5 es isoleucina (I), leucina (L) o valina (V), o un aminoácido alifático apolar equivalente;
Xaa6 es glutamina (Q), lisina (K), arginina (R) o ácido aspártico (D);
Xaa7 es alanina (A), o fenilalanina (F) o un aminoácido apolar equivalente;
Xaa8 es isoleucina (I), leucina (L) o valina (V) o un aminoácido alifático apolar equivalente.
- 20 13. El péptido aislado según la reivindicación 1 a 5, o péptido aislado para el uso según la reivindicación 12, en el que dicho péptido aislado está unido a al menos un péptido de penetración celular.
14. El péptido aislado según la reivindicación 1 a 5, o el péptido aislado para el uso según la reivindicación 12; en el que dicho péptido es un péptido modificado.
- 25 15. Una composición farmacéutica, que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables; para uso en un método para prevenir y/o tratar una infección por Paramyxovirinae.

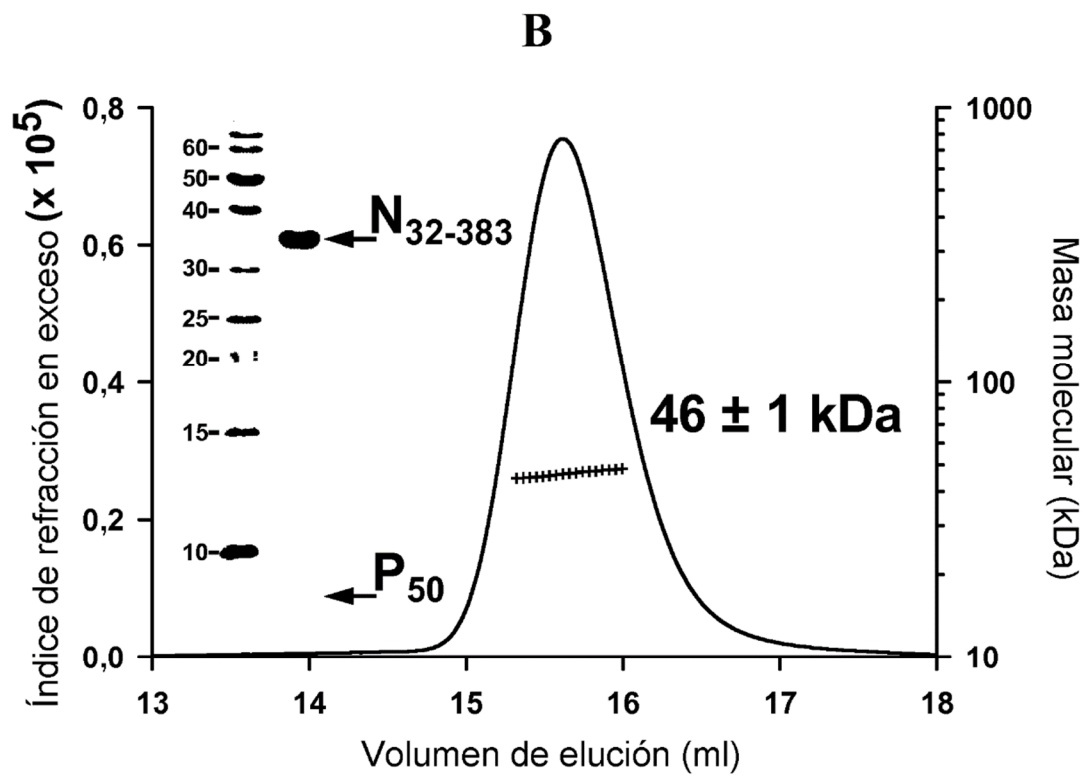
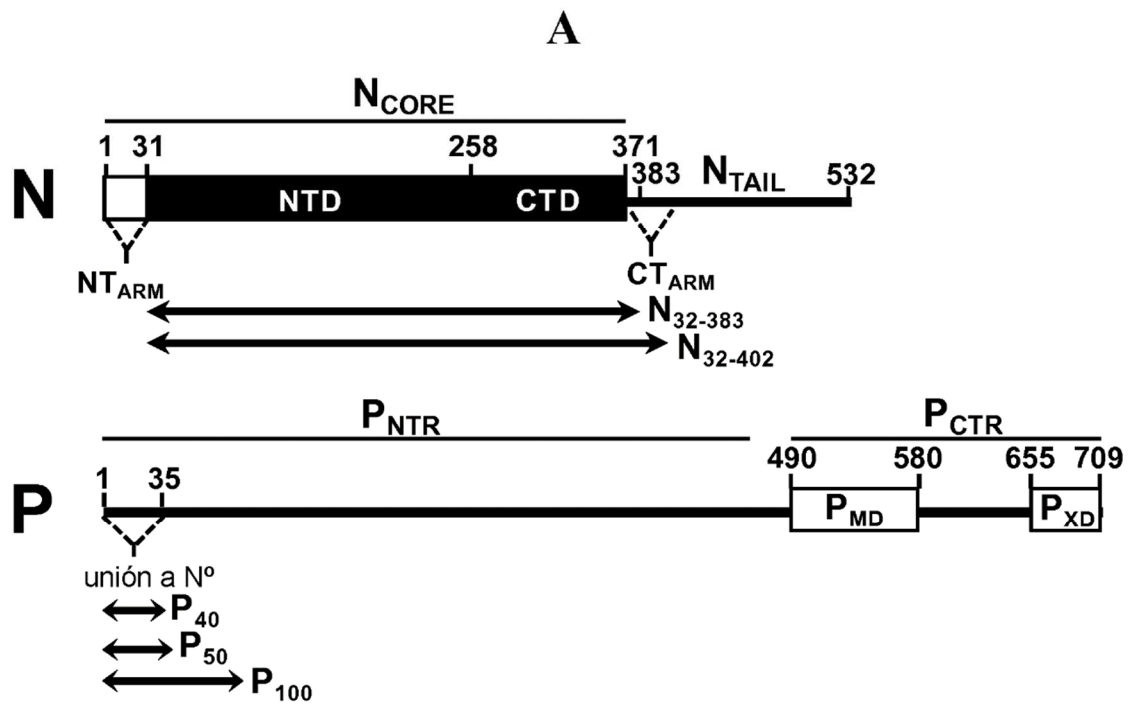


Figura 1 A y B

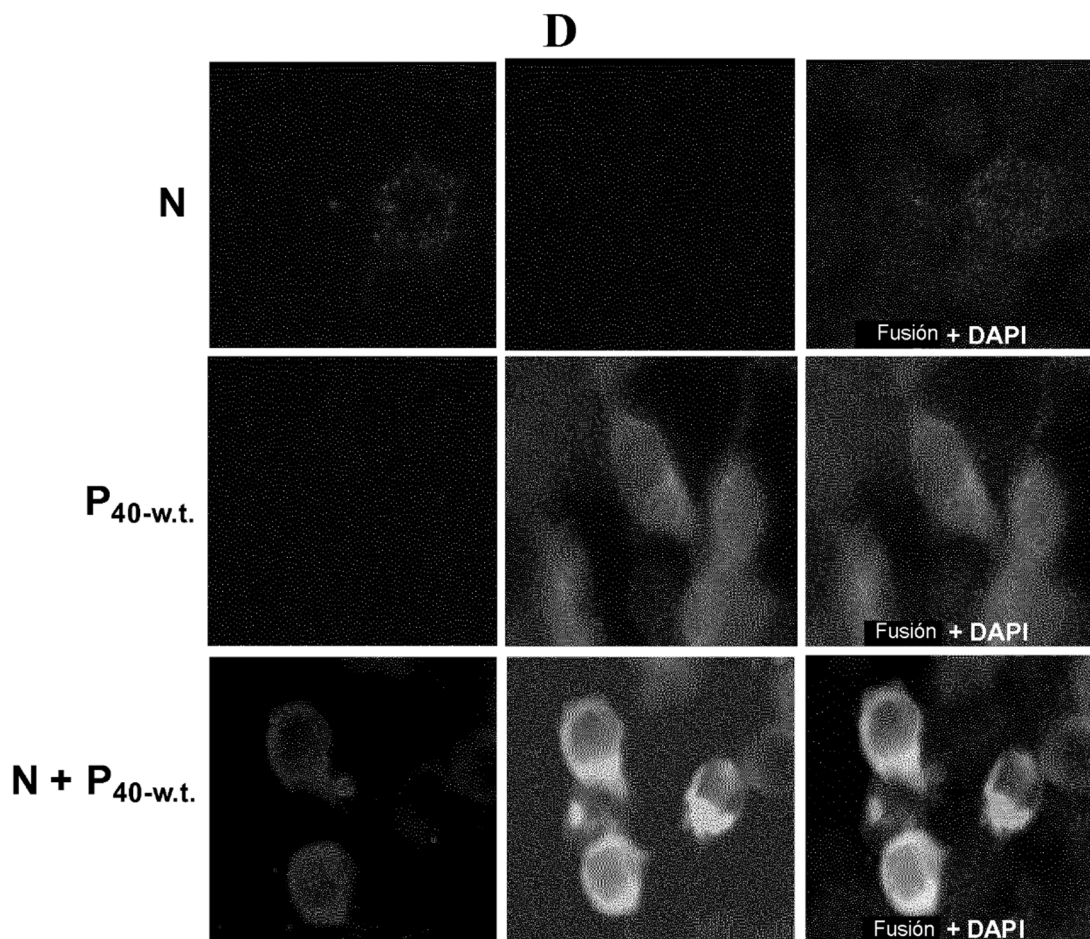
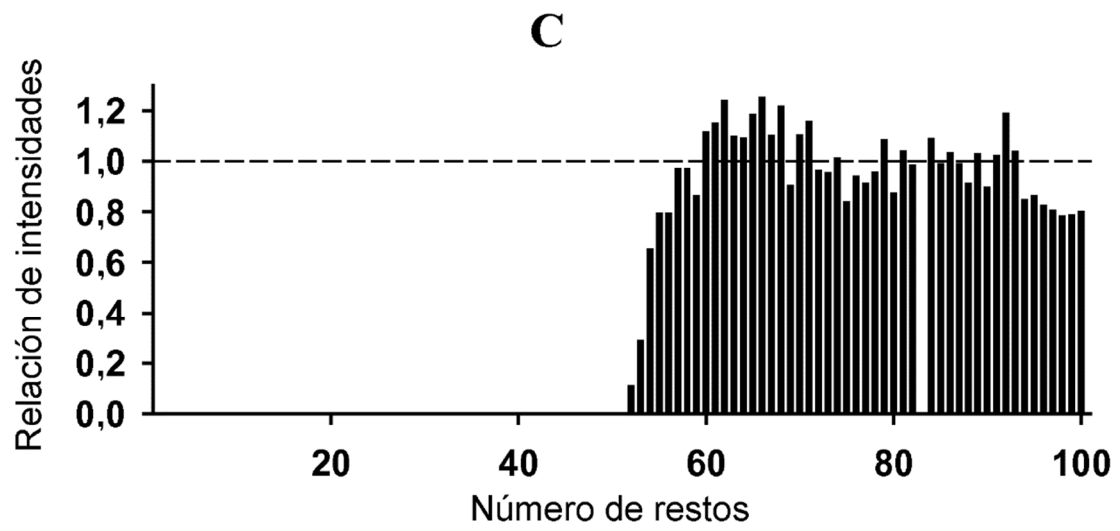


Figura 1 C y D

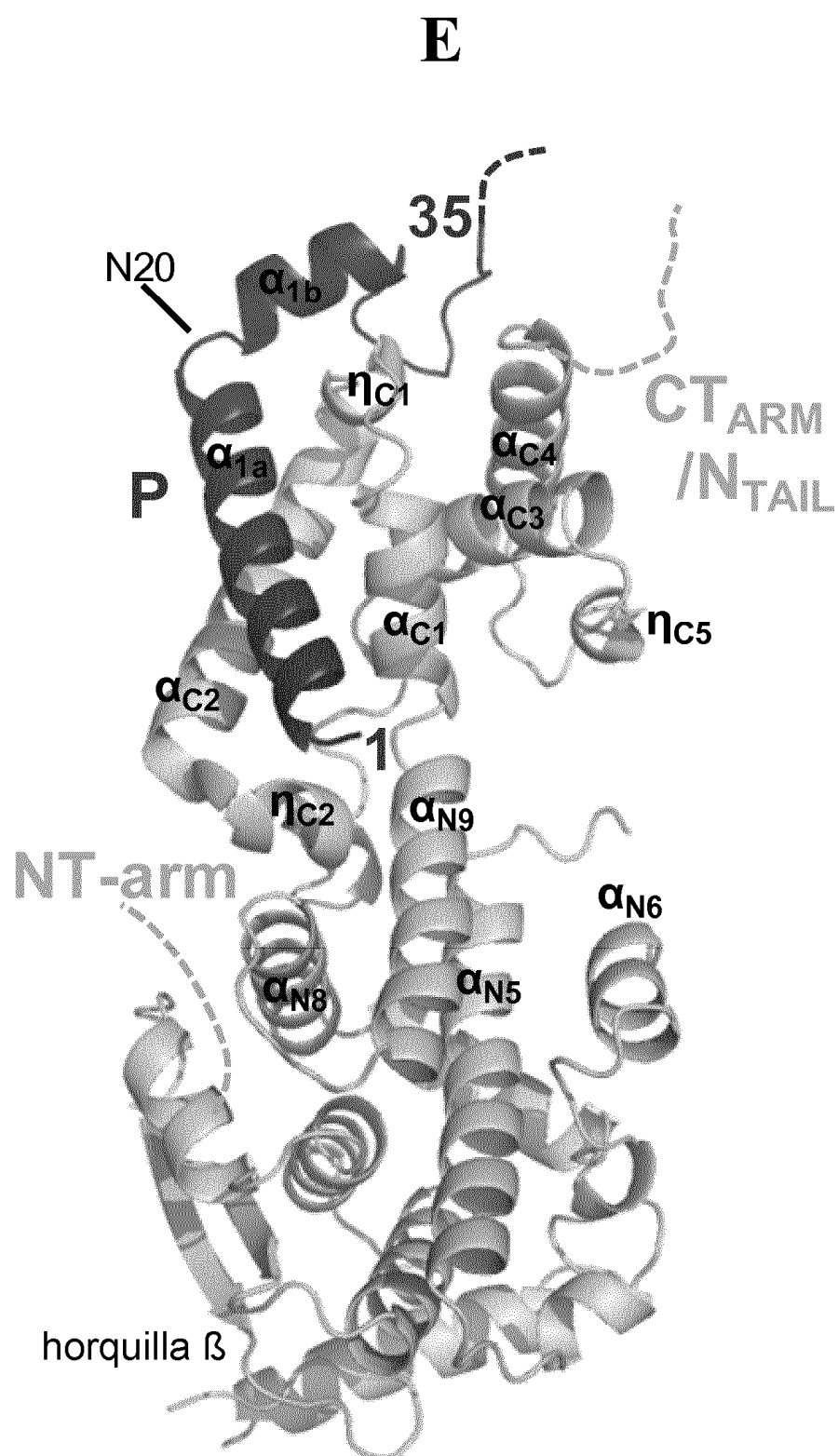


Figura 1 E

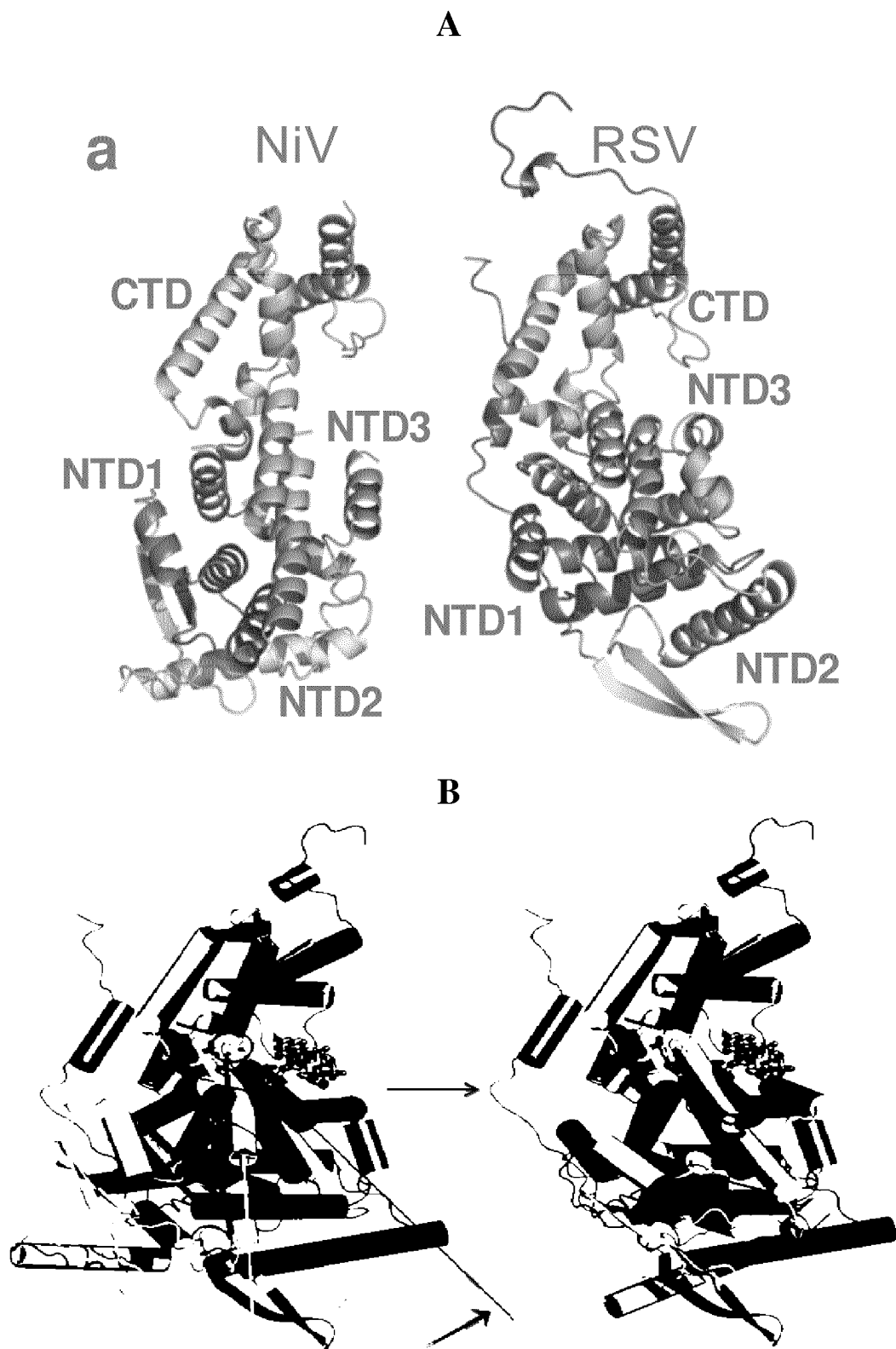


Figura 2 A y B

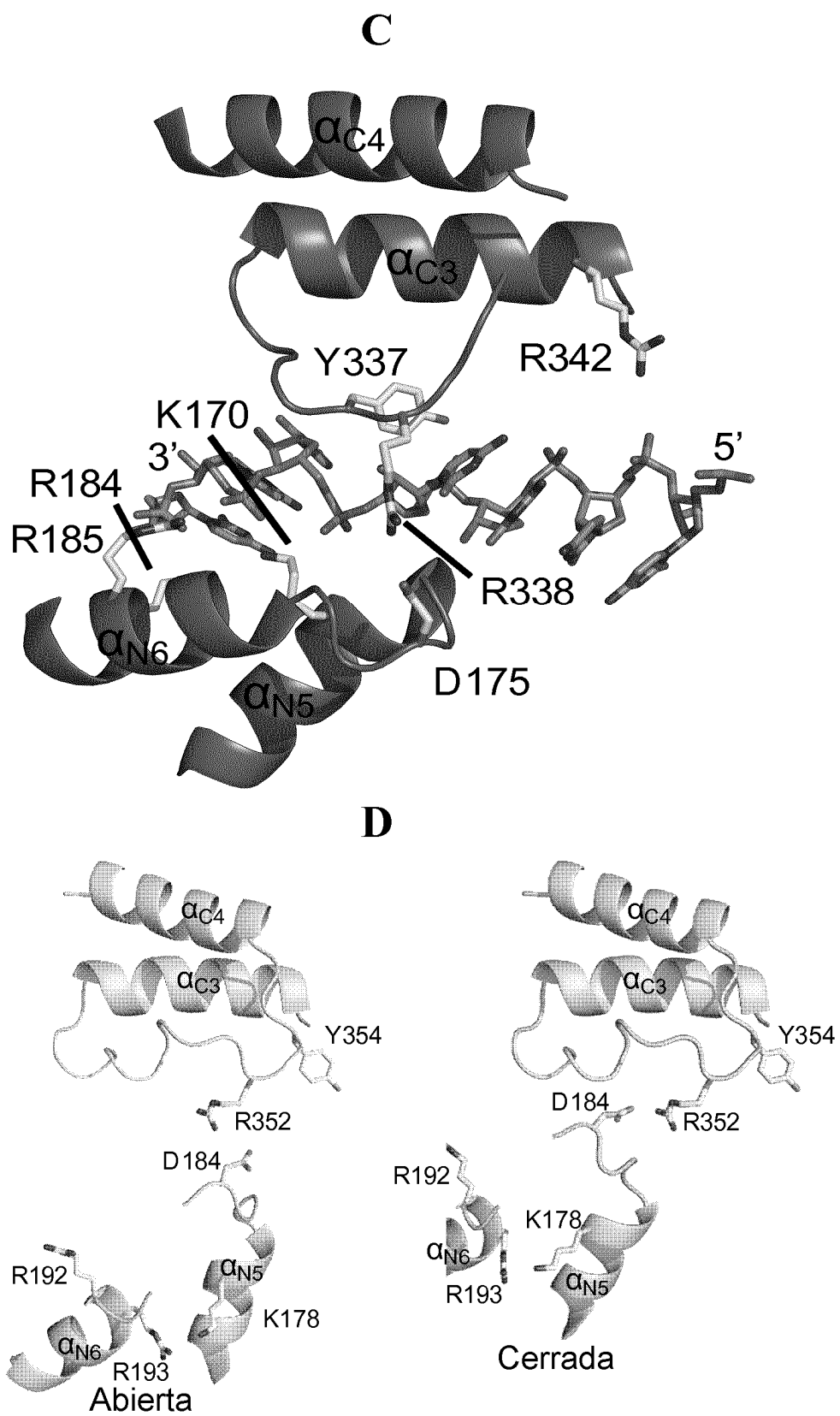
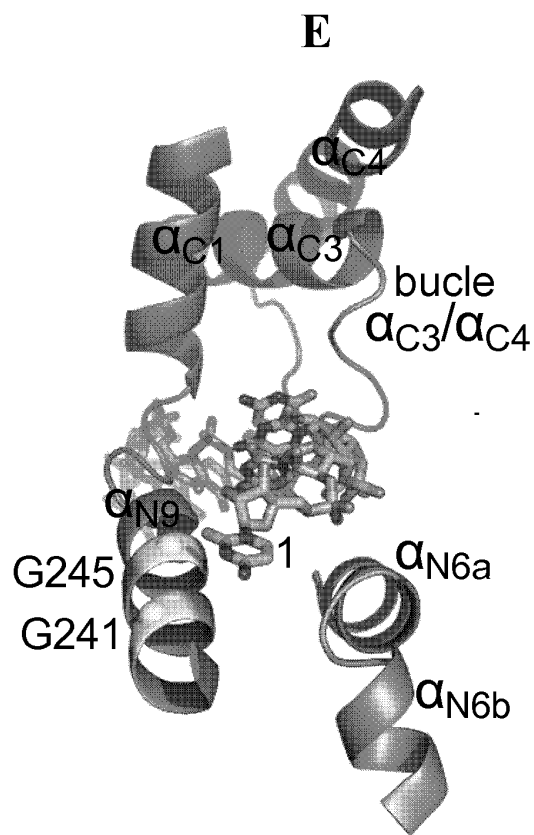


Figura 2 C y D



F

NiV	189	SETRRWAKYVQQKRVNP	205
MeV	191	SELRRWIKYTQQRrvvg	207
MuV	191	SADRRFAKYQQQGRLEA	207
NDV	189	SETRRINKYMQQGRVQK	205

Figura 2 E y F

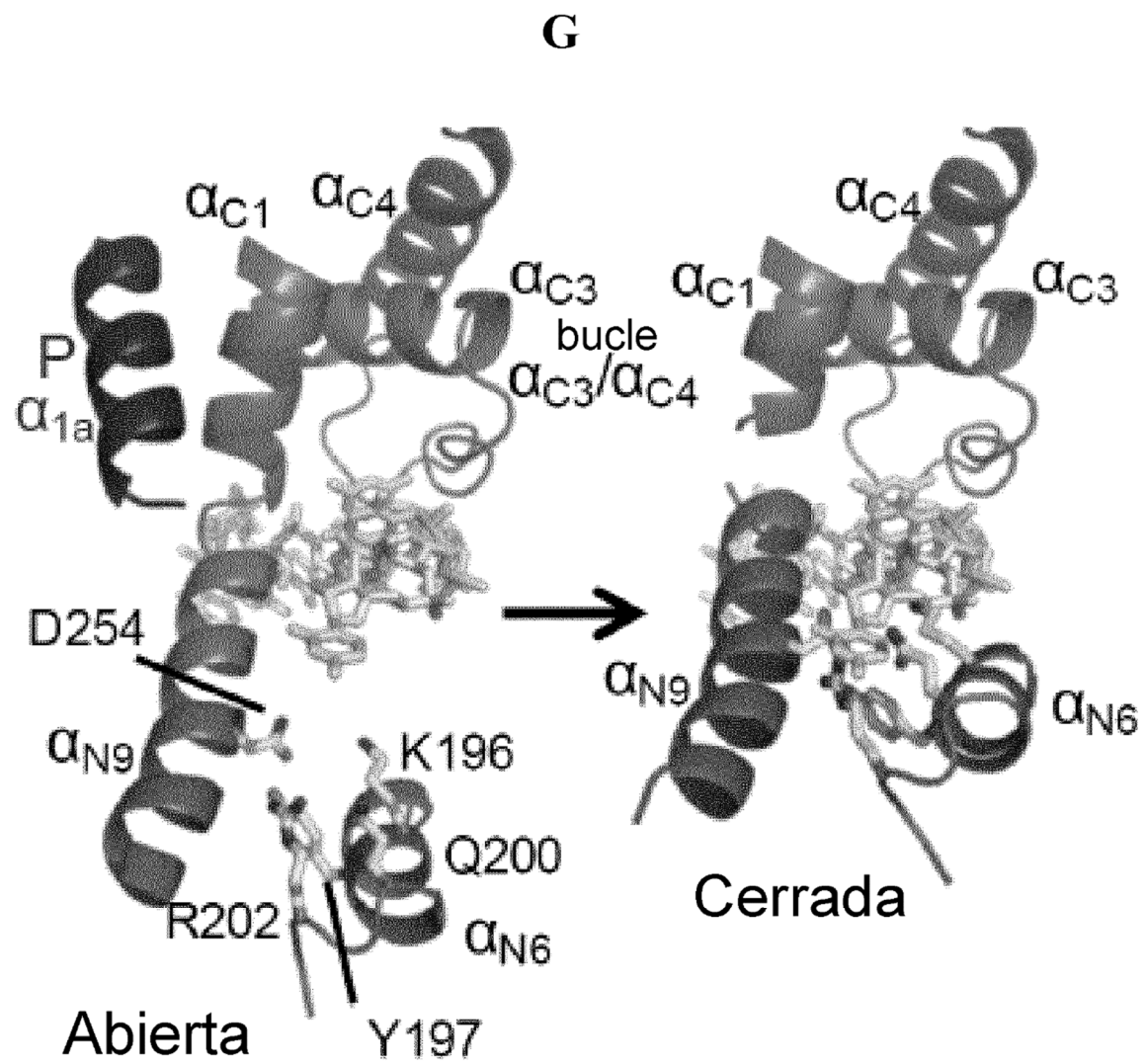
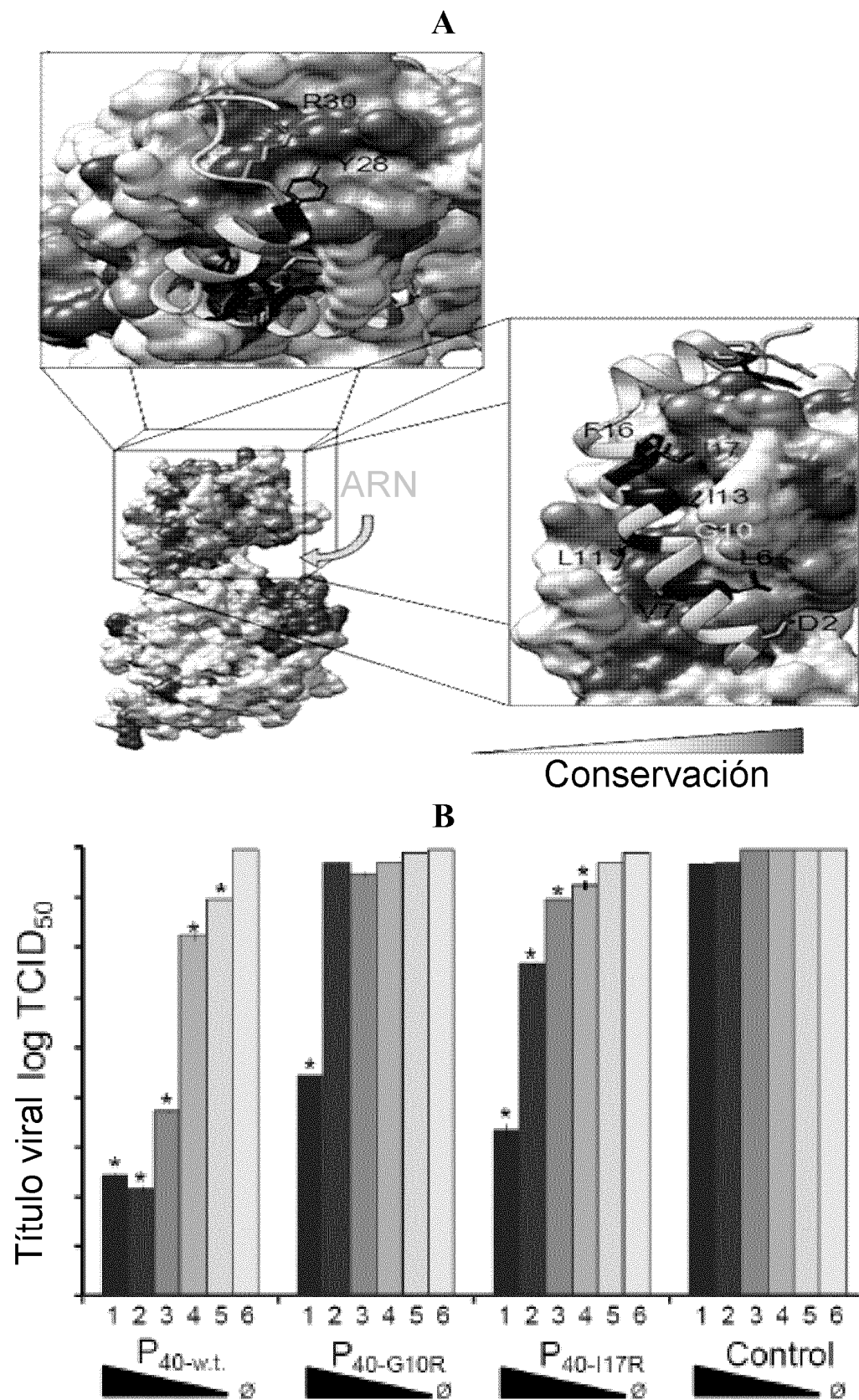


Figura 2 G



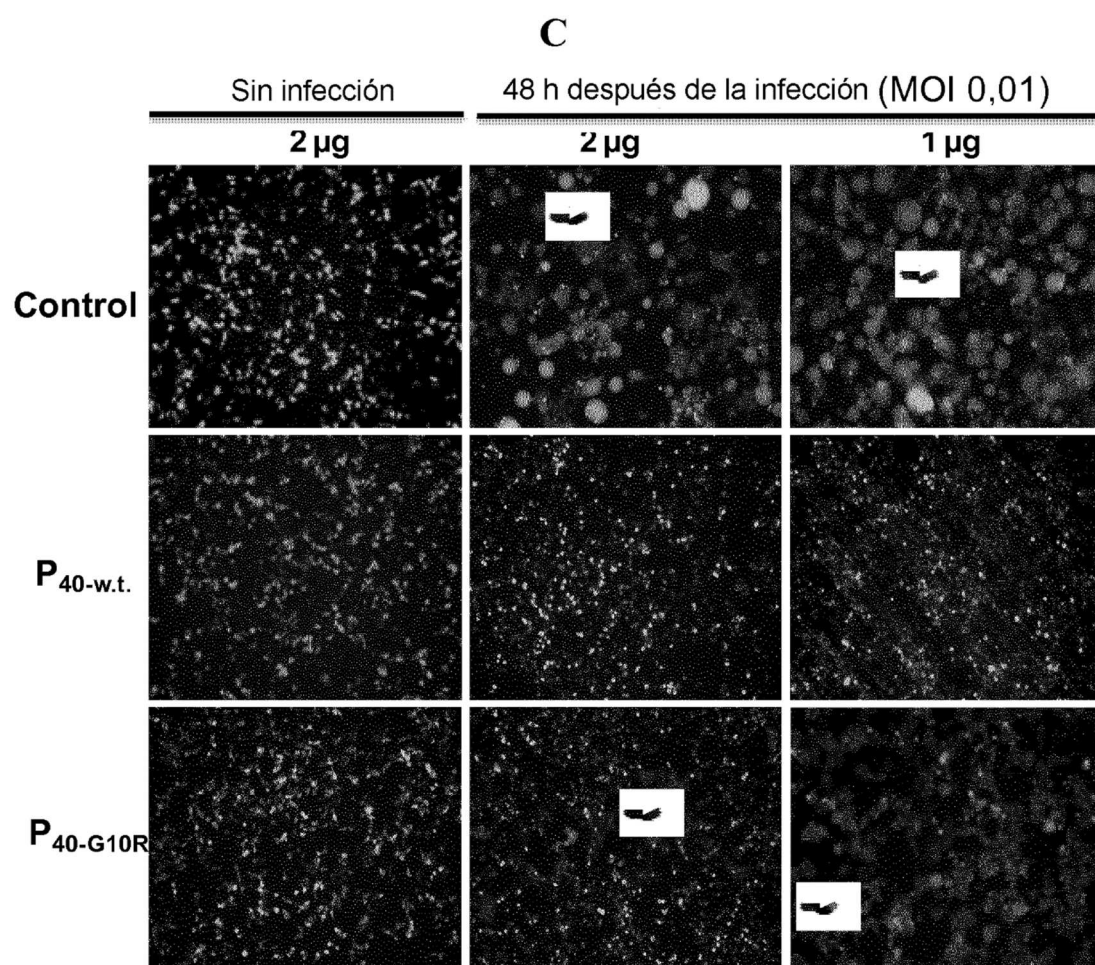


Figura 3 C

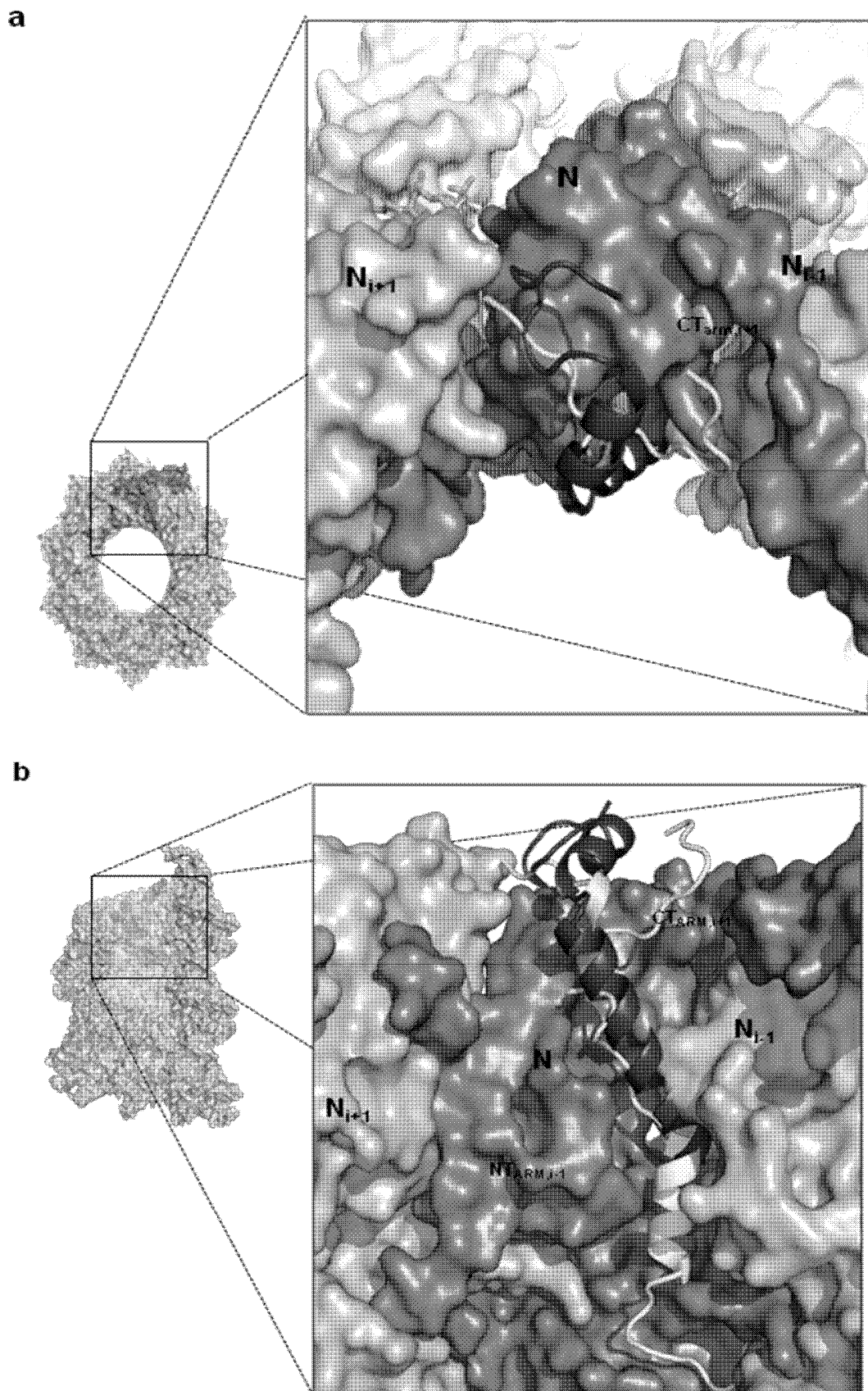


Figura 4 A y B

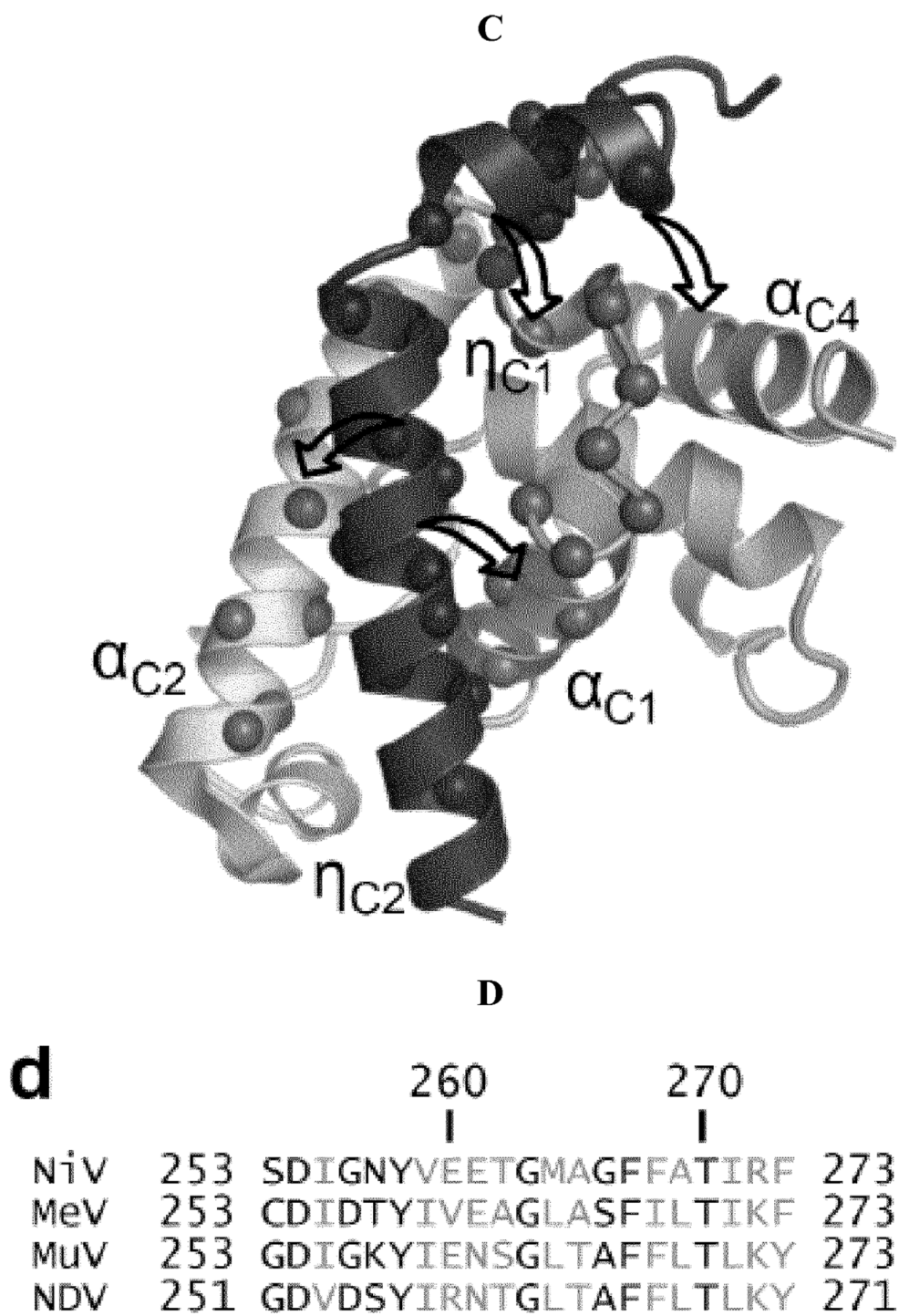


Figura 4 C y D

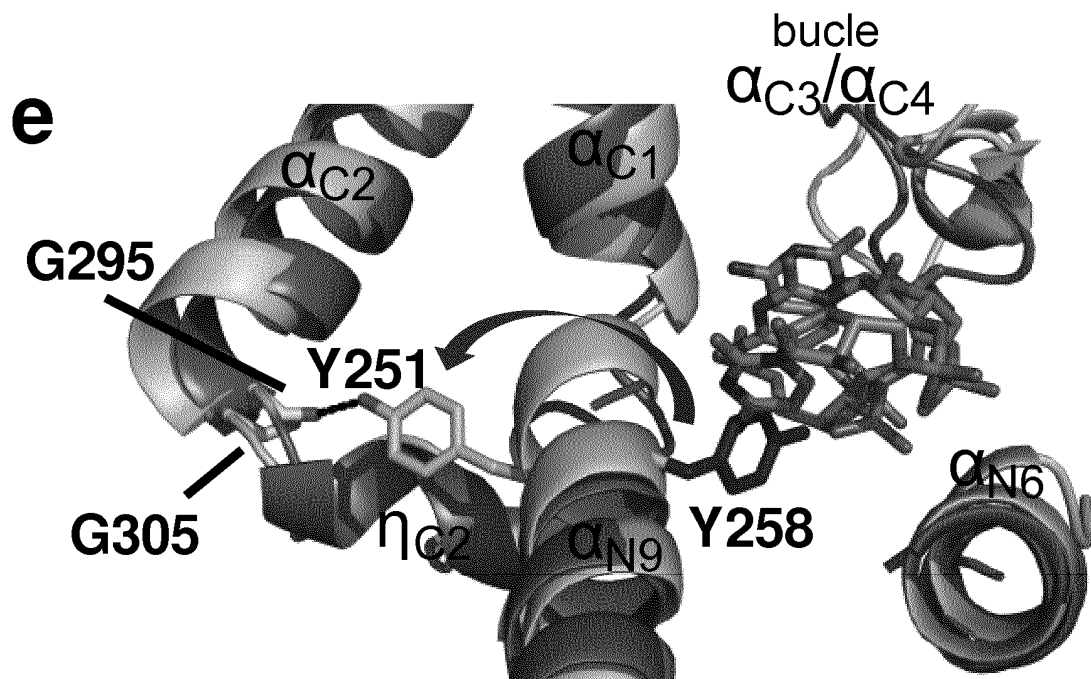


Figura 4 E

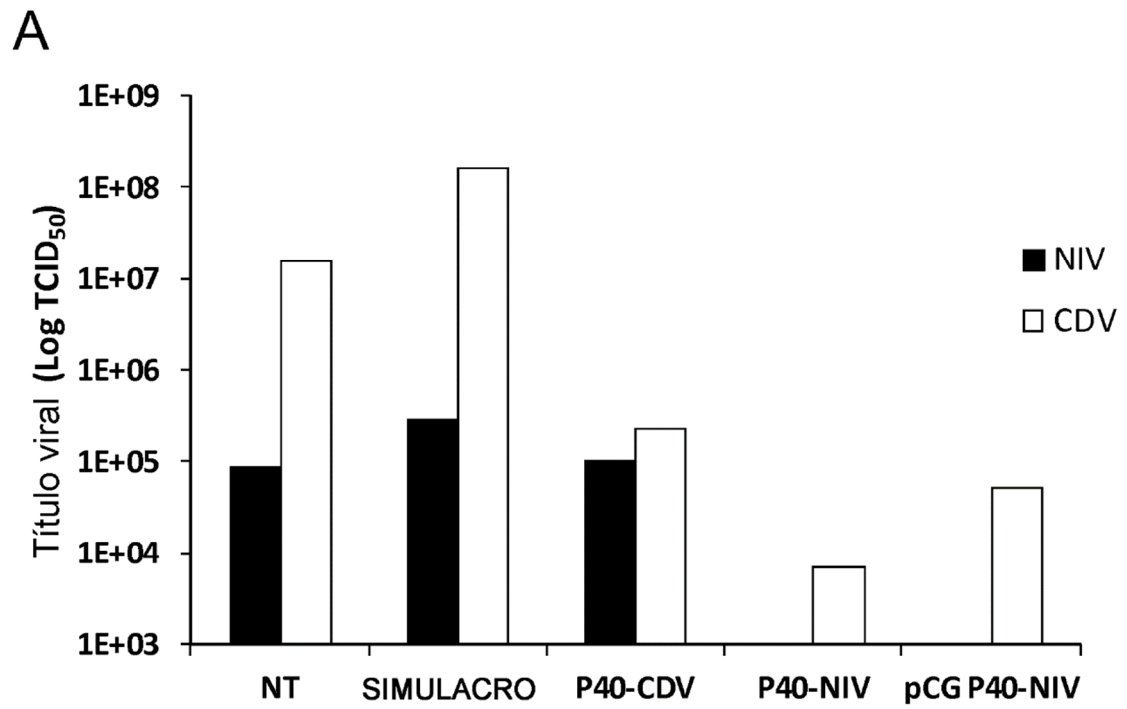


Figura 5 A

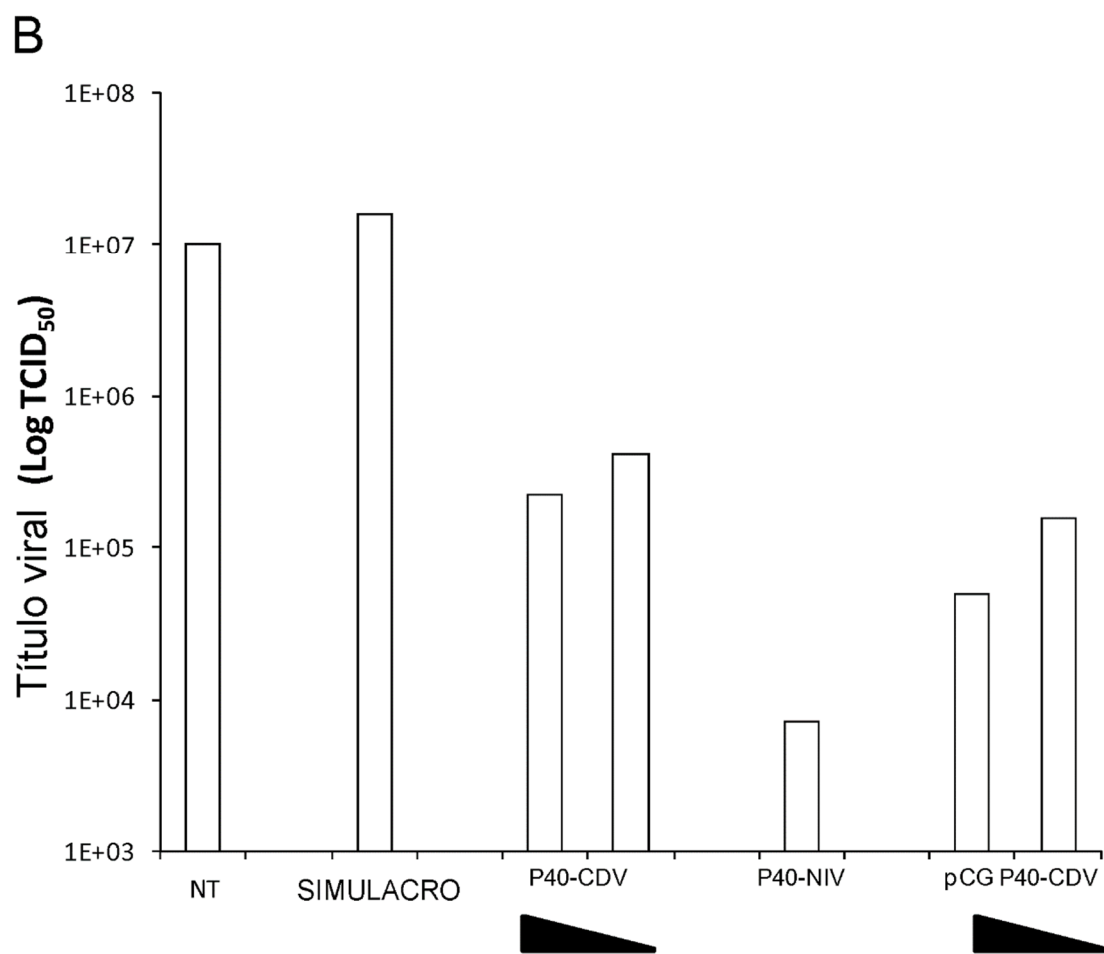


Figura 5 b