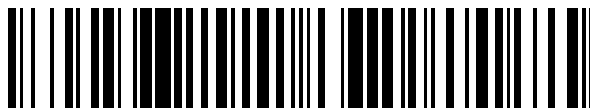


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 639**

21 Número de solicitud: 201230540

51 Int. Cl.:

C07K 14/065 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.04.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.11.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**ALCAMÍ PERTEJO, Antonio y
MARTÍN PONTEJO, Sergio**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **Unión a glicosaminoglicanos de proteínas con dominio SECRET codificadas por poxvirus**

57 Resumen:

La presente invención hace referencia al uso de un dominio SECRET de proteínas con dominio SECRET codificadas por poxvirus (CrmB, CrmD, SCP-1, SCP-2 y SCP-3), sus homólogos funcionales, derivados o fragmentos, capaces de unirse a glicosaminoglicanos (GAGs) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias, caracterizado porque dicho dominio SECRET se selecciona de entre una de las siguientes secuencias: SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 26, y SEQ ID N° 28. La presente invención también protege el uso de dicho medicamento para incrementar la estabilidad y/o las propiedades inmunomoduladoras de una proteína seleccionada entre: CrmB, CrmD, SCP-1, SCP-2 y SCP-3, así como su fusión a un vTNFR, o a un anticuerpo humanizado anti-TNF.

ES 2 429 639 A1

UNIÓN A GLICOSAMINOGLICANOS DE PROTEÍNAS CON DOMINIO SECRET CODIFICADAS POR POXVIRUS.

DESCRIPCIÓN

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

Esta invención se refiere a la capacidad de unir glicosaminoglicanos (GAGs) del dominio de unión a quimioquinas SECRET (smallpox virus-encoded chemokine receptor) presente en los receptores del factor necrosante de tumores (TNFRs) denominados cytokine response modifier B y D (Crmb y CrmD) y en las proteínas denominadas SECRET-containing proteins 1, 2 y 3 (SCP-1, SCP-2 y SCP-3) codificadas por poxvirus, y por homólogos, derivados o fragmentos de estos, para incrementar las propiedades inmunomoduladoras de las proteínas con dominio SECRET. También se refiere a polipéptidos de fusión, composiciones farmacológicas y a ensayos que utilicen las proteínas de la invención.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las citoquinas, como parte importante en la regulación de una respuesta anti-viral efectiva, constituyen la forma de comunicación entre los componentes celulares encargados de acabar con la infección. La convivencia con el hospedador a lo largo de años de evolución ha permitido a los poxvirus captar genes de sus hospedadores para adaptarlos en su propio beneficio. Así, estos virus son capaces de expresar versiones virales solubles de receptores (viroceptores) o de citoquinas (viroquinas) con el fin de manipular la regulación de la respuesta anti-viral para garantizar su expansión en el organismo. Al mismo tiempo, los poxvirus expresan proteínas sin similitud de secuencia con algún componente celular conocido pero con funciones específicas de unión e inhibición de citoquinas (Alcami, 2003).

20

25

El factor de necrosis tumoral α (TNF α) se activa poco después de que un virus infecte a su hospedador para poner en marcha la respuesta mediante la inducción de quimioquinas (CKs), moléculas de adhesión y otras citoquinas y regulando o tomando parte en los mecanismos efectores de las células del sistema inmunológico para eliminar las células infectadas lo antes posible. Es una molécula esencial para el establecimiento de una respuesta celular, o Th1, efectiva frente a una infección viral y, por ello, los poxvirus han adoptado elegantes estrategias para bloquear esta citoquina (Cunnion, 1999).

30

La expresión de homólogos solubles de los receptores celulares del TNF α (vTNFRs), es una de estas estrategias virales. Hasta la fecha se han descrito cuatro vTNFRs diferentes, los modificadores de la respuesta de citoquinas B (Crmb), CrmC, CrmD y CrmE. Las distintas especies de poxvirus expresan de manera diferencial estos vTNFRs. Crmb y CrmD, a diferencia de CrmC y CrmE, contienen un dominio C-terminal que inhibe la actividad in vitro de algunas CKs. Este dominio fue descrito por primera vez en nuestro laboratorio y se denominó SECRET por *smallpox virus encoded chemokine receptor*. Así, Crmb y CrmD poseen una doble actividad, anti-TNF α y anti-CKs. Además, el dominio SECRET forma parte también de 3 proteínas secretadas codificadas por poxvirus, denominadas *SECRET domain-containing proteins* 1, 2 y 3 (SCP-1, SCP-2 y SCP-3) (Alejo y cols. 2006). Los genes que codifican los dominios SECRET se encuentran en el virus vaccinia (VACV), virus ectromelia (ECTV), virus cowpox (CPXV) o virus de la viruela (VARV).

35

40

En la clínica existen receptores solubles del factor necrosante de tumores (TNF) y anticuerpos monoclonales humanizados anti-TNF para el tratamiento de alteraciones inflamatorias.

45

La patente ES 2315037 describe el uso del dominio C-terminal (CTD) de los receptores del factor necrosante de tumores (TNFR) codificados por poxvirus y denominados "cytokine response modifier B y D" (Crmb y CrmD), y por homólogos, derivados o fragmentos de estos para modular la actividad de las quimioquinas y para incrementar las propiedades inmunomoduladoras de los TNFRs. También se refiere a polipéptidos de fusión, composiciones farmacológicas y a ensayos que utilicen las proteínas de la invención. Esta invención protege el uso de un nuevo dominio de unión a quimioquinas (denominado SECRET), presente en poxvirus, para aumentar la capacidad anti-inflamatoria de los TNFRs que se utilizan en la clínica como medicamento anti-inflamatorio.

50

55

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos unidos a un núcleo proteico con un alto grado de sulfatación y carga. Se encuentran en la superficie celular y en la matriz extracelular y participan en importantes procesos biológicos como son la proliferación celular, morfogénesis, migración, patogénesis viral y unión de factores de crecimiento y citoquinas (Handel y cols., 2005). Por ejemplo, la unión de CKs a los GAGs es fundamental en la formación de gradientes quimiotácticos que guían la migración linfocitaria (Proudfoot y cols., 2003).

60

Algunas proteínas de modulación inmunológica de poxvirus, como el receptor soluble de interferón de VACV, B18 (Montanuy y cols., 2011), o el ortólogo de A41 en ECTV, E163 (Ruiz-Arguello y cols., 2008), son capaces de unirse a la superficie celular mediante la interacción con GAGs. De esta manera, consiguen aumentar su

65

concentración local entorno a los receptores de las citoquinas con las que interactúan. Al tratarse de una estrategia extendida entre las proteínas de modulación inmunológica de poxvirus, se ha estudiado la posible unión de CrmD a estos polisacáridos de superficie. A este respecto, se ha descubierto que CrmD, a través de su dominio SECRET, es capaz de interactuar con GAGs con alta afinidad y bloquear el efecto del TNF α en las superficies celulares.

El TNF α se encuentra detrás de la patogénesis de numerosos trastornos inflamatorios sufridos por millones de personas en todo el mundo. Enfermedades como la artritis reumatoide, psoriasis, vasculitis, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante o la enfermedad de Crohn están siendo tratadas mediante inhibidores del TNF α con cierto grado de éxito (Wong y cols., 2008).

Hoy en día existen cinco medicamentos aprobados para la clínica: Etanercept, adalimumab, infliximab, certolizumab y golimumab (Tak y Kalden, 2011). Todos, excepto etanercept, consisten en la aplicación de anticuerpos anti-TNF α de distinta naturaleza. Etanercept es una versión soluble de un dímero del TNFR2 fusionado a una porción Fc de una IgG humana. Etanercept, adalimumab y infliximab son los tratamientos más extendidos entre la población mundial con 500.000, 370.000 y 1.136.000 pacientes respectivamente (Tak y Kalden, 2011).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención demuestra que el dominio SECRET, además de inhibir quimioquinas, se une a la superficie celular a través de glicosaminoglicanos (GAGs). De esta manera, gracias a este dominio SECRET los TNFRs virales pueden incrementar su concentración local en torno a los receptores celulares de sus ligandos y así llevar a cabo sus funciones inhibitorias de manera más eficaz.

Los TNFRs solubles utilizados en clínica, para mejorar su estabilidad, están fusionados a una porción Fc de inmunoglobulinas humanas, de lo que sin embargo se pueden derivar efectos secundarios adversos como resultado de la activación del sistema del complemento. Esta fusión a la porción Fc permite el transporte de los TNFRs por el torrente sanguíneo unidos a los receptores celulares de regiones Fc. La fusión del dominio SECRET a estos TNFRs, llevaría a estos inhibidores del TNF a la superficie celular, donde verían aumentada su concentración local y estabilidad, pudiendo transportarse unidos a los GAGs de superficie pero sin activar el sistema del complemento.

La presente invención identifica una nueva propiedad del dominio SECRET no descrita en otras patentes relacionadas, para el desarrollo de terapias anti-TNF más eficaces y con menores efectos adversos. Esta propiedad de unirse a GAGs de superficie se podría incorporar a los TNFRs humanos utilizados en la clínica.

Esta nueva propiedad del dominio SECRET, hace que este dominio de receptores de TNF virales pueda ser fusionado a receptores solubles utilizados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias, como es el caso de los medicamentos anti-TNF, para llevar a estos inhibidores a la superficie celular. De esta manera se consigue un medicamento de mayor estabilidad y acción a nivel local.

La presente invención se refiere a la capacidad de unión a GAGs del dominio SECRET de los vTNFRs CrmB o CrmD y SCPs (SCP-1, SCP-2 y SCP-3), incluyendo homólogos funcionales, derivados y fragmentos de todos ellos para incrementar la estabilidad y las propiedades inmunomoduladoras de estas proteínas.

La presente invención se refiere también a la capacidad de unión a GAGs del dominio SECRET de los vTNFRs CrmB o CrmD y SCPs (SCP-1, SCP-2 y SCP-3), incluyendo homólogos funcionales, derivados y fragmentos de todos ellos para incrementar la estabilidad y las propiedades inmunomoduladoras de vTNFRs fusionados a ellos.

La presente invención también tiene como objeto de protección un polipéptido de fusión que comprende un dominio SECRET o homólogo del dominio SECRET descrito en la presente invención, donde dicho dominio SECRET u homólogo está fusionado a una secuencia polipeptídica del mismo o de diferente origen.

La presente invención también tiene como objeto de protección un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para el dominio SECRET o para un homólogo del dominio SECRET, descrita en la presente invención, o para un polipéptido de fusión descrito en la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es un vector viral o plásmido de expresión que comprende un polinucleótido descrito en la presente invención.

La presente invención también hace referencia a una composición farmacéutica que comprende el dominio SECRET y/o un homólogo del dominio SECRET descrito en la presente invención y/o un polipéptido de fusión descrito en la presente invención y/o un cassette de expresión y/o un vector viral descrito en la presente invención para su uso en el aumento de la actividad inmunomoduladora mediante unión a GAGs *in vivo*.

Por último, la presente invención tiene como objeto de protección el uso de la capacidad de unión a GAGs del dominio SECRET y/o un homólogo del dominio SECRET tal y como se describe en la presente invención y/o un polipéptido de fusión tal y como se describe en la presente invención y/o un cassette de expresión y/o un vector viral tal y como se describe en la presente invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades anti-inflamatorias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los poxvirus codifican receptores solubles que inhiben las funciones proinflamatorias del factor necrosante de tumores (vTNFRs). Algunos de estos vTNFRs como CrmB o CrmD, presentan además un dominio denominado SECRET capaz de inhibir la función quimiotáctica de algunas quimioquinas. La capacidad del dominio SECRET de aumentar la capacidad anti-inflamatoria de los TNFRs humanos está protegida por una patente anterior de nuestro laboratorio, un aspecto que estamos explorando a través de un proyecto TRACE del MICINN y cuya patente está siendo financiada por la empresa Genetrix.

En la presente invención, mediante experimentos de unión a heparina y ensayos de citometría de unión a distintos tipos celulares hemos observado que CrmB y CrmD son capaces de interactuar con los glicosaminoglicanos (GAGs) de superficie mediante su dominio SECRET ya que otros vTNFRs como CrmE y CrmC, carentes de este dominio, no lo hacen. Sin embargo, cuando fusionamos el dominio SECRET a CrmC conseguimos una proteína que se une de manera eficaz a la superficie de las células. Hemos comprobado también, mediante ensayos de citotoxicidad, que CrmD es capaz de unir y bloquear TNF mientras permanece unido a la superficie de las células. Por otra parte, aunque en la secuencia del dominio SECRET, no existe un motivo de unión a GAGs evidente, hemos definido experimentalmente algunos de los aminoácidos implicados en la interacción.

Esta capacidad de unirse a GAGs no es única de estos vTNFRs entre las moléculas con funciones de modulación inmunológica de poxvirus. De hecho, el receptor soluble viral de interferón B18 o el inhibidor de quimioquinas A41L también son capaces de unirse a estas moléculas, con lo que puede tratarse de una característica importante a la hora de bloquear agentes proinflamatorios.

Significativamente, debido a que en la secuencia de aminoácidos del dominio SECRET no se pueden predecir sitios de unión a GAGs utilizando herramientas informáticas disponibles, esta propiedad no se puede predecir.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a la capacidad de unión a GAGs del dominio SECRET de CrmB descrita anteriormente, donde el dominio SECRET de CrmB comprende la SEQ ID N° 26 o SEQ ID N° 28.

Otra realización de la presente invención hace referencia a la capacidad de unión a GAGs del dominio SECRET de CrmD descrita anteriormente, donde el dominio SECRET de CrmD comprende la SEQ ID N° 22 o SEQ ID N° 24.

Otra realización particular de la presente invención hace referencia a la capacidad de unión a GAGs del dominio SECRET de SCPs: SCP-1, SCP-2 o SCP-3 descrita anteriormente, donde los dominios SECRET comprenden cualquiera de las secuencias: SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 18 o SEQ ID N° 20.

Otra realización particular de la presente invención hace referencia a la capacidad de unión a GAGs de homólogos del dominio SECRET descrita anteriormente, que tengan al menos un 80% de homología de secuencia de aminoácidos.

Otro objeto preferente de la presente invención hace referencia a un polipéptido de fusión descrito anteriormente, donde el polipéptido de fusión consiste en el dominio SECRET de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, fusionado al dominio N-terminal de unión a TNF de los vTNFRs. Preferentemente, se hace referencia también al polipéptido de fusión descrito anteriormente, donde las proteínas de unión a TNF (TNFR) sean de origen humano.

Otro objeto preferente de la presente invención es una composición farmacéutica descrita anteriormente, para su uso como anti-inflamatorio. Preferentemente, la presente invención también hace referencia a dicha composición farmacéutica descrita anteriormente, donde dicha composición farmacéutica comprende además un inmunosupresor o una sustancia anti-inflamatoria adicional.

Otro objeto preferente de la presente invención es el uso del dominio SECRET y/o un homólogo del dominio SECRET. Otro objeto preferente de la presente invención es una para la obtención de anticuerpos específicos inhibidores de la capacidad de unión a GAGs del dominio SECRET. Preferentemente, la presente invención también hace referencia a dicho uso de los anticuerpos descritos anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de los efectos adversos causados por la vacunación con el virus vaccinia

o de la patología causada por el virus de la viruela.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. CrmD se une a GAGs con alta afinidad. A) Cinética mediante SPR de la unión de CrmD a un *chip* acoplado con 50 RUs de heparina. Se inyectaron distintas concentraciones de CrmD purificado (0-300nM) sobre un *chip* acoplado con 50 RUs de heparina a 30 μ l/min. Los sensorgramas se alinearon y ajustaron a un modelo global de Langmuir 1:1. Se presentan las constantes de asociación (K_a), disociación (K_d) y afinidad (KD), junto con los errores estándar (EE). B) Competición de la unión de CrmD a heparina mediante GAGs solubles. Se incubaron concentraciones crecientes de distintos GAGs solubles (0-1.000 μ g/ml), heparina (\bullet), CSA (\blacksquare), CSB (\blacktriangle) y HS (\times), con 50nM de CrmD durante 15 min a 4°C, antes de pasar las mezclas sobre el *chip* de heparina. Se recogió la respuesta máxima en el equilibrio y se representaron los datos en porcentaje en relación a la respuesta detectada en ausencia de GAGs solubles.

FIGURA 2. CrmD se une a heparina y a la superficie celular a través del dominio SECRET. A) Ensayo de unión a heparina mediante SPR. 300 nM de las proteínas purificadas CrmD, CrmD163 y CRD-CrmD, se inyectaron a 10 μ l/min sobre *chips* de heparina. Se muestran los sensorgramas obtenidos para cada construcción. Las flechas invertidas indican el inicio y el fin de la inyección. B) Ensayo de unión a la superficie de células MOLT4 y L929 mediante citometría. 200 nM de las proteínas purificadas, vCCI de CPXV, E163 de ECTV, B18 de VACV, y CrmD, CrmD163 y CRD-CrmD de ECTV se incubaron con 300.000 células en hielo durante 30 min. Tras sucesivos lavados, se detectó la proteína retenida en la superficie mediante un anticuerpo de ratón anti-His (1:400) seguido de un secundario apropiado conjugado con Alexa488 (1:500). Se muestra la señal fluorescente (FL1:anti-mouseAlexa488) respecto al total de eventos analizados en porcentaje en muestras incubadas sin (gris) o con (blanco) proteína recombinante.

FIGURA 3. CrmD y CrmD163 se unen a la superficie celular gracias a su interacción con GAGs. Se incubaron 300.000 células CHO-K1 (expresión normal de GAGs), CHO-745 (expresión reducida de GAGs) y CHO-618 (sin GAGs) con 200 nM de las proteínas CrmD, CrmD163 y CRD-CrmD durante 30 min a 4°C. Tras varios lavados, las células fueron incubadas con una dilución 1:400 del anticuerpo de ratón anti-His para marcar la proteína retenida y se detectó mediante un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa488 (1:500). Se recogieron 20.000 eventos de cada muestra que fueron analizadas por el programa informático FlowJo. El área bajo la curva indica la fluorescencia respecto al total de eventos analizados, en porcentaje, de células incubadas sin (gris) o con (blanco) proteína recombinante.

FIGURA 4. Los vTNFRs con dominio SECRET son capaces de unirse a la superficie celular. Se realizó un ensayo de unión a la superficie de células L929 de las proteínas purificadas, CrmB_VARV, CrmE_CPXV, CrmD_CPXV, CrmC_CPXV y una construcción CrmC-SECRET. Este ensayo se realizó tanto por citometría de flujo (A) como por inmunofluorescencia (B). A) Se muestra la fluorescencia (60x), respecto al total de eventos en porcentaje, en muestras incubadas con las distintas proteínas recombinantes indicadas (blanco) o sin proteína (gris). B) Los cubreobjetos sobre los que se sembraron células L929 fueron incubados con 100 nM de cada proteína durante 1 h a 4°C antes de la fijación con 4% PFA durante 30 min a RT. Se utilizaron los mismos anticuerpos que para la citometría de flujo pero con una dilución 1:500 del anticuerpo anti-His y 1:900 para el secundario conjugado con Alexa488. Los cubreobjetos fueron montados y las muestras se analizaron mediante un microscopio Axioskop 2 Plus (Zeiss).

FIGURA 5. CrmD unido a GAGs puede interaccionar e inhibir el mTNF α . A) Ensayo mediante SPR en el que 100 nM de mTNF α se inyectaron a 10 μ l/min sobre un *chip* de heparina antes o después de pasar sobre el *chip* 500 nM de CrmD (azul) o B18 de VACV (verde), sin haber regenerado la superficie. Los triángulos invertidos indican el inicio y el fin de la inyección de proteína recombinante y el comienzo de la inyección de mTNF α . B) Experimento de precipitación con resina de agarosa-heparina (HepAg). 400 nM de CrmD, CRD-CrmD y B18 de VACV fueron incubados con una resina de heparina durante 1h. Tras los lavados, las resinas se incubaron con 400nM de mTNF α durante 30 min adicionales y se analizó la presencia de proteína recombinante y mTNF α mediante *western blot* C) Ensayo de citotoxicidad de mTNF α sobre células L929. Para la unión a células, las proteínas, hTNFR2, CRD-CrmD, CrmC CrmC-SECRET y CrmD (10 μ g/ml), se incubaron sobre 30.000 células L929 durante 30 minutos a 37°C. Esas mismas condiciones se repitieron para la incubación en solución de las proteínas con el mTNF α . Las mezclas se añadieron posteriormente sobre células L929. Las muestras se analizaron por triplicado y se muestran las medias y las desviaciones estándar de la supervivencia en porcentaje en relación a los valores recogidos en ausencia de mTNF α .

FIGURA 6. Expresión de los mutantes GAG1-4 y ensayos unión a células. A) Gel teñido con azul de Coomassie que muestra ~500 ng de cada uno de los mutantes GAG1-4 expresados mediante baculovirus

recombinantes y purificados por cromatografía de afinidad Ni-NTA. B) Ensayo de unión a la superficie de células CHO-K1 mediante citometría de flujo. Se incubaron 200 nM de cada uno de los mutantes (GAG1:rojo, GAG2:morado, GAG3:azul, GAG4:verde) y de CrmD (negro) con 300.000 células. Se recogieron 10.000 eventos mediante un citómetro FACS Cantoll y se analizaron con el programa informático FlowJo. Se muestra la fluorescencia de cada muestra respecto al total de eventos analizados en porcentaje. La curva en gris marca la señal de fluorescencia de células incubadas en ausencia de proteína.

FIGURA 7. Las mutantes GAG1-4 inhiben la migración eficientemente. Experimento de quimiotaxis en *transwell* con células MOLT4. Se preincubaron cantidades crecientes de los mutantes GAG1-4 y CrmD con 70 nM de mCCL25. Se muestra la migración media, junto con su desviación estándar, de cada una de las muestras analizadas por triplicado, en porcentaje respecto a la migración en ausencia de proteína recombinante. Para normalizar se utilizaron los datos tomados en ausencia de CK.

FIGURA 8. Alineamientos de Secuencias - CLUSTAL W (1.82) "multiple sequence alignment"

FIGURA 9. Alineamientos de Secuencias - CLUSTAL W (1.82) "multiple sequence alignment (CrmB / CrmD)"

FIGURA 10. Alineamientos de Secuencias - CLUSTAL W (1.82) "multiple sequence alignment (CTDs)"

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1:

Materiales y métodos

Líneas celulares

La generación, amplificación y titulación de los stocks de baculovirus recombinantes se realizaron en células de insecto *Spodoptera frugiperda* Sf9 adherentes mantenidas en cultivo en medio TC100 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS, Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma) y antibióticos, 100 µg/ml de una mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina (Sigma) y 25 µg/ml de gentamicina (Sigma). La expresión de proteína recombinante se hizo en células de insecto Hi5 en suspensión, mantenidas en medio Express Five (Gibco) con 8 mM de L-glutamina y antibióticos. Ambas líneas celulares se cultivaron a 27°C.

Las líneas celulares, L929 (fibroblastos de ratón) se mantuvieron en cultivo a 37°C, 95% HR y 5% CO₂ en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% FCS, 2 mM de L-glutamina y antibióticos. Estas células se utilizaron para los experimentos de citotoxicidad del TNF α .

Las células MOLT4 usadas en los ensayos de quimiotaxis, se crecieron en medio RPMI 1640 (MP Biomedicals) suplementado con 10% FCS, 2 mM de L-glutamina y antibióticos, a 37°C, 95% HR y 5% CO₂.

Para los ensayos relacionados con el análisis de la unión de las proteínas a superficies celulares, se utilizaron las líneas derivadas de ovario de hámster, CHO-K1 y sus mutantes para la expresión de GAGs en superficie, CHO-618 (mutación en la enzima galactosiltransferasa) y CHO-745 (mutación en la enzima xilosiltransferasa). Estas líneas se crecieron en medio DMEM: F12-HAM (Gibco), 1:1 (v/v), debidamente suplementado con 10% de FCS, 2 mM de L-glutamina y antibióticos, a 37°C, 95% HR y 5% CO₂.

Clonajes

El gen E6 de ECTV Naval que codifica para la proteína CrmD (1-320), se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del vector pMS1 utilizando los oligonucleótidos 5'Crmd34 y 3'Crmd33 incorporando las dianas de BamHI y XhoI en 5' y 3', respectivamente. Así, se subclonó sin su péptido señal (21-320) en el vector pFastBac1, previamente digerido con BamHI y XhoI, de forma que el gen quedó en fase de lectura con el péptido señal de la melitina en 5' y con los tags V5 y 6xHis en 3' para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad. El plásmido resultante de la ligación se nombró pSP3. La misma estrategia se siguió para el clonaje en este vector del dominio SECRET de CrmD, CrmD163 (CrmD163-320) utilizando los oligonucleótidos 5'Crmd36 y el 3'Crmd33, generándose así el plásmido pSP4.

Igualmente, para el clonaje de la forma corta del dominio N-terminal de CrmD, CRD-CrmD (CrmD21-151), en el vector pFastBac1, se utilizaron los oligonucleótidos Crmd34 y Crmd87 para extraer el gen por PCR del

molde pMS1. Tras la ligación del producto de PCR en el vector digerido con BamHI y XhoI se obtuvo el plásmido pSP6.

Un procedimiento similar se siguió para clonar en el vector pFastBac1 los otros vTNFRs, CrmE de CPXV cepa Elephantpox, CrmC de CPXV cepa Brighton Red y CrmB de VARV cepa Bangladesh 1975. Los genes correspondientes se amplificaron por PCR a partir de construcciones preexistentes en el laboratorio, mediante una pareja de oligonucleótidos (Tabla 1) que añadiesen la diana BamHI en 5' y XhoI en 3' para posteriormente clonarlos en el pFastBac1 de la misma manera que lo anteriormente explicado. Las construcciones resultantes se denominaron pSP8, pSP9 y pSP12, respectivamente.

La construcción pSP24, para la expresión mediante baculovirus de una proteína CrmC fusionada al dominio SECRET de CrmD, se generó extrayendo por PCR el gen correspondiente del plásmido pSP22, que contenía esta fusión clonada en el vector pMS30. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos 5' CrmC-Sp BamHI y CrmD33 y pSP22 como molde. Seguidamente, se subclonó el producto de PCR en el vector pFastBac1 en las dianas BamHI y XhoI. Todos los oligonucleótidos utilizados para las construcciones anteriores se listan en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados para la generación de las distintas construcciones. Se indica el nombre y secuencia (5' a 3') de los distintos oligonucleótidos utilizados. Se señala también la construcción final y la proteína que se expresó con cada plásmido. En la secuencia se subraya los sitios de restricción XhoI (CTCGAG) o BamHI (GGATCC) que se incorporaron para el clonaje.

oligonucleótido	secuencia	construcción	proteína
CrmD33	GCG <u>CTCGAG</u> GCATCTCTTTTCCACAATCATTTGG	pSP3	CrmD ECTV
CrmD34	GCG <u>GGATCC</u> GATGTTCCGTATACACCCATTAATGGG	pSP3	CrmD
CrmD36	GCG <u>GGATCC</u> TTTAACAGCATAGATGTAGAAATTAATATGTATCC	pSP4	CrmD163
CrmD87	GCG <u>CTCGAG</u> GCACATATTACATCTCCTTTAGATG	pSP6	CRD-CrmD
5' CrmE-SP_BamHI	GGC <u>GGATCC</u> ATGAAATGTGAACAAGGTGTCTC	pSP8	CrmE CPXV
3' CrmE-SP_XhoI	GGC <u>CTCGAG</u> GCTCTTGTTCATTGGTTTACATTGATCAG	pSP8	CrmE CPXV
5' CrmC-Sp BamHI	CCC <u>GGATCC</u> GATATACCTACTTCGTCACTGCC	pSP9	CrmC CPXV
3' CrmC-Sp XhoI	GCG <u>CTCGAG</u> GCATTACATTTAGATAGTTTGCATGG	pSP9	CrmC CPXV
5' CrmB VARV-Sp BamHI	GCG <u>GGATCC</u> GCACCGTATACACCACCCAATGG	pSP12	CrmB VARV
3' CrmB VARV-Sp XhoI	GCG <u>CTCGAG</u> GCTAAAAAGCGGGTGGGTTTGG	pSP12	CrmB VARV

Los mutantes puntuales de CrmD se realizaron utilizando el kit Quik Change Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Este kit permite realizar mutaciones dirigidas siguiendo un protocolo sencillo. Brevemente, tomando como molde el vector pSP3 (CrmD en pFastBac1) en el que se encuentra clonado el gen diana, se realizó una PCR con dos oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación deseada. De esta manera se copió todo el vector incorporando la mutación. A continuación, se digirió con la enzima DpnI el DNA original que, por encontrarse metilado, es susceptible a la digestión y se transformaron bacterias ultracompetentes XL1Gold. Finalmente, se comprobó la incorporación de la mutación por secuenciación del DNA extraído de colonias individuales. En la Tabla 2 se muestra la lista de oligonucleótidos utilizados para la generación de los mutantes puntuales de CrmD para la unión a GAGs.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis de CrmD. Se indican el nombre de la proteína mutante, la mutación incorporada, el nombre del oligonucleótido y la secuencia (5' a 3') con los residuos que difieren de la secuencia original resaltados en rojo.

proteína	mutación	oligonucleótido	secuencia
GAG1	K245A	CrmD97	GCAGTCAAGATTAATCTAGAATC GCATGTAATCTGGAAAGAGAATCTAGA
GAG1	K245A	CrmD98	TCTAGATTCTCTCCAGAATTACAT GCGATTCTAGATTAATCTTGCCTGCTC
GAG2	R250A/R253A	CrmD99	AGATTAATCTAGAAATCAAATGTAATCTTGGG GCAGAATCT GCACAACCTAACCCACGACGAAG
GAG2	R250A/R253A	CrmD100	CTTCGTCGTGGGTGTTAGTTGTGCAGATTCTGCTCCAGAATTACATTTGATTTCTAGATTAATCT
GAG3	K177A	CrmD101	GTAGAAATTAATATGTATCCTGTAAAC GCGACCTCTGTAAATTCGAGTATAGGAAG
GAG3	K177A	CrmD102	CTTCCTATACTCGAATTACAAGAGGTC GCGTTAACAGGATACATATTAATTTCTAC
GAG4	K218A	CrmD103	TCTTTATTGGAGATTACTATTTCAGTCGTTGAT GCACCTAGCAACTTCAGGTTT
GAG4	K218A	CrmD104	AAACCTGAAGTTGCTAGTGCATCAACGACTGAATAGTAATCTCCAATAAGA

Generación de baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes se generaron utilizando el sistema de expresión Bac-to-Bac (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los genes clonados en el vector pFastBac1 se pueden integrar en bácmidos del genoma del baculovirus bajo la actividad del promotor de la polihedrina mediante la transformación de células DH10bac competentes tras un proceso de transposición. El DNA de los bácmidos recombinantes así obtenidos, se purificó y se transfirió con cellfectine (Invitrogen) en células de insecto Sf9 siguiendo las instrucciones del fabricante. Los baculovirus recombinantes se recogieron a las 72 h post-transfección de los sobrenadantes de las células transfectadas. Estos virus se denominaron P0 (pase 0)

y se guardaron a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, estos P0 se titularon y se amplificaron en un solo paso mediante la infección de células Sf9 a muy baja multiplicidad de infección (moi = 0,01-0,05 unidad formadora de placa (ufp)/cel) con el fin de generar un stock de baculovirus recombinante de alto título (superior a 5 x 10⁷ ufp/ml) para la expresión de proteína recombinante.

5 *Expresión y purificación de proteínas recombinantes*

Se infectaron células de insecto Hi5 a alta moi (moi = 2-5 ufp/cel) con los baculovirus recombinantes correspondientes. A las 72 h postinfección se recogieron los sobrenadantes de la infección (100 ml) y se clarificaron mediante dos centrifugaciones sucesivas durante 5 min a 1.200 rpm y 40 min a 6000 rpm, respectivamente. Posteriormente, se concentraron utilizando el sistema Stirred Ultrafiltration Cell 8200 (Amicon) hasta obtener un volumen final de 2,5 ml empleando membranas YM (Millipore) de un tamaño de diámetro de poro para un peso molecular límite (MWCO) de 10.000 Da. Los sobrenadantes así concentrados, se filtraron con filtros de 0,22 µm y se dializaron en "tampón de unión" (50 mM fosfato sódico (pH 7,4), 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) empleando columnas de gel filtración PD10 (Amersham Biosciences).

La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel (resina Níquel-NTA, Qiagen). Para ello, los sobrenadantes concentrados y dializados se incubaron en "tampón de unión" durante 1 h a 4°C con 0,5 ml de resina por cada 100 ml de sobrenadante inicial. A continuación, la resina se montó en columna (Poly-Prep, Bio-Rad) y se lavó con 40 ml de "tampón de lavado" (50 mM fosfato sódico (pH 7,4), 300 mM NaCl, 20 mM imidazol) para eliminar proteínas unidas inespecíficamente. Tras ello, se procedió a eluir la proteína de interés mediante "tampón de elución" con concentraciones crecientes de imidazol (60, 100 y 250 mM) en 50 mM fosfato sódico (pH 7,4), 300 mM NaCl. La proteína se recogió en fracciones de 0,5 ml cada una y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie.

Posteriormente, se juntaron las fracciones con mayor grado de pureza y cantidad de proteína, se concentraron y se dializaron en PBS utilizando micro columnas Vivaspin 500 (Sartorius) con un MWCO de 10.000 Da. Finalmente, la concentración exacta de los stocks de proteína obtenidos se determinó mediante BCA (BCA protein assay kit, Pierce) y densitometría respecto a sendas calibraciones con BSA (Sigma).

30 *Resonancia de los plasmones de superficie*

Se generó un chip acoplado con heparina biotilada (Calbiochem). Se acoplaron 2.000 RUs de estreptavidina (Sigma), diluida en acetato pH 4,0 a 0,2 mg/ml, en un chip CM4 mediante el sistema de inmovilización covalente por aminas en las dos celdas del chip. Se bloquearon los sitios activos de la matriz con etanolamina 1 M pH 8,5 y seguidamente, se pasaron 5 µg/ml de heparina biotilada diluida en HBS-EP con 300 mM de NaCl por una de las dos celdas. La otra celda, en la que sólo se acopló estreptavidina, se utilizó como control de uniones inespecíficas. De esta manera, se consiguieron capturar 50 RUs de heparina de forma prácticamente irreversible debido a la altísima afinidad de la interacción estreptavidina-biotina (KD~10-14 M).

Para analizar la afinidad por la heparina, se pasaron distintas concentraciones de proteína recombinante purificada en tampón HBS-EP, regenerando posteriormente el chip con inyecciones de 1 min con 2 M MgCl₂. Los sensorgramas se normalizaron y ajustaron a un modelo de Langmuir 1:1 para determinar las constantes de afinidad mediante el paquete informático Bioevaluation 3.2.

Se evaluó la especificidad de la interacción CrmD-heparina mediante un ensayo de competición con GAGs solubles, heparina, heparan-sulfato (HS) y condroitin sulfato A (CSA) y B (CSB) (Sigma). Para ello, se preincubó la proteína CrmD (30 nM), diluida en HBS-EP, con cantidades crecientes de los distintos GAGs solubles, en hielo durante 15 min. La mezcla se pasó por el chip de heparina y se recogió la respuesta en el equilibrio para cada muestra. Se analizó el porcentaje del aumento de señal en cada muestra respecto al valor obtenido para la proteína CrmD en ausencia de GAGs solubles.

Citometría de flujo

Se analizó la unión de proteína recombinante a la superficie de las líneas celulares, L929, MOLT4 y mutantes de células CHO para la expresión de GAGs en superficie, CHO-K1, CHO-618 y CHO-745. Las células CHO-K1 tienen una expresión normal de GAGs en superficie, sin embargo, las células CHO-745 no sintetizan HS ni CS y las CHO-618 carecen absolutamente de cualquier tipo de GAGs en superficie (Zhang y cols., 2006). Se incubaron 300.000 células con 200 nM de proteína en 50 µl de PBS-staining (PBS suplementado con 1% FCS y 1% BSA) durante 30 min en hielo. Para detectar las proteínas en la superficie, se incubó durante 20 min con una dilución 1:400 en PBS-staining del anticuerpo de ratón monoclonal anti-PentaHis (Qiagen) seguida del marcaje con un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con Alexa488 (Invitrogen) a 1:500 en PBS-staining en oscuridad durante 20 min. Se recogieron 10.000 eventos en un citómetro FACSCantoll (BD Bioscience) y se analizaron en el programa informático FlowJo 7.2.2 (TreeStar).

Inmunofluorescencia

Se utilizaron células L929 sembradas en confluencia en cubreobjetos previamente lavados con etanol y expuestos a luz UV. Las células se incubaron con 150 μ l de 200 nM de la proteína recombinante en PBS-staining durante 30 min a 4°C y después se fijaron con 4% de PFA en PBS a temperatura ambiente (RT). Se lavaron los cubres tres veces y se procedió al bloqueo de los sitios inespecíficos incubando con PBS suplementado con 5% FCS durante 15 min a RT. Para detectar la proteína en superficie se utilizó una dilución 1:600 en PBS suplementado con 1% FCS del anticuerpo monoclonal de ratón anti-V5 (Invitrogen) seguido del marcaje con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa488 (Invitrogen) diluido 1:900 en PBS suplementado con 1% FCS. Para el montaje, se pasaron los cubres secuencialmente por PBS, agua y etanol y se colocaron sobre los portaobjetos con una gota de medio de montaje Prolong (Invitrogen). Las muestras se observaron y analizaron mediante un microscopio de fluorescencia Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara Coolsnap FX (Roper Scientific) controlada por el software MetaVue 5.07 (Molecular Devices).

15 *Precipitación con resina de heparina*

Las proteínas recombinantes utilizadas para este ensayo se incubaron en presencia o ausencia de TNF α , durante 1 h a RT en agitación rotatoria con 20 μ l de una resina de heparina acoplada a agarosa (50%, v/v) en 400 μ l de tampón de unión (PBS suplementado con 0,2% FCS). Tras ese tiempo se recuperaron las esferas de agarosa centrifugando 1 min a 13.000 rpm. Se decantaron los sobrenadantes y las esferas se lavaron con tampón de unión tres veces. La proteína unida se eluyó de la resina añadiendo 25 μ l de tampón de carga para SDS-PAGE e hirviendo la muestra durante 5 min. Las proteínas se detectaron mediante inmunoelectrotransferencia (Western blot) con los anticuerpos anti-PentaHis (1:2.000) (Qiagen) y anti-TNF α (1:1.000) (R&D Systems) y los secundarios conjugados con peroxidasa anti-ratón (1:5.000) (GE Healthcare) y anti-cabra (1:1.000) (R&D Systems), respectivamente.

Ensayos de citotoxicidad con TNF α

Para valorar la actividad *in vitro* de las distintas construcciones de CrmD, se llevaron a cabo experimentos de citotoxicidad en células L929, una línea de fibroblastos de ratón, siguiendo un protocolo puesto a punto en el laboratorio (Alejo y cols., 2006). Para ello, se incubó 6 pM de TNF α de ratón en ausencia o presencia de 10 μ g/ml de proteína recombinante. Tras 1 h de incubación a 37°C en DMEM suplementado con 2% FBS, se añadió la mezcla sobre células L929 sembradas el día anterior en placas M96 a 10.000 células/pocillo. Para acelerar el efecto citotóxico de la citoquina empleada en cada caso, se añadió a las células el inhibidor de la transcripción, actinomicina D (Sigma), a una concentración final de 4 μ g/ml. Para evaluar si efectivamente, las proteínas retenidas en la superficie celular podían inhibir la acción del TNF α , se repitió el experimento incubando previamente las proteínas con las células. Tras 30 minutos de incubación y los precedentes lavados con medio fresco, se añadió el TNF α en las mismas condiciones que lo explicado anteriormente.

Tras 18 h de incubación, se midió la viabilidad celular añadiendo 20 μ l por pocillo de Cell Titter AQueous One Solution (Promega) y determinando la absorbancia a 492 nm en un lector de placas Sunrise (Tecan).

Ensayos de quimiotaxis

Con el objetivo de evaluar la capacidad anti-CK de CrmD y otras proteínas recombinantes, se realizaron experimentos de inhibición de la migración inducida por CKs en transwell (Zaballos y cols., 1999).

El día del ensayo se recogieron las células MOLT4 en crecimiento exponencial y, tras lavarlas con PBS, se resuspendieron a 10×10^6 células/ml en RPMI suplementado con 0,1% de FCS. Para estos ensayos se utilizaron placas M96 en transwell (Neuroprobe). En los pocillos inferiores se incubó la CK CCL25 en ausencia o presencia de cantidades crecientes de proteína purificada en RPMI suplementado con 0,1% FCS, a 37°C durante 30 min. Se colocó la membrana sobre la placa y se repartieron 25 μ l de la suspensión de células en cada uno de los compartimentos superiores. Tras 3-4 h de migración a 37 °C, se lavaron las células restantes de los compartimentos superiores con PBS y se centrifugaron las placas dos min a 1.000 rpm antes de retirar la membrana. Se cuantificó el número de células que atravesaron la membrana hacia los pocillos inferiores donde se encontraba la CK añadiendo 5 μ l/pocillo de Cell Titter AQueous One Solution (Promega) y midiendo la absorbancia a 492 nm. Los resultados se representaron como el porcentaje en relación a la migración en ausencia de proteína recombinante. Los datos se normalizaron previamente con la absorbancia en ausencia de CK.

Resultados60 *Dominios SECRET codificados por poxvirus que interaccionan con GAGs*

Los genes y proteínas virales que incluyen un dominio SECRET de unión a quimioquinas con la capacidad de unirse a GAGs consisten en las siguientes secuencias (ver **Listado de Secuencias**):

- CrmD de CPXV: gen V221 (SEQ ID No 1) y proteína (SEQ ID No 2)
 - CrmD de ECTV: gen E3 (SEQ ID No 3) y proteína (SEQ ID No 4)
 - SCP-1 de ECTV: gen E12 (SEQ ID No 5) y proteína (SEQ ID No 6)
 - SCP-1 de CPXV: gen V014 (SEQ ID No 7) y proteína (SEQ ID No 8)
 - 5 - CrmB de VARV: gen G2R (SEQ ID No 9) y proteína (SEQ ID No 10)
 - CrmB de CPXV: gen V005 (SEQ ID No 11) y proteína (SEQ ID No 12)
 - SCP-3 de CPXV: gen V218 (SEQ ID No 13) y proteína (SEQ ID No 14)
 - SCP-3 de VACV: gen VACWR206 (SEQ ID No 15) y proteína (SEQ ID No 16)
 - SCP-2 de VACV: gen VACWR189 (SEQ ID No 17) y proteína (SEQ ID No 18)
 - 10 - SCP-2 de ECTV: gen E184 (SEQ ID No 19) y proteína (SEQ ID No 20)
 - Dominio SECRET de CrmD de CPXV: gen (SEQ ID No 21) y proteína (SEQ ID No 22)
 - Dominio SECRET de CrmD de ECTV: gen (SEQ ID No 23) y proteína (SEQ ID No 24)
 - Dominio SECRET de CrmB de CPXV: gen (SEQ ID No 25) y proteína (SEQ ID No 26)
 - Dominio SECRET de CrmB de VARV: gen (SEQ ID No 27) y proteína (SEQ ID No 28)
- 15 Diferentes alineamientos de secuencia mostrando la homología de aminoácidos se muestran en los ***Alineamientos de Secuencias.***

CrmD se une a GAGs con alta afinidad

20 Primeramente, se analizó la posible interacción de CrmD a GAGs mediante estudios de SPR con chips de heparina. Se acoplaron 50 RUs de heparina biotinilada a chips CM4 en los que previamente se habían inmovilizado 2.000 RUs de streptavidina. Seguidamente, se inyectó sobre el chip 300 nM de CrmD recombinante en buffer HBS-EP observándose una respuesta muy significativa e indicativa de una fuerte unión entre CrmD y la heparina. De hecho, se calculó la afinidad de esta interacción CrmD-heparina, inyectando distintas concentraciones de CrmD sobre el chip, obteniendo una constante de afinidad $KD= 3,30$ nM (Figura 1A) lo que la sitúa en el mismo orden que las interacciones de B18 (Montanuy y cols., 2011) y E163 (Ruiz-Arguello y cols., 2008) con heparina.

30 Se estudió también la especificidad de la interacción de CrmD con GAGs realizando experimentos de competición en los que la unión de CrmD al chip de heparina se compitió con concentraciones crecientes de distintos GAGs solubles. La heparina soluble fue la que presentó mejor eficacia a la hora de inhibir la unión de CrmD a la superficie. Sin embargo tanto el HS como el CSA y el CSB, con menor grado de sulfatación, bloquearon también la interacción CrmD-heparina de manera dosis dependiente aunque con peor eficiencia que la heparina. Mientras que con menos de 1µg/ml de heparina se consiguió inhibir el 50% de la unión de CrmD a la superficie, se necesitaron al menos 10µg/ml de CSA, CSB o HS para bloquear el 50% de la interacción (Figura 1B). No se encontraron diferencias significativas entre HS, CSA y CSB. Estos datos sugieren que CrmD es capaz de interactuar con distintos tipos de GAGs pero presenta una mayor afinidad por la heparina.

CrmD interactúa con GAGs a través del dominio SECRET

40 Se ha demostrado que CrmD es capaz de interactuar con GAGs, lo que potencialmente le atribuiría la capacidad de unirse a las superficies celulares o a la matriz extracelular. Con el fin de conocer si esta interacción con GAGs estaba mediada por uno u otro dominio o si por el contrario era una propiedad de la proteína completa, se inyectaron 300 nM de las proteínas recombinantes CRD-CrmD y CrmD163 sobre el chip de heparina. La proteína CrmD163, que contiene el dominio SECRET, fue capaz de interactuar con heparina, sin embargo, para CRD-CrmD no se detectó unión (Figura 2A).

50 Las superficies celulares son ricas en GAGs. Para confirmar que la unión a GAGs de CrmD y CrmD163, permitía a estas proteínas retenerse en las superficies celulares, se utilizó un ensayo de citometría de flujo en el que se incubaron 200 nM de las distintas proteínas recombinantes con células L929 y MOLT4. Como se puede ver en la figura 2B, sólo CrmD y CrmD163 quedaron retenidos en la superficie de estas dos líneas celulares, mientras que no se detectó la presencia de CRD-CrmD. Las proteínas E163 y B18 se muestran como controles positivos de la interacción con la superficie y vCCI como control negativo.

55 Con el fin de confirmar que la interacción de CrmD con la superficie celular estaba mediada por GAGs, se realizó un experimento de citometría de flujo similar al anterior en el que se utilizaron tres líneas celulares con distinto patrón de expresión de GAGs en superficie (Figura 3): i) células CHO-K1 que presentan un 40-70% de HS y un 30-55% de CS, ii) células CHO-745 con una expresión de GAGs reducida y iii) la línea CHO-618 que carece completamente de GAGs. Como se muestra en la Figura 43, mientras que CrmD y CrmD163, pero no CRD-CrmD, se unieron a la superficie de células CHO-K1, ninguna de las proteínas se retuvo en la superficie de células CHO-745 o CHO-618. Estos resultados corroboraron que CrmD es capaz de unirse a los GAGs presentes en las membranas celulares y que lo hace a través del dominio SECRET.

60 Se llevó a cabo un experimento similar para la unión a células L929 utilizando los cuatro vTNFRs distintos purificados, CrmD_ECTV, CrmB_VARV, CrmC_CPXV y CrmE_CPXV. Como se ve en la Figura 4, sólo

Crmb_VARV y CrmD_ECTV se unieron a células CHO-K1 mientras que CrmC_CPXV y CrmE_CPXV, carentes del dominio SECRET, como era de esperar, no quedaron retenidas (Figura 4A). Sin embargo, una construcción generada en baculovirus que expresaba CrmC fusionada al SECRET de CrmD (CrmC-SECRET) sí que interactuó con la superficie de estas células (Figura 4A). Este mismo resultado se confirmó realizando una inmunofluorescencia de células L929 incubadas con 200 nM de cada vTNFR. Se observó marca fluorescente sólo en aquellas células que fueron incubadas con CrmD_ECTV, CrmB_VARV o CrmC-SECRET (Figura 4B). De esta manera, se pudo concluir que los vTNFRs, CrmD y CrmB, se unen a GAGs gracias a su dominio de unión a CKs SECRET.

10 *Mediante la unión a GAGs, CrmD puede interactuar con TNF α en la superficie celular*

Para conocer si el CrmD unido a GAGs es capaz de interactuar con TNF α se utilizaron dos aproximaciones distintas, un ensayo por SPR y una precipitación con heparina acoplada a una resina de agarosa.

15 Mediante SPR, se comprobó que el mTNF α fue capaz de interactuar con CrmD previamente unido a la superficie de heparina. Se inyectaron 300 nM de CrmD sobre el chip de heparina y sin regenerar la superficie se pasaron 100 nM de mTNF α . Se observó un aumento en la señal al inyectar el mTNF α que no se detectó cuando se pasó la citoquina tras la unión de 300 nM de B18 de VACV, una proteína no relevante para la unión de mTNF α pero que sí se une a GAGs (Figura 5A). Por tanto, CrmD puede interactuar
20 simultáneamente con mTNF α y con GAGs.

Estos resultados se confirmaron mediante una precipitación con una resina de agarosa-heparina. Esta resina se incubó durante 1h con 200 nM de B18 de VACV, CRD-CrmD y CrmD. Tras esta incubación y los lavados correspondientes se añadió a la resina 200 nM de mTNF α y se analizaron las muestras mediante western
25 blot para detectar la presencia de mTNF α y de la proteína recombinante. Como se muestra en la Figura 5B, CrmD (línea 4) y B18 de VACV (línea 9), pero no CRD-CrmD (línea 6), se unieron a la resina y además el mTNF α quedó retenido sólo en la resina previamente incubada con CrmD (línea 4) (Figura 5B).

Con el fin de conocer también si esta interacción de CrmD con mTNF α en superficie, era además efectiva para bloquear los efectos de la citoquina, se realizó un experimento de citotoxicidad con células L929 con una
30 variación. Las proteínas a estudiar, CrmD, CRD-CrmD, CrmC, CrmC-SECRET y hTNFR2 se incubaron previamente sobre las células a 10 μ g/ml. Tras una serie de lavados se añadió una cantidad activa de mTNF α (6 pM) y a las 16 h se comprobó la viabilidad celular. Como control, se repitieron las condiciones de este experimento pero preincubando las proteínas recombinantes con mTNF α y añadiendo la mezcla sobre células L929 después de 1 h. Se observó que, efectivamente, en solución, todas las proteínas inhibieron la
35 muerte celular. Sin embargo, sólo CrmD y la proteína CrmC-SECRET se retuvieron tras los lavados en la superficie de las células pudiendo interactuar posteriormente con el mTNF α inhibiendo su efecto (Figura 5C). Estos resultados sugieren que la unión de CrmD con GAGs no interfiere con la unión del TNF α y que, de esta manera, CrmD puede inhibir el TNF en la superficie de las células. Además, al añadir el dominio SECRET a CrmC se consiguió una proteína (CrmC-SECRET) capaz de retenerse en la membrana celular y proteger del efecto citotóxico posterior del mTNF α .
40

Identificación de residuos implicados en la unión a GAGs presentes en el dominio SECRET

Se han definido dos secuencias consenso para la unión a GAGs, -XBBBXXBX- y -XBBXBX-, donde B es un
45 residuo básico y X un residuo hidropático (Hileman y cols., 1998). Sin embargo, existe una gran diversidad en los motivos existentes en las proteínas de unión a GAGs. Se pueden encontrar este tipo de motivos en la secuencia de algunas proteínas de unión a GAGs como B18 de VACV (Montanuy y cols., 2011) o E163 de ECTV (Ruiz-Arguello y cols., 2008).

Por su parte, en la secuencia del dominio SECRET no se pueden identificar motivos similares que pudiesen
50 estar mediando la interacción de GAGs. Para conocer las bases moleculares de la interacción de CrmD con GAGs, se construyeron cuatro mutantes puntuales en los que uno o varios residuos básicos se cambiaron por alaninas. Estos cuatro mutantes se denominaron GAG1 (K245A), GAG2 (R250A/R253A), GAG3 (K177A) y GAG4 (K177A/K218A) y se expresaron mediante el sistema de baculovirus (Figura 6A).

55 Con estos mutantes purificados se realizaron experimentos de unión a células con la línea celular CHO-K1. 200 nM de cada mutante y de CrmD como control, se incubaron con células CHO-K1 a 4°C durante 30 min. Como se muestra en la Figura 6B, los mutantes GAG3 y GAG4 se unieron a la superficie celular con un grado similar que CrmD, mientras que la retención de la proteína GAG1 se vio claramente afectada y el mutante GAG2 apenas interactuó con la superficie de las células CHO-K1. Este resultado sugiere que los residuos
60 K245, R250 y R253, están involucrados en el establecimiento de los contactos con las cargas negativas de los GAGs de superficie.

Se comprobó que los cambios de aminoácidos generados en los mutantes GAG1, GAG2, GAG3 y GAG4, no afectaban a la actividad anti-CK del dominio SECRET. Para ello, se realizó un experimento de quimiotaxis *in*

vitro en el que se preincubaron concentraciones crecientes de estos mutantes (GAG1-4) con 70 nM de mCCL25. Se comparó la capacidad de inhibir la migración de células MOLT4 en estas condiciones, de cada mutante respecto a la proteína CrmD. Tanto GAG1, GAG2, GAG3 como GAG4 inhibieron la migración inducida por mCCL25 de manera comparable a la proteína CrmD, reduciéndola al 50% o menos cuando se incubaron con 140 nM (relación molar 1:2) de las proteínas recombinantes con la CK (Figura 7). De esta manera, se demostró que los residuos mutagenizados en los mutantes GAG1-4 no están implicados en la interacción con CKs. Por lo tanto, se ha generado un mutante, GAG2, incapaz de unirse a las superficies celulares pero que no interfiere con la actividad anti-CK de CrmD.

De esta manera, mediante la mutación R250A/R253A (GAG2) se ha generado una versión de CrmD que presenta la misma capacidad de bloquear el TNF α y las CKs en suspensión que la proteína parental, pero que carece de los residuos implicados para la interacción con GAGs y consecuente retención en la superficie celular.

Discusión

Datos previos del laboratorio, aportan al dominio SECRET una gran importancia en la evasión del sistema inmunológico llevada a cabo por CrmD. Siempre en un contexto de infección en el que el TNF α esté inhibido. La eliminación de este dominio anti-CK, da como resultado un ECTV RevCRDs con una atenuación de cinco órdenes de magnitud respecto a ECTV RevCrmD. Dado que ECTV expresa otras proteínas con capacidades anti-CKs (E163, vCCI, SCP2 y SCP3), resulta sorprendente que la eliminación de un dominio que sólo bloquea un pequeño grupo de CKs, tenga un efecto tan drástico sobre la virulencia de ECTV. Por ello, se podría esperar que la adición de este dominio anti-CKs a una proteína con actividad anti-TNF α podría suponer una ventaja sustancial para el virus. La acción del dominio SECRET parece tener que ver con la función anti-TNF α de CrmD pero no se observó una cooperatividad positiva en la unión de los distintos ligandos y ambos dominios son estructural y funcionalmente independientes.

Sin embargo, hemos descubierto que el dominio SECRET es capaz de interactuar con GAGs de superficie con gran afinidad. Además, gracias a esta nueva función del dominio SECRET, CrmD puede inhibir la acción del TNF α en la membrana celular, próximo a los receptores de la citoquina. Mediante la interacción con GAGs, CrmD no sólo podría conseguir aumentar su estabilidad in vivo, sino que también le permitiría aumentar su concentración en torno a los TNFRs celulares. Al mismo tiempo, su gran afinidad por los GAGs le podrían permitir a CrmD desplazar a las CKs de las superficies impidiendo la formación de los gradientes quimiotácticos, una estrategia utilizada, por ejemplo, por la proteína E163 para interferir con las funciones de las CKs (Ruiz-Arguello y cols., 2008).

Aunque no existe un motivo de unión a GAGs en la secuencia de aminoácidos de CrmD, hemos definido algunos residuos en la secuencia del dominio SECRET importantes para la unión a GAGs, K245, R250 y R253.

Desde otro punto de vista, el TNF α es una molécula implicada en algunos desórdenes inflamatorios crónicos tales como la artritis reumatoide o la enfermedad de Crohn. Los nuevos tratamientos clínicos se basan en el uso de fármacos biológicos que consisten en anticuerpos recombinantes (infliximab, adalimumab) o, más recientemente, moléculas menos inmunogénicas, como etanercept que consiste en un dímero del dominio extracelular del TNFR2 fusionada a un fragmento Fc humano. En consonancia a lo observado en la patogénesis de ECTV, es probable que además del TNF α , las CKs jueguen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, por lo tanto, previsiblemente, la adición de un dominio SECRET a etanercept podría potenciar el efecto anti-inflamatorio de esta molécula, gracias al efecto anti-CK. Por otro lado, una de las funciones del fragmento Fc es la de garantizar la estabilidad y el transporte del fármaco, gracias a su interacción con los receptores celulares de Fc, en el organismo. Un dominio SECRET podría remplazar con éxito estas dos funciones de la porción Fc, aportando estabilidad y transporte de la molécula gracias a su interacción con los GAGs en las superficies celulares. Además, de esta forma, se evitarían algunos efectos secundarios debidos a la activación del sistema del complemento producida por el Fc de etanercept (Horiuchi y cols., 2010).

BIBLIOGRAFÍA

- Alcami, A. 2003. Viral mimicry of cytokines, chemokines y their receptors. *Nat Rev Immunol* 3:36-50.
- 5 Alejo, A., M.B. Ruiz-Arguello, Y. Ho, V.P. Smith, M. Saraiva, y A. Alcami. 2006. A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5995-6000.
- Cunnion, K.M. 1999. Tumor necrosis factor receptors encoded by poxviruses. *Mol Genet Metab* 67:278-282.
- 10 Handel, T.M., Z. Johnson, S.E. Crown, E.K. Lau, y A.E. Proudfoot. 2005. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* 74:385-410.
- Hileman, R.E., J.R. Fromm, J.M. Weiler, y R.J. Linhardt. 1998. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioessays* 20:156-167.
- 15 Horiuchi, T., H. Mitoma, S. Harashima, H. Tsukamoto, y T. Shimoda. 2010. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49:1215-1228.
- Montanuy, I., A. Alejo, y A. Alcami. 2011. Glycosaminoglycans mediate retention of the poxvirus type I interferon binding protein at the cell surface to locally block interferon antiviral responses. *Faseb J* 25:1960-1971.
- 20 Proudfoot, A.E., T.M. Handel, Z. Johnson, E.K. Lau, P. LiWang, I. Clark-Lewis, F. Borlat, T.N. Wells, y M.H. Kosco-Vilbois. 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1885-1890.
- 25 Ruiz-Arguello, M.B., V.P. Smith, G.S. Campanella, F. Baleux, F. Arenzana-Seisdedos, A.D. Luster, y A. Alcami. 2008. An ectromelia virus protein that interacts with chemokines through their glycosaminoglycan binding domain. *J Virol* 82:917-926.
- 30 Tak, P.P., y J.R. Kalden. 2011. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther* 13 Suppl 1:S5.
- 35 Wong, M., D. Ziring, Y. Korin, S. Desai, S. Kim, J. Lin, D. Gjertson, J. Braun, E. Reed, y R.R. Singh. 2008. TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol* 126:121-136.
- Zaballos, A., J. Gutierrez, R. Varona, C. Ardavin, y G. Marquez. 1999. Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J Immunol* 162:5671-5675.
- 40 Zhang, L., R. Lawrence, B.A. Frazier, y J.D. Esko. 2006. CHO glycosylation mutants: proteoglycans. *Methods Enzymol* 416:205-221.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Uso de un dominio SECRET de una proteína seleccionada entre: CrmB, CrmD, SCP-1, SCP-2 y SCP-3, su homólogo funcional, derivado o fragmento, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias, caracterizado por que dicho dominio SECRET es capaz de unirse a GAGs y se selecciona de entre una de las siguientes secuencias: SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 26, y SEQ ID N° 28.
- 10 2.- Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el dominio SECRET de CrmB, su homólogo funcional, derivado o fragmento es SEQ ID N° 26 o SEQ ID N° 28.
- 15 3.- Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el dominio SECRET de CrmD, su homólogo funcional, derivado o fragmento es SEQ ID N° 22 o SEQ ID N° 24.
- 20 4.- Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el dominio SECRET de SCP-1, SCP-2 y SCP-3, su homólogo funcional, derivado o fragmento se selecciona de entre una de las siguientes secuencias: SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 20.
- 25 5.- Uso según las reivindicaciones 1-4, caracterizado por que el homólogo funcional del dominio SECRET tiene al menos un 80% de homología de secuencia de aminoácidos.
- 30 6.- Uso según las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que dicho medicamento incrementa la estabilidad y/o las propiedades inmunomoduladoras de al menos una proteína seleccionada entre: CrmB, CrmD, SCP-1, SCP-2 y SCP-3.
- 35 7.- Uso según las reivindicaciones 1-6, caracterizado por que el dominio SECRET, su homólogo funcional, derivado o fragmento está fusionado al menos a un vTNFR, o a un anticuerpo humanizado anti-TNF.
- 40 8.- Uso según la reivindicación 7, caracterizado por que el dominio SECRET, su homólogo funcional, derivado o fragmento está fusionado al dominio N-terminal de unión a TNF del vTNFR.
- 9.- Uso según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que el vTNFR es CrmB o CrmD.
- 10.- Uso según las reivindicaciones 7-9, caracterizado por que el vTNFR es de origen humano.
- 11.- Uso según las reivindicaciones 1-10, caracterizado por que el medicamento comprende un inmunosupresor o una sustancia anti-inflamatoria adicional.
- 12.- Uso según las reivindicaciones 1-11, caracterizado por que el medicamento comprende al menos un anticuerpo específico inhibidor de la capacidad de unión a GAGs del dominio SECRET.

FIGURA 1

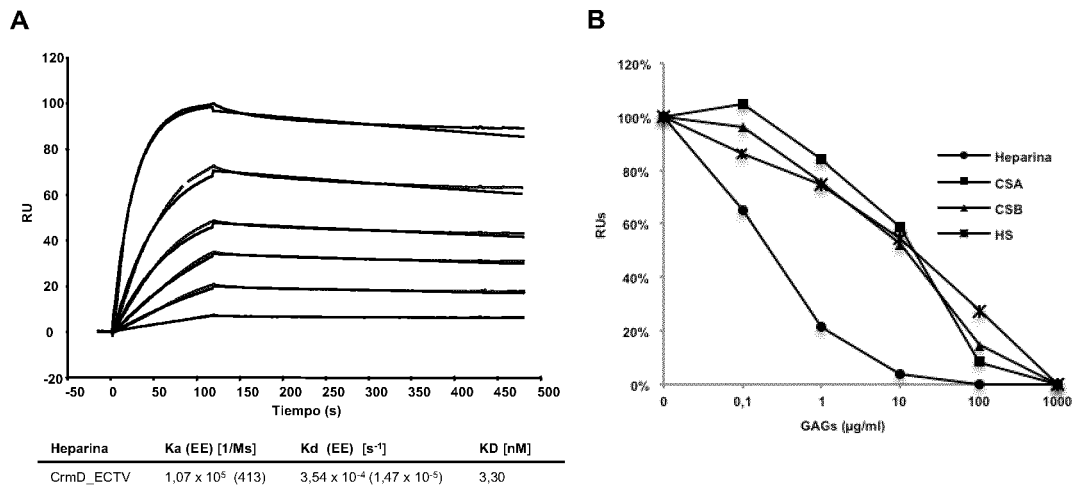


FIGURA 2

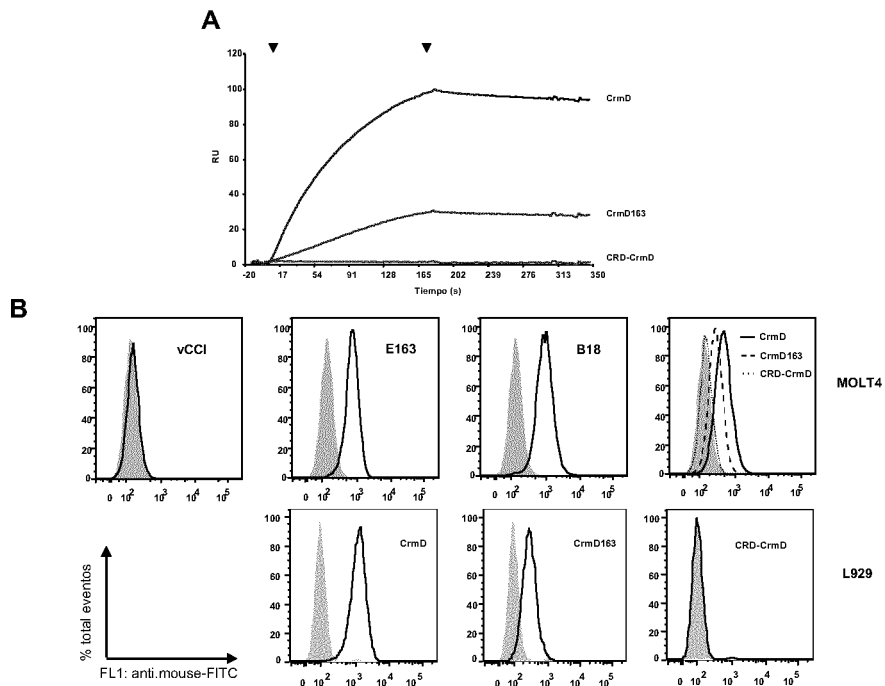


FIGURA 3

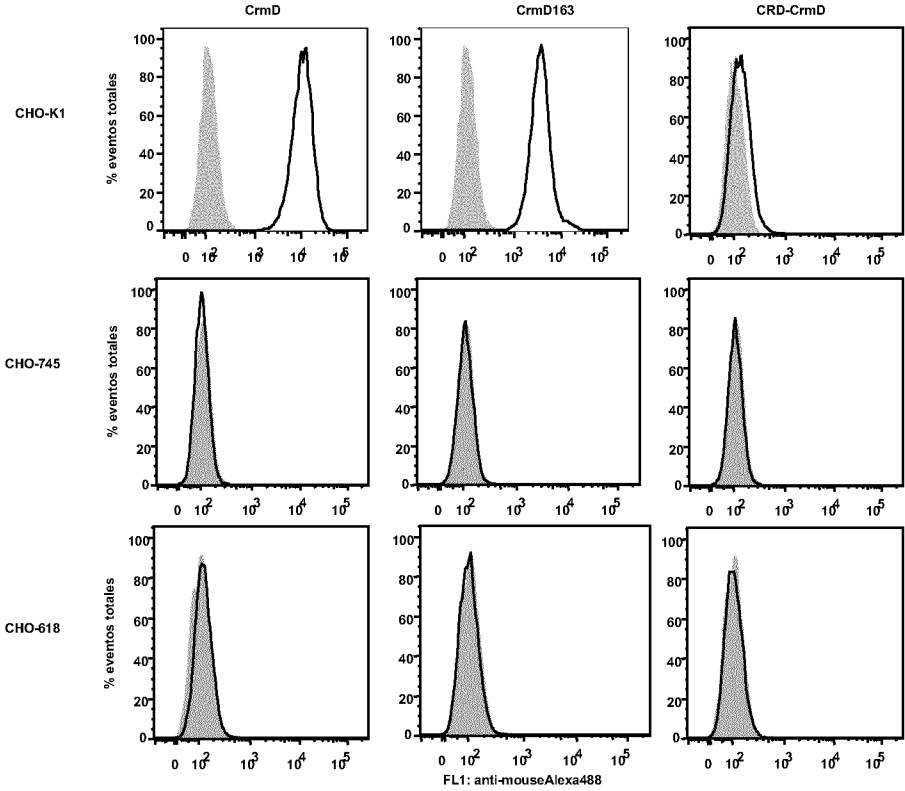


FIGURA 4

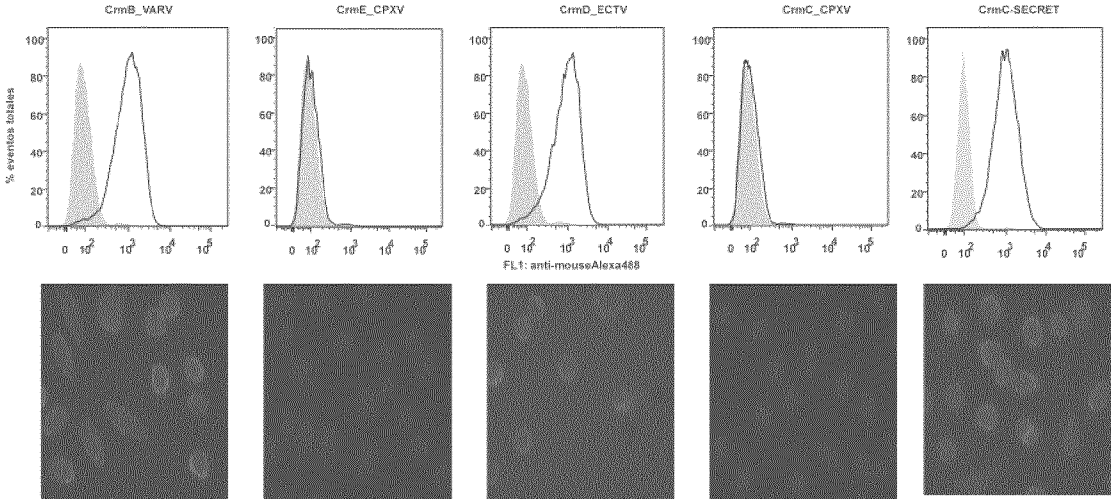


FIGURA 5

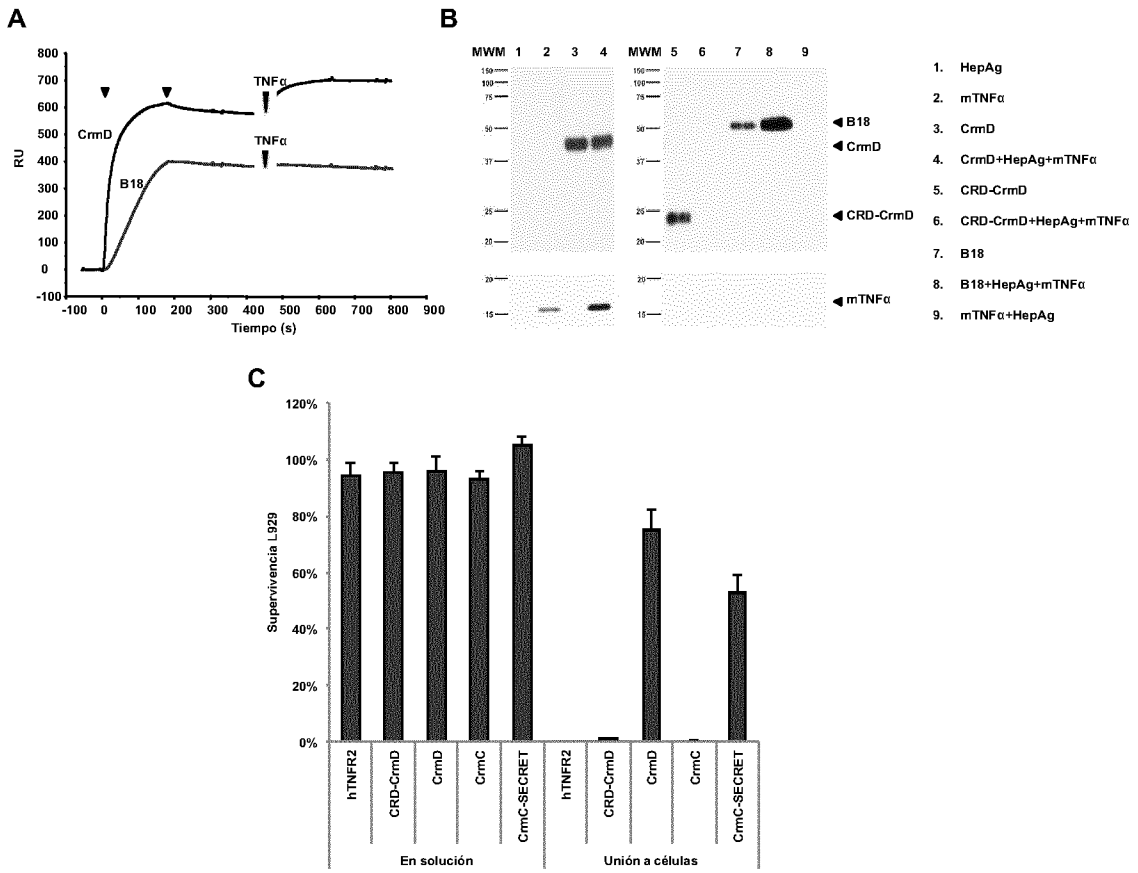


FIGURA 6

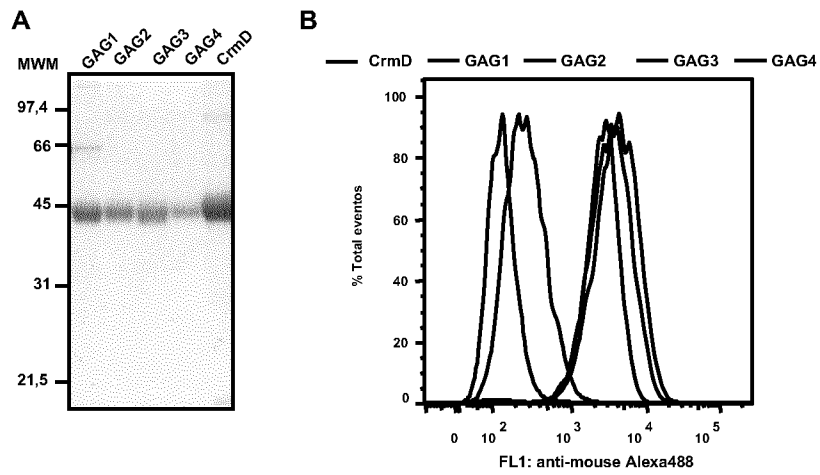


FIGURA 7

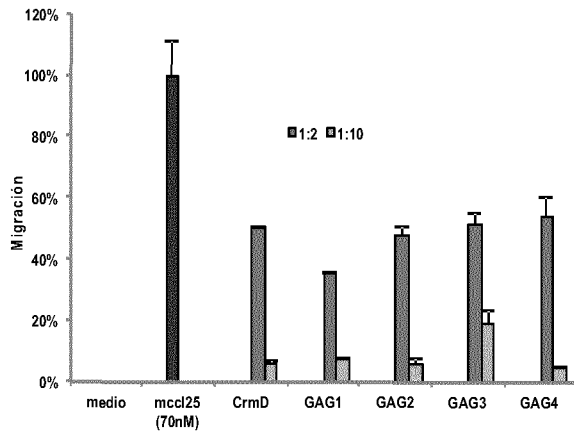


FIGURA 8a

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

CrmDCPV      -MMNMTPSYILLVYMFVVVSGDVP-YEHINGKCNKNGTDYNSNNLCCCKQCDPGMYMTHSCNT 58
CrmDEV       -MMKMTPSYILLVYMFVVVSGDVP-YTPINGKCNKNGTDYNSNNLCCCKQCNPGMYMTHSCNT 58
CrmBVaV      -MKSVLVLYLFLSCIING-RDAAPYTPPNKCKDTEYKRHNLCCLSCPPGTYASRLCDS 58
CrmBCPV      -MKS--YILLLLSCLIIINSDITPHEPSNGKCKDNEYKRHHLLCCLSCPPGTYASRLCDS 57
E12EV        -MINININTLIFASLFVA-----SFANDYP-----PPGFFENKYYITD 37
E12CPV       -MINININTLIFASLFVA-----SFANDYP-----PPGFFEDKYYITN 37
B7RVV        -MYKKLITFLFVIGALASY-----SNNEYT----- 24
B7REV        -MYKKLITFLFVIGAVASY-----SNNEYT----- 24
B21RCPV      MMIYGLIACLIFVTSSASPLYIP----VIPPIEDK----- 33
B21RVV       MMIYGLIACLIFVTSSIASPLYIP----VIPPISEDK----- 33
*           :...
           :...
           :...
CrmDCPV      TSNT--KCDKCPDGTFTSIPNHIPTCLSCRGKCSSNHVETKCSNTQDRVVCVCSGYECE 116
CrmDEV       TSNT--KCDKCPDDTFTSIPNHPACLSCRGKCSSNQVETKCSNTQDRVVCVCSGYECE 116
CrmBVaV      KTN--QCTPCGSGTFTSRNNHLLPAACLSNRCNSNQVETRSNTTTHNRICECSPGYECL 116
CrmBCPV      KTN--QCTPCASDTFTSRNNHLLPAACLSNRCNSNQVETRSNTTTHNRICDCAPGYECF 117
E12EV        -----
E12CPV       -----
B7RVV        -----
B7REV        -----
B21RCPV      -----
B21RVV       -----

```

FIGURA 8b

CrmDCPV FEGSNGCRLCVPQTCKDSGYGVYGYSSKGDVICCKC-----PGNIDKCD----LSFN 164
 CrmDEV FEGSNGCRLCVPQTCKGSGYGVYGYSSKGDVICCKC-----PGNIDKCD----LSFN 164
 CrmBVaV LKSSGGCKACVSQTKCGIGYGVSGHTSVGDVICSPCGFGTYSHTVSSADKCEPVPNNTFN 176
 CrmBCPV LKSSGGCKACVSQTKCGIGYGVSGHTPTGDVVCSPCGLGTYSHTVSSVDKCEPVPSTFN 177
 E12EV -----TFN 40
 E12CPV -----TFN 40
 B7RVV -----PFN 27
 B7REV -----PFN 27
 B21RCPV -----SFN 36
 B21RVV -----SFN 36
 .
 **

CrmDCPV SIDVEINMYPVNKTSCN--SSIGSSSTISTSELTITLKHEDCTTVFIGDYYSVVDKLAATS 222
 CrmDEV SIDVEINMYPVNKTSCN--SSIGSSSTISTSELTITLTHEDCTPVFIGDYYSVVDKLAATS 222
 CrmBVaV YIDVEITLYPVNDTSCTRTTTGLSEILTSELTITMNHTDCNPVFRFEYFVSLNKVATS 236
 CrmBCPV YIDVEINLYPVNDTSCTRTTTGLSEISTSELTITMNHKDCDPVFRNGYFVSLNEVATS 237
 E12EV YISIDFELYPVNVSSCNRLSTKQSSDIIITSELTITVNSTDCDPVVFVTEYYSVKDKTAVA 100
 E12CPV YISIDFELYPVNVSSCNRLSTKQSSDVI STSELTITVNSTDCDPVVFVTEYYSVKDKTAIA 100
 B7RVV KLSVKLYIDGVNDNIENS-YTDDNNELVNLFKEYTISIIITESCDVGFDSIDIDVINDYKII 86
 B7REV KLSVKLYIDGVNDNIENS-YTD-NNELVLNLFKEYTISIIITESCDVGFDSIDIDVINDYKIL 85
 B21RCPV SVEVLVSLFRDEQKDYT-VTSQFNNTIDTKDWTINVLSTPDGLEIPLTNITYWSRFPTI 95
 B21RVV SVEVLVSLFRDDQKDYT-VTSQFNNTIDTKDWTIGVLSTPDGLDIPLTNITYWSRF-TI 94
 :.:. . : : . . : : : : : .
 :.:. . : : . . : : : : : .
 :.:. . : : . . : : : : : .
 :.:. . : : . . : : : : : .
 :.:. . : : . . : : : : : .
 :.:. . : : . . : : : : : .

FIGURA 8c

CrmDCPV	GFFTNDK--VHQDLTTQCKINLEIKNSGG--ESRQLTPTTKVY--FMPHSETVTVVGD	275
CrmDEV	GFFTNDK--VHQDLTTQCKINLEIKNSGR--ESRQLTPTTKVY--LMPHSETVTVVGD	275
CrmBVaV	GFFTGEN--RYQNI SKVCTLNFEIKCNKG--SSFQQLTKAKNDD-GMMSHSETVTLAGD	291
CrmBCPV	GFFTGQN--RYQNI SKVCTLNFEIKCNKDSYSSSKQLTKTKNDDDSIMPHSESVTLVGD	295
E12EV	GLFTDFT--KKQNTSKMCTLNVEVKNAET--EPVLIGNFTRVPEASTHAENFTLIGN	155
E12CPV	GLFTDFT--KKQNTSKMCTLNIEVKNAET--EPVLIGNFTRVPEKASTHAENFTLIGN	155
B7RVV	DMYTIDSS--TIQRRGHTCRISTKLSCHYDK---YPYIHKYDGE---RQYSITAEKG	136
B7REV	DMYTIDSS--TIQRRGHTCKISTKLSCHYDK---HPYIHKYEGE---RQYSITAEKG	135
B21RCPV	GHALFKSESEDI FQKNMSILGVSIECKKPS---TSFTFLTVRKISRVFNRFPDMAYYRGD	152
B21RVV	GRALFKSESEDI FQKKMSILGVSIECKKSS---TLLTFLTVRKMTRVFNKFPDMAYYRGD	151
 : *	
CrmDCPV	CLSNLDVYIVYANTDAIYSDMDVVAYHTSYILNVDHIPPND CERD-----	320
CrmDEV	CLSNLDVYIVYANTDAIYSDMDVVAYHTSYILNVDHIPPND CERD-----	320
CrmBVaV	CLSSVDIYILYSNTNAQDYETDTSYRVGNVLDVDSHMPGSCNIHKPI TNSK---PTRFL	348
CrmBCPV	CLSSVDIYILYSNTNTQDYETDTISYHVGNVLDVDSHMPGRC DTHKLI TNSNSQYPTHFL	355
E12EV	CLSDLHLIYIAYVNTDEG--FEEDTATI HIGNMIDISGIPPNTCATRTIN-----	202
E12CPV	CLSDLHLIYIAYVNTDEE--FEEDTATVHIGNKLDINGIPPNCATRTIN-----	202
B7RVV	CYKGIKYEI SMIN--D TLLRKHTLKIGSTYIFDRRHGHSNTYYSKYDF-----	182
B7REV	CYKGIKYEI SMH--D TLLRKHTLKIGSTYIFDRRHGHSNTYYSKYDF-----	181
B21RCPV	CLEVYVVTMTYKNTKTG--ETDYTYLSNVGIP EYRLMSGVDG-----	193
B21RVV	CLKAVYVVTMTYKNTKTG--ETDYTYLSNGGLPAYR--NGVDG-----	190
	* :	

FIGURA 9a

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment (CrmB / CrmD)

```

CrmBVaV      MKSVLYLYILFLSCIING-RDAAPYTPNGKCKDTEYKRHNLCCLSCPPGYASRLCDSK  59
CrmBCPV      MKS--YILLLLSIIIIINSDITPHEPSNGKCKDNEYKRHHLLCCLSCPPGYASRLCDSK  58
CrmDCPV      MMNMTPSYILLVYMFVVSVDVP-YEHINGKCNGLDYSNNLLCCKQCDPMMYTHSCNTT  59
CrmDEV      MMKMTPSYILLVYMFVVSVDVP-YTPINGKCNGLDYSNNLLCCKQCNPFMMYTHSCNTT  59
* . . . : * : * : * * * * * * * * * * : : * * * * * : : * * : * : * : * : * :
CrmBVaV      TNT--QCTPCGGFTSRNNHLPACLSCNRCNSNQVETRSCNTHNRICECSPGYCYCLL  117
CrmBCPV      TNTNTQTCPASDTFTSRNNHLPACLSCNRCDSNQVETRSCNTHNRI CDCAPGYCYCFL  118
CrmDCPV      SNT--KCDKCPDGTFTSIPNHIPTCLSCRGKCSSNHVETKSCSNLQDRVVCASGYCE  117
CrmDEV      SNT--KCDKCPDDTFTSIPNHSFPAACLSCRGKCSSNQVETKSCSNLQDRVVCASGY  117
: * * * : * . . * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * :
CrmBVaV      KGSSGCKACVSQTKGIGYVSGHTSVGDVICSPCGFGTYSHTVSSADKCEPVPNTFN  177
CrmBCPV      KGSSGCKACVSQTKGIGYVSGHTFTGDVVCSPCGLGTYSHTVSSVDKCEPVPNTF  178
CrmDCPV      EGSNGCRLCVPQTKCDSGYGVYSSKGDVICCKC-----PGNIDKCD-----LS  165
CrmDEV      EGSNGCRLCVPQTKCGSGYGVYSSKGDVICCKC-----PGNIDKCD-----LS  165
: * * * * : * * * * * * * * * * * * : * * * * * * : * * * *
CrmBVaV      IDVEITLYPVNDTSCRTRTTTGLSESLTSELTLTMNHTDCNVPFREYFVSNKVA  237
CrmBCPV      IDVEINLYPVNDTSCRTRTTTGLSESLTSELTLTMNHKDCDPVFRNGYFVSNVE  238
CrmDCPV      IDVEINMYPVNKTSCN--SSIGSSSTISTSELTLTLKHEDCTTFVFGDYYSVVD  223
CrmDEV      IDVEINMYPVNKTSCN--SSIGSSSTISTSELTLTLTHECTPFVFGDYYSVVD  223
***** : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CrmBVaV      FFTGENRYQNISKVCTLNFEIKCNKNG--SSFKQLTKAKNDD-GMMSHSETVTLAG  294

```

FIGURA 9b

```

CrmBCPV      FFTGQNR YQNISKVCTLNFEIKCNKDSYSSSKQLTKTKNDDDSIMPHSESVTLVGDCLS 298
CrmDCPV      FFTNDKVHQDLTTQCKINLEIKNSGG--ESRQLTPTTKVY--FMPHSETVTVVGDCLS 278
CrmDEV       FFTNDKVHQDLTTQCKINLEIKNSGR--ESRQLTPTTKVY--LMPHSETVTVVGDCLS 278
***::: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*
CrmBVaV      SVDIYILYSNTNAQDYETDTISYRVGNVLDVDDSHMPGSCNIHKPIITNSK--PTRFL 348
CrmBCPV      SVDIYILYSNTNQDYETDTISYHVGNVLDVDSHMPGRCDTHKLITNSNSQYPTHFL 355
CrmDCPV      NLDVYIVYANTDAIYSDMDVVAAYHTSYILNVVDHIPPPNDCERD----- 320
CrmDEV       NLDVYIVYANTDAIYSDMDVVAAYHTSYILNVVDHIPPPNDCERD----- 320
.:*:*:*:*:*: :*::*:*:*:*: :*::*: :* :* :* :*

```

FIGURA 10a

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment (CTDs)

```

E12EV      -MINININTLIFASLFVASFANDYPPPGFFENKYITDTFNYISIDFELYPVNVSSCNRL 59
E12CPV     -MINININTLIFASLFVASFANDYPPPGFFEDKYITNTFNYISIDFELYPVNVSSCNRL 59
B7RVV     --MYKKLITFLFVIGALASYSNNEYTP-----FNKLSVKLYIDGVND-IENSY 45
B7REV     --MYKKLITFLFVIGAVASYSNNEYTP-----FNKLSVKLYIDGVND-IENSY 45
B21RCPV   MMYGLIACLI FVTSSSTASPLYIPVIPP-----ITEDKSFNSVEVLVSLFRDEQ-KDYTV 54
B21RVV   MMYGLIACLI FVTSSIASPLYIPVIPP-----ISEDKSFNSVEVLVSLFRDDQ-KDYTV 54
: : : : : : : : : : * . : : * * : : : : : : : : : :
STKQSSDIITSELITVNSTDCDPVFTVEYYSVKDKTAVAGLFT-DTTKK-QNTSKMCT 117
STKQSSDVISTSELTITVNSTDCDPVFTVEYYSVKDKTAIAGLFT-DTTKK-QNTSKMCT 117
TDDNNELVLFKEYSITISITESC DVGFSIDIDVINDYKIIDMYTIDSSSTI-QRRGHTCR 104
TD-NNELVLFKEYSITISITESC DVGFSIDIDVINDYKIIDMYTIDSSSTI-QRRGHTCK 103
TSQFNNTYITIDTKDWTINVLSTPDGLEIPLTNIITYWSRFPPTIGHALFKSESEDI FQKNMSI 114

```

FIGURA 10b

```

B21RVV      TSQFNNTIDTKDWTIGVLSTPDLIPLTNITYWSRF-TIGRALFKSESEDIQKKMSI 113
: . . . . : . : * : . : . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :
: . . . . : . : * : . : . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :
E12EV      LNVEVKCNAETEPEVLI GNFTRVPE TASTHAENFTLI GNCLSDLHLHYIAYVNTDEGFEEDT 177
E12CPV      LNI EVKCNAETEPEVLI GNFTRVPE KAETHAENFTLI GNCLSDLHLHYIAYVNTDEE FEEDT 177
B7RVV      ISTKLSCHYDKYPYIH-----KYDGERQYSITAE GKCYKGIKYEISMINDDTLLRKHT 158
B7REV      ISTKLSCHYDKHPYIH-----KYEGDERQYSITAE GKCYKGIKYEISMMHDDTLLRKHT 157
B21RCPV      LGVSI ECKKPSFTFLLTVRKISR VFNRFPDMAYYRGDCLEVVVYVVTMTYKNTKTGETDYT 174
B21RVV      LGVSI ECKKSSTLLTFLTVRKMTRVFNKFPDMAYYRGDCLEKAVYVVTMTYKNTKTGETDYT 173
: . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

```

```

E12EV      ATIHIGNMIDISGIPPNTCATRTIN- 202
E12CPV      ATVHIGNKLDINGIPPNMCA TRTIN- 202
B7RVV      LKIGSTYIFDRHGHSN TYYSKYDF-- 182
B7REV      LKIGSTYIFDRHGHSN TYYSKYDF-- 181
B21RCPV      YLSNV-----GIPEYYRLMSGVDG 193
B21RVV      YLSNG-----GLPAYR--NGVDG 190
          * . . . .

```


ES 2 429 639 A1

Listado de secuencias

<110> Alcami, Antonio and Martin-Pontejo, Sergio

<120>

<130> 1

<160> 28

<170> Patent version 1

<210> 1

<211> 963

<212> DNA

<213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>

<221> gen

<222> (1)..(963)

<223> Gen V221

<400> 1

atgatgaata tgacaccatc atacatcttg ttggtatata tgttcgtagt cgtaagtgga
60

gatgttcctt atgaacacat taatgggaaa tgtaacggtg ccgactataa tagtaataat
120

ctatgttgta aacaatgcga tcctggaatg tatatgactc attcctgtaa taccacttct
180

aatacaaaat gtgacaagtg cccagatggc acctttacat ccattcctaa tcatattccc
240

acgtgtctaa gttgtcgagg caaatgtagc agtaatcatg tagagactaa atcgtgtagt
300

aacacacagg acagagtatg tgtctgtgca tccggatact actgccaatt tgaaggatca
360

aacggttgca ggctatgtgt accacaaaca aagtgtgatt ctggttacgg tgtatatggc
420

tactcatcta aaggagatgt aatatgtaa aagtgtccgg gtaatataga taaatgtgat
480

ctgtccttta acagcataga tgtagaaatt aatatgtatc ctgttaacaa gacctcttgt
540

aattcgagta taggaagtag cagtaccata tcaacttccg agttaacaat tactctaaaa
600

catgaggatt gtactactgt ctttattgga gattactatt cagtcgttga taaactagca
660

acttcagggt tctttacaaa cgataaagta catcaagacc tcacaacgca gtgcaagatt
720

aatctagaaa tcaaatgtaa ttctggagga gaatctagac aactaacacc cagcaggaag
780

gtatacttta tgccctatc agaaacggta actgtggtag gagactgtct ctctaattctc
840

ES 2 429 639 A1

gatgtctata tagtatatgc caatacggac gcgatatatt ccgacatgga tgtcgtcgcct
900

tatcatacta gttatatact aaatgttgat catattccac caaatgattg tgaagagat
960

Lga
963

<210> 2
<211> 320
<212> PRT
<213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(320)
<223> Cytokine response modifier D (CrmD)

<400> 2

Met Met Asn Met Thr Pro Ser Tyr Ile Leu Leu Val Tyr Met Phe Val
1 5 10 15

Val Val Ser Gly Asp Val Pro Tyr Glu His Ile Asn Gly Lys Cys Asn
20 25 30

Gly Thr Asp Tyr Asn Ser Asn Asn Leu Cys Cys Lys Gln Cys Asp Pro
35 40 45

Gly Met Tyr Met Thr His Ser Cys Asn Thr Thr Ser Asn Thr Lys Cys
50 55 60

Asp Lys Cys Pro Asp Gly Thr Phe Thr Ser Ile Pro Asn His Ile Pro
65 70 75 80

Thr Cys Leu Ser Cys Arg Gly Lys Cys Ser Ser Asn His Val Glu Thr
85 90 95

Lys Ser Cys Ser Asn Thr Gln Asp Arg Val Cys Val Cys Ala Ser Gly
100 105 110

Tyr Tyr Cys Glu Phe Glu Gly Ser Asn Gly Cys Arg Leu Cys Val Pro
115 120 125

Gln Thr Lys Cys Asp Ser Gly Tyr Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Ser Lys
130 135 140

Gly Asp Val Ile Cys Lys Lys Cys Pro Gly Asn Ile Asp Lys Cys Asp
145 150 155 160

Leu Ser Phe Asn Ser Ile Asp Val Glu Ile Asn Met Tyr Pro Val Asn
165 170 175

ES 2 429 639 A1

Lys Thr Ser Cys Asn Ser Ser Ile Gly Ser Ser Ser Thr Ile Ser Thr
 180 185 190
 Ser Glu Leu Thr Ile Thr Leu Lys His Glu Asp Cys Thr Thr Val Phe
 195 200 205
 Ile Gly Asp Tyr Tyr Ser Val Val Asp Lys Leu Ala Thr Ser Gly Phe
 210 215 220
 Phe Thr Asn Asp Lys Val His Gln Asp Leu Thr Thr Gln Cys Lys Ile
 225 230 235 240
 Asn Leu Glu Ile Lys Cys Asn Ser Gly Gly Glu Ser Arg Gln Leu Thr
 245 250 255
 Pro Thr Thr Lys Val Tyr Phe Met Pro His Ser Glu Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Val Gly Asp Cys Leu Ser Asn Leu Asp Val Tyr Ile Val Tyr Ala Asn
 275 280 285
 Thr Asp Ala Ile Tyr Ser Asp Met Asp Val Val Ala Tyr His Thr Ser
 290 295 300
 Tyr Ile Leu Asn Val Asp His Ile Pro Pro Asn Asp Cys Glu Arg Asp
 305 310 315 320

<210> 3
 <211> 960
 <212> DNA
 <213> Ectromelia virus cepa Naval

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(960)
 <223> Gen E3

<400> 3
 atgatgaaga tgacaccatc atacatcttg ttggtatata tggtcgtagt cgtaagtgga
 60
 gatgttccgt atacacccat taatgggaaa tgtaacggta cagactataa cagtaataat
 120
 ctatgttgta aacaatgcaa tcttggaatg tatatgactc attcctgtaa taccacttct
 180
 aatacaaaat gtgacaagtg cccagatgac acctttacat ccattcctaa tcatagtccc
 240
 gcgtgtctaa gttgtcgagg caaatgtagc agtaatcaag tagagactaa atcgtgtagt
 300
 aacacacagg acagagtatg tgtctgtgca tccggatact actgcgaatt tgaaggatca
 360

ES 2 429 639 A1

aacggttgca ggctatgtgt accacaaaaca aagtgtgggt ctggttacgg tgtatatggc
420

tactcatcta aaggagatgt aatatgtaaa aagtgtccgg gtaatataga taaatgtgat
480

ctgtccttta acagcataga tgtagaaatt aatatgtatc ctgttaacaa gacctcttgt
540

aattcgagta taggaagcag cagtaccata tcaacttccg agttaacaat tactctaaca
600

catgaggatt gtactcctgt ctttattgga gattactatt cagtcgttga taaactagca
660

acttcagggt tctttacaaa cgataaagta catcaagacc tcacaacgca gtgcaagatt
720

aatctagaaa tcaaatgtaa ttctggaaga gaatctagac aactaacacc cacgacgaag
780

gtatacctta tgccctattc agaaacggta actgtggtag gagactgtct ctctaattctc
840

gatgtctata tagtatatgc caatacggac gcgatatatt ccgacatgga cgtcgtcggc
900

tatcatacta gttatatact aaatgttgat catattccac caaatgattg tgaagagat
960

<210> 4

<211> 320

<212> PRT

<213> Ectromelia virus cepa Naval

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(320)

<223> Cytokine Response Modifier D (CrnD)

<400> 4

Met Met Lys Met Thr Pro Ser Tyr Ile Leu Leu Val Tyr Met Phe Val
1 5 10 15

Val Val Ser Gly Asp Val Pro Tyr Thr Pro Ile Asn Gly Lys Cys Asn
20 25 30

Gly Thr Asp Tyr Asn Ser Asn Asn Leu Cys Cys Lys Gln Cys Asn Pro
35 40 45

Gly Met Tyr Met Thr His Ser Cys Asn Thr Thr Ser Asn Thr Lys Cys
50 55 60

Asp Lys Cys Pro Asp Asp Thr Phe Thr Ser Ile Pro Asn His Ser Pro
65 70 75 80

Ala Cys Leu Ser Cys Arg Gly Lys Cys Ser Ser Asn Gln Val Glu Thr

ES 2 429 639 A1

	85	90	95
Lys Ser Cys Ser Asn Thr Gln Asp Arg Val Cys Val Cys Ala Ser Gly	100	105	110
Tyr Tyr Cys Glu Phe Glu Gly Ser Asn Gly Cys Arg Leu Cys Val Pro	115	120	125
Gln Thr Lys Cys Gly Ser Gly Tyr Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Ser Lys	130	135	140
Gly Asp Val Ile Cys Lys Lys Cys Pro Gly Asn Ile Asp Lys Cys Asp	145	150	155
Leu Ser Phe Asn Ser Ile Asp Val Glu Ile Asn Met Tyr Pro Val Asn	165	170	175
Lys Thr Ser Cys Asn Ser Ser Ile Gly Ser Ser Ser Thr Ile Ser Thr	180	185	190
Ser Glu Leu Thr Ile Thr Leu Thr His Glu Asp Cys Thr Pro Val Phe	195	200	205
Ile Gly Asp Tyr Tyr Ser Val Val Asp Lys Leu Ala Thr Ser Gly Phe	210	215	220
Phe Thr Asn Asp Lys Val His Gln Asp Leu Thr Thr Gln Cys Lys Ile	225	230	235
Asn Leu Glu Ile Lys Cys Asn Ser Gly Arg Glu Ser Arg Gln Leu Thr	245	250	255
Pro Thr Thr Lys Val Tyr Leu Met Pro His Ser Glu Thr Val Thr Val	260	265	270
Val Gly Asp Cys Leu Ser Asn Leu Asp Val Tyr Ile Val Tyr Ala Asn	275	280	285
Thr Asp Ala Ile Tyr Ser Asp Met Asp Val Val Ala Tyr His Thr Ser	290	295	300
Tyr Ile Leu Asn Val Asp His Ile Pro Pro Asn Asp Cys Glu Arg Asp	305	310	315
			320

<210> 5
 <211> 609
 <212> DNA
 <213> Ectromelia virus cepa Naval

<220>

ES 2 429 639 A1

<221> gen
<222> (1)..(609)
<223> Gene E12

<400> 5
atgataaaca taaacataaa cacaatacta atattcgcat cattatattgt tgcacgcttt
60
gcaaatgatt atcctccacc cggtttcttc gaaaacaaat acattacaga tacatttaat
120
tacatatcta tagatattga actatatcca gttaacgtat catcttgtaa tcgactaagt
180
acaaaacaat catccgatat tatcacgact tctgaattaa caattactgt taatagtaca
240
gactgcgatc cagtctttgt aacagaatat tattctgtaa aggataaaac tgctgtagcc
300
ggacttttca cagatactac aaaaaaaca aatacatcca agatgtgtac gctgaatgta
360
gaagtaaaat gtaacgctga aacggaacct gtattaatcg gtaattttac acgtgttctc
420
gaaacagcat caaccacgc tgaaaatttc actttaatag gcaactgtct atcagatctc
480
catctctata ttgcgtacgt caataccgat gagggatttg aagaggatac tgctactatt
540
catataggaa acatgatcga tattagcggg atacctcaa atacttgccg tactagaact
600
attaattag
609

<210> 6
<211> 202
<212> PRT
<213> Ectromelia virus cepa Naval

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(202)
<223> SCP-1

<400> 6
Met Ile Asn Ile Asn Ile Asn Thr Ile Leu Ile Phe Ala Ser Leu Phe
1 5 10 15
Val Ala Ser Phe Ala Asn Asp Tyr Pro Pro Pro Gly Phe Phe Glu Asn
20 25 30
Lys Tyr Ile Thr Asp Thr Phe Asn Tyr Ile Ser Ile Asp Phe Glu Leu
35 40 45
Tyr Pro Val Asn Val Ser Ser Cys Asn Arg Leu Ser Thr Lys Gln Ser
50 55 60

ES 2 429 639 A1

Ser Asp Ile Ile Thr Thr Ser Glu Leu Thr Ile Thr Val Asn Ser Thr
 65 70 75 80

Asp Cys Asp Pro Val Phe Val Thr Glu Tyr Tyr Ser Val Lys Asp Lys
 85 90 95

Thr Ala Val Ala Gly Leu Phe Thr Asp Thr Thr Lys Lys Gln Asn Thr
 100 105 110

Ser Lys Met Cys Thr Leu Asn Val Glu Val Lys Cys Asn Ala Glu Thr
 115 120 125

Glu Pro Val Leu Ile Gly Asn Phe Thr Arg Val Pro Glu Thr Ala Ser
 130 135 140

Thr His Ala Glu Asn Phe Thr Leu Ile Gly Asn Cys Leu Ser Asp Leu
 145 150 155 160

His Leu Tyr Ile Ala Tyr Val Asn Thr Asp Glu Gly Phe Glu Glu Asp
 165 170 175

Thr Ala Thr Ile His Ile Gly Asn Met Ile Asp Ile Ser Gly Ile Pro
 180 185 190

Pro Asn Thr Cys Ala Thr Arg Thr Ile Asn
 195 200

<210> 7
 <211> 609
 <212> DNA
 <213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(609)
 <223> Gen V014

<400> 7
 atgataaaca taaacataaa cacaatacta atattcgcac cattatttgt tgcacgcttt
 60
 gcaaatgatt atcctccacc cggtttcttc gaagacaaat acattacaaa tacatttaac
 120
 tacatatcta tagatthttga actatatcca gttaacgtat catcttgtaa tcgactaagt
 180
 acaaaacaat catcagatgt tatatcgact tctgaattga caattactgt taatagtaca
 240
 gattgtgatc cagtctttgt aacagaatat tactctgtaa aggataaaac tgctatagcc
 300
 ggacttttca cagatactac aaaaaaacia aatacatcca agatgtgtac gctgaatata

ES 2 429 639 A1

360

gaagtaaaat gtaacgctga aacggaacct gtattaatcg gtaattttac acgcgttccct
420

gaaaaagcat caacacacgc tgaaaatttc actttaatag gcaactgtct atcagatctc
480

catctctata ttgcgtatgt caataccgat gaggaatttg aagaggatac tgctactggt
540

catataggaa acaaactcga tattaacggt atacctccaa atatgtgcgc taccagaacc
600

attaattag
609

<210> 8
<211> 202
<212> PRT
<213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(202)
<223> SCP-1

<400> 8

Met Ile Asn Ile Asn Ile Asn Thr Ile Leu Ile Phe Ala Ser Leu Phe
1 5 10 15

Val Ala Ser Phe Ala Asn Asp Tyr Pro Pro Pro Gly Phe Phe Glu Asp
20 25 30

Lys Tyr Ile Thr Asn Thr Phe Asn Tyr Ile Ser Ile Asp Phe Glu Leu
35 40 45

Tyr Pro Val Asn Val Ser Ser Cys Asn Arg Leu Ser Thr Lys Gln Ser
50 55 60

Ser Asp Val Ile Ser Thr Ser Glu Leu Thr Ile Thr Val Asn Ser Thr
65 70 75 80

Asp Cys Asp Pro Val Phe Val Thr Glu Tyr Tyr Ser Val Lys Asp Lys
85 90 95

Thr Ala Ile Ala Gly Leu Phe Thr Asp Thr Thr Lys Lys Gln Asn Thr
100 105 110

Ser Lys Met Cys Thr Leu Asn Ile Glu Val Lys Cys Asn Ala Glu Thr
115 120 125

Glu Pro Val Leu Ile Gly Asn Phe Thr Arg Val Pro Glu Lys Ala Ser
130 135 140

ES 2 429 639 A1

Thr His Ala Glu Asn Phe Thr Leu Ile Gly Asn Cys Leu Ser Asp Leu
145 150 155 160

His Leu Tyr Ile Ala Tyr Val Asn Thr Asp Glu Glu Phe Glu Glu Asp
165 170 175

Thr Ala Thr Val His Ile Gly Asn Lys Leu Asp Ile Asn Gly Ile Pro
180 185 190

Pro Asn Met Cys Ala Thr Arg Thr Ile Asn
195 200

<210> 9
<211> 1047
<212> DNA
<213> Variola major virus cepa Bangladesh

<220>
<221> gene
<222> (1)..(1047)
<223> Gen G2R

<400> 9
atgaagtccg tattatactt gtatatattg tttctctcat gtataataaa cggaagagat
60

gcagcacccgt atacaccacc caatggaaag tgtaaagaca ccgaatacaa acgccataat
120

ctgtgttggt tatcgtgtcc tccgggaaca tacgcttcca gattatgtga tagcaagact
180

aacacacaat gtacaccgtg tggttcgggt acctttacat ctcgcaataa tcatttacc
240

gcttgtctaa gttgtaacgg aagatgcaat agtaatcagg tagagacgg atcgtgtaac
300

acgactcaca atagaatctg tgaatgctct cccggatatt attgtcttct taaaggatca
360

tccggatgca aggcattgtg ttcccaaaca aaatgtggaa taggatacgg agtatccgga
420

cacacgtctg ttggagacgt catctgttct ccggtgtggt tcggaacata ttctcacacc
480

gtctcttccg cagataaatg cgaaccgta cccaacaata catttaacta tatcgaatgt
540

gaaattacac tgtatccagt taacgacaca tcgtgtactc ggacgaccac taccggctct
600

agcgaatoca tcttaacgtc ggaactaact attactatga atcatacaga ttgcaatccc
660

gtatttcgtg aggaatactt ctctgtcctt aataaggtag caacttcagg attttttaca
720

ggagaaaata gatatcaaaa tatttcaaag gtgtgtactt taaattttga gattaaatgt

ES 2 429 639 A1

780

aataacaaag gttcttcctt caaacagcta acgaaagcaa agaatgatga cggatgatg
840

tcgcattcgg agacggtaac tctagcgggt gactgtctat ctagcgtcga catctatata
900

ctatatagta ataccaatgc tcaagactac gaaactgata caatctctta tcgtgtgggt
960

aatggtctcg atgatgatag ccatatgccc ggtagttgca atatacataa accgatcact
1020

aattccaaac ccaccgctt tttatag
1047

<210> 10
<211> 348
<212> PRT
<213> Variola major virus cepa Bangladesh

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(348)
<223> Cytokine Response Modifier B (CrmB)

<400> 10

Met Lys Ser Val Leu Tyr Leu Tyr Ile Leu Phe Leu Ser Cys Ile Ile
1 5 10 15

Asn Gly Arg Asp Ala Ala Pro Tyr Thr Pro Pro Asn Gly Lys Cys Lys
20 25 30

Asp Thr Glu Tyr Lys Arg His Asn Leu Cys Cys Leu Ser Cys Pro Pro
35 40 45

Gly Thr Tyr Ala Ser Arg Leu Cys Asp Ser Lys Thr Asn Thr Gln Cys
50 55 60

Thr Pro Cys Gly Ser Gly Thr Phe Thr Ser Arg Asn Asn His Leu Pro
65 70 75 80

Ala Cys Leu Ser Cys Asn Gly Arg Cys Asn Ser Asn Gln Val Glu Thr
85 90 95

Arg Ser Cys Asn Thr Thr His Asn Arg Ile Cys Glu Cys Ser Pro Gly
100 105 110

Tyr Tyr Cys Leu Leu Lys Gly Ser Ser Gly Cys Lys Ala Cys Val Ser
115 120 125

Gln Thr Lys Cys Gly Ile Gly Tyr Gly Val Ser Gly His Thr Ser Val
130 135 140

ES 2 429 639 A1

Gly Asp Val Ile Cys Ser Pro Cys Gly Phe Gly Thr Tyr Ser His Thr
 145 150 155 160

Val Ser Ser Ala Asp Lys Cys Glu Pro Val Pro Asn Asn Thr Phe Asn
 165 170 175

Tyr Ile Asp Val Glu Ile Thr Leu Tyr Pro Val Asn Asp Thr Ser Cys
 180 185 190

Thr Arg Thr Thr Thr Thr Gly Leu Ser Glu Ser Ile Leu Thr Ser Glu
 195 200 205

Leu Thr Ile Thr Met Asn His Thr Asp Cys Asn Pro Val Phe Arg Glu
 210 215 220

Glu Tyr Phe Ser Val Leu Asn Lys Val Ala Thr Ser Gly Phe Phe Thr
 225 230 235 240

Gly Glu Asn Arg Tyr Gln Asn Ile Ser Lys Val Cys Thr Leu Asn Phe
 245 250 255

Glu Ile Lys Cys Asn Asn Lys Gly Ser Ser Phe Lys Gln Leu Thr Lys
 260 265 270

Ala Lys Asn Asp Asp Gly Met Met Ser His Ser Glu Thr Val Thr Leu
 275 280 285

Ala Gly Asp Cys Leu Ser Ser Val Asp Ile Tyr Ile Leu Tyr Ser Asn
 290 295 300

Thr Asn Ala Gln Asp Tyr Glu Thr Asp Thr Ile Ser Tyr Arg Val Gly
 305 310 315 320

Asn Val Leu Asp Asp Asp Ser His Met Pro Gly Ser Cys Asn Ile His
 325 330 335

Lys Pro Ile Thr Asn Ser Lys Pro Thr Arg Phe Leu
 340 345

- <210> 11
- <211> 1068
- <212> DNA
- <213> Cowpox virus cepa Brighton Red

- <220>
- <221> gene
- <222> (1)..(1068)
- <223> Gen V005

<400> 11
 atgaagtcat atatattgct attgctgctt tcatgtataa tcataataaa cagcgatata

ES 2 429 639 A1

60

acaccgcatg aaccatccaa cggaaagtgt aaagacaacg aatacaaacg ccatcatcta
120

tgttgtttat cgtgtcctcc gggaaacatac gcttccagat tatgcgatag caagactaac
180

acaaacacac aatgtacgcc gtgtgcgctg gacaccttta cgtctcgcaa taatcattta
240

cccgtttgtc taagttgtaa cggaagatgc gatagtaatc aggtagagac gcgatcgtgt
300

aacacgactc acaatagaat ctgtgattgt gctcccggat attattgttt tctcaaagga
360

tcatccggat gcaaggcatg tgtttcccaa acaaagtgtg gaataggata cggagtatcc
420

ggacacacgc ctaccggaga cgtcgtctgt tctccgtgtg gtctcggaac atattctcac
480

accgtctctt ccgtagataa atgcgaaccc gtaccocagta atacctttaa ctatatcgat
540

gtggaaatta atctgtatcc cgtcaacgac acatcgtgta ctcgacgac cactaccggt
600

ctcagtgaat ccactcaac ttccggaacta acgattacta tgaatcataa agactcggat
660

cccgtctttc gtaatggata cttctccggt cttaatgagg tagcaacttc agggttcttt
720

acaggacaaa atagatatca gaatatttca aaggatgca ctctgaattt cgagattaaa
780

tgtaataaca aagattctta ttcttctctc aaacagttaa cgaaaacaaa gaatgatgac
840

gactccatca tgccgcattc ggaatcggta actctagtgg gcgactgtct atccagcgtc
900

gacatctata tactatatag taataccaat actcaagact acgaaactga tacaatctct
960

tatcatgtgg gtaatgttct cgatgtcgat agccatatgc ccggtagggt cgatacacat
1020

aaactgatta ctaattccaa ttcccagtat ccacccact ttttatag
1068

<210> 12
<211> 355
<212> PRT
<213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(355)
<223> Cytokine Response Modifier B (CrmB)

<400> 12

ES 2 429 639 A1

Met Lys Ser Tyr Ile Leu Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ile Ile Ile Ile
 1 5 10 15

Asn Ser Asp Ile Thr Pro His Glu Pro Ser Asn Gly Lys Cys Lys Asp
 20 25 30

Asn Glu Tyr Lys Arg His His Leu Cys Cys Leu Ser Cys Pro Pro Gly
 35 40 45

Thr Tyr Ala Ser Arg Leu Cys Asp Ser Lys Thr Asn Thr Asn Thr Gln
 50 55 60

Cys Thr Pro Cys Ala Ser Asp Thr Phe Thr Ser Arg Asn Asn His Leu
 65 70 75 80

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Asn Gly Arg Cys Asp Ser Asn Gln Val Glu
 85 90 95

Thr Arg Ser Cys Asn Thr Thr His Asn Arg Ile Cys Asp Cys Ala Pro
 100 105 110

Gly Tyr Tyr Cys Phe Leu Lys Gly Ser Ser Gly Cys Lys Ala Cys Val
 115 120 125

Ser Gln Thr Lys Cys Gly Ile Gly Tyr Gly Val Ser Gly His Thr Pro
 130 135 140

Thr Gly Asp Val Val Cys Ser Pro Cys Gly Leu Gly Thr Tyr Ser His
 145 150 155 160

Thr Val Ser Ser Val Asp Lys Cys Glu Pro Val Pro Ser Asn Thr Phe
 165 170 175

Asn Tyr Ile Asp Val Glu Ile Asn Leu Tyr Pro Val Asn Asp Thr Ser
 180 185 190

Cys Thr Arg Thr Thr Thr Thr Gly Leu Ser Glu Ser Ile Ser Thr Ser
 195 200 205

Glu Leu Thr Ile Thr Met Asn His Lys Asp Cys Asp Pro Val Phe Arg
 210 215 220

Asn Gly Tyr Phe Ser Val Leu Asn Glu Val Ala Thr Ser Gly Phe Phe
 225 230 235 240

Thr Gly Gln Asn Arg Tyr Gln Asn Ile Ser Lys Val Cys Thr Leu Asn
 245 250 255

Phe Glu Ile Lys Cys Asn Asn Lys Asp Ser Tyr Ser Ser Ser Lys Gln

ES 2 429 639 A1

260	265	270
Leu Thr Lys Thr Lys Asn Asp Asp Asp Ser Ile Met Pro His Ser Glu 275 280 285		
Ser Val Thr Leu Val Gly Asp Cys Leu Ser Ser Val Asp Ile Tyr Ile 290 295 300		
Leu Tyr Ser Asn Thr Asn Thr Gln Asp Tyr Glu Thr Asp Thr Ile Ser 305 310 315 320		
Tyr His Val Gly Asn Val Leu Asp Val Asp Ser His Met Pro Gly Arg 325 330 335		
Cys Asp Thr His Lys Leu Ile Thr Asn Ser Asn Ser Gln Tyr Pro Thr 340 345 350		
His Phe Leu 355		

<210> 13
 <211> 582
 <212> DNA
 <213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(582)
 <223> Gen V218

<400> 13
 atgatgatat acggattaat agcctgtcctt atattcgtga cttcatccac cgctagtcctc
 60
 ctttacatcc ccgttattcc acccattacg gaagataaat cgtttaatag tgtagaggta
 120
 ttagtctctt tgtttagaga tgagcaaaaa gactatactg taacttcgca gttcaataac
 180
 tacactatcg ataccaaaga ctggactatc aacgtactat ccacacctga tggctctggag
 240
 ataccattga ccaatataac ttattgggtca cggtttccaa ctatagggtca tgcattgttc
 300
 aaatcagagt ccgaggatat cttccaaaag aacatgagta ttctaggtgt ctctattgaa
 360
 tgtaagaagc catcgacatc atttactttt ttgaccgtgc gtaaaaatc tcgagtattt
 420
 aatagatttc cagatatggc ttactatcga ggagactgtc tagaagtcgt ttatgtaaca
 480
 atgacttata aaaatactaa aactggagag actgattaca catacctctc taatgtgggg
 540

ES 2 429 639 A1

attcctgaat actatcgggt gatgagtggg gtcgatgggt ga
582

<210> 14
<211> 193
<212> PRT
<213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(193)
<223> SCP-3

<400> 14

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

Thr Ala Ser Pro Leu Tyr Ile Pro Val Ile Pro Pro Ile Thr Glu Asp
20 25 30

Lys Ser Phe Asn Ser Val Glu Val Leu Val Ser Leu Phe Arg Asp Glu
35 40 45

Gln Lys Asp Tyr Thr Val Thr Ser Gln Phe Asn Asn Tyr Thr Ile Asp
50 55 60

Thr Lys Asp Trp Thr Ile Asn Val Leu Ser Thr Pro Asp Gly Leu Glu
65 70 75 80

Ile Pro Leu Thr Asn Ile Thr Tyr Trp Ser Arg Phe Pro Thr Ile Gly
85 90 95

His Ala Leu Phe Lys Ser Glu Ser Glu Asp Ile Phe Gln Lys Asn Met
100 105 110

Ser Ile Leu Gly Val Ser Ile Glu Cys Lys Lys Pro Ser Thr Ser Phe
115 120 125

Thr Phe Leu Thr Val Arg Lys Ile Ser Arg Val Phe Asn Arg Phe Pro
130 135 140

Asp Met Ala Tyr Tyr Arg Gly Asp Cys Leu Glu Val Val Tyr Val Thr
145 150 155 160

Met Thr Tyr Lys Asn Thr Lys Thr Gly Glu Thr Asp Tyr Thr Tyr Leu
165 170 175

Ser Asn Val Gly Ile Pro Glu Tyr Tyr Arg Leu Met Ser Gly Val Asp
180 185 190

Gly

ES 2 429 639 A1

<210> 15
<211> 573
<212> DNA
<213> Vaccinia virus cepa Western Reserve

<220>
<221> gene
<222> (1)..(573)
<223> Gen VACWR206

<400> 15
atgatgatat acggattaat agcgtgtcctt atattcgtga cttcatccat cgctagtcca
60

ctttatattc cggttattcc acccatttcg gaagataaat cgttcaatag tgtagaggta
120

ttagtttcct tgtttagaga tgaccaaaaa gactatacgg taacttctca gttcaataac
180

tacactatcg ataccaaaga ctggactatc ggcgtactat ccacacctga tggtttggat
240

ataccattga ctaatataac ttattggcca cggtttacta taggtcgtgc attgttcaaa
300

tcagagtctg aggatatttt ccaaaagaaa atgagtattc taggtgttcc tatagaatgt
360

aagaagtcgt cgacattact tacttttttg accgtgcgta aatgactcg agtatttaat
420

aaatttcag atatggctta ttatcgagga gactgtttaa aagccgttta tgtaacaatg
480

acttataaaa atactaaaac tggagagact gattacacgt acctctctaa tgggggggttg
540

cctgcatact atcgtaatgg ggtcgatggg tga
573

<210> 16
<211> 190
<212> PRT
<213> Vaccinia virus cepa Western Reserve

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(190)
<223> SCP-3

<400> 16

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

Ile Ala Ser Pro Leu Tyr Ile Pro Val Ile Pro Pro Ile Ser Glu Asp
20 25 30

ES 2 429 639 A1

Lys Ser Phe Asn Ser Val Glu Val Leu Val Ser Leu Phe Arg Asp Asp
 35 40 45
 Gln Lys Asp Tyr Thr Val Thr Ser Gln Phe Asn Asn Tyr Thr Ile Asp
 50 55 60
 Thr Lys Asp Trp Thr Ile Gly Val Leu Ser Thr Pro Asp Gly Leu Asp
 65 70 75 80
 Ile Pro Leu Thr Asn Ile Thr Tyr Trp Ser Arg Phe Thr Ile Gly Arg
 85 90 95
 Ala Leu Phe Lys Ser Glu Ser Glu Asp Ile Phe Gln Lys Lys Met Ser
 100 105 110
 Ile Leu Gly Val Ser Ile Glu Cys Lys Lys Ser Ser Thr Leu Leu Thr
 115 120 125
 Phe Leu Thr Val Arg Lys Met Thr Arg Val Phe Asn Lys Phe Pro Asp
 130 135 140
 Met Ala Tyr Tyr Arg Gly Asp Cys Leu Lys Ala Val Tyr Val Thr Met
 145 150 155 160
 Thr Tyr Lys Asn Thr Lys Thr Gly Glu Thr Asp Tyr Thr Tyr Leu Ser
 165 170 175
 Asn Gly Gly Leu Pro Ala Tyr Tyr Arg Asn Gly Val Asp Gly
 180 185 190

<210> 17
 <211> 549
 <212> DNA
 <213> Vaccinia virus cepa Western Reserve

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(549)
 <223> Gene VACWR189

<400> 17
 atgtataaaa aactaataac gtttttattt gtaatagggtg cattagcatc ctattcgaat
 60
 aatgagtaca ctccgtttaa taaactgagt gtaaaaactct atatagatgg agtagataat
 120
 atagaaaatt catatactga tgataataat gaattgggtgt taaatttttaa agagtacaca
 180
 atttctatta ttacagagtc atgcgacgtc ggatttgatt ccatagatat agatgttata
 240
 aacgactata aaattattga tatgtataacc attgactcgt ctactattca acgcagaggt

ES 2 429 639 A1

300

cacacgtgta gaatatctac caaattatca tgccattatg ataagtaccc ttatattcac
360

aaatatgatg gtgatgagcg acaatattct attactgcag agggaaaatg ctataaagga
420

ataaaatatg aaataagtat gatcaacgat gatactctat tgagaaaaca tactcttaaa
480

attggatcta cttatatatt tgatcgtcat ggacatagta atacatatta ttcaaaatat
540

gattttttaa
549

<210> 18
<211> 182
<212> PRT
<213> Vaccinia virus cepa Western Reserve

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(182)
<223> SCP-2

<400> 18

Met Tyr Lys Lys Leu Ile Thr Phe Leu Phe Val Ile Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ser Tyr Ser Asn Asn Glu Tyr Thr Pro Phe Asn Lys Leu Ser Val Lys
20 25 30

Leu Tyr Ile Asp Gly Val Asp Asn Ile Glu Asn Ser Tyr Thr Asp Asp
35 40 45

Asn Asn Glu Leu Val Leu Asn Phe Lys Glu Tyr Thr Ile Ser Ile Ile
50 55 60

Thr Glu Ser Cys Asp Val Gly Phe Asp Ser Ile Asp Ile Asp Val Ile
65 70 75 80

Asn Asp Tyr Lys Ile Ile Asp Met Tyr Thr Ile Asp Ser Ser Thr Ile
85 90 95

Gln Arg Arg Gly His Thr Cys Arg Ile Ser Thr Lys Leu Ser Cys His
100 105 110

Tyr Asp Lys Tyr Pro Tyr Ile His Lys Tyr Asp Gly Asp Glu Arg Gln
115 120 125

Tyr Ser Ile Thr Ala Glu Gly Lys Cys Tyr Lys Gly Ile Lys Tyr Glu
130 135 140

ES 2 429 639 A1

Ile Ser Met Ile Asn Asp Asp Thr Leu Leu Arg Lys His Thr Leu Lys
145 150 155 160

Ile Gly Ser Thr Tyr Ile Phe Asp Arg His Gly His Ser Asn Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ser Lys Tyr Asp Phe
180

<210> 19
<211> 546
<212> DNA
<213> Ectromelia virus cepa Naval

<220>
<221> gene
<222> (1)..(546)
<223> Gen E184

<400> 19
atgtataaaa aactaataac gtttttattt gtaatagggtg cagtagcatc ttattcgaat
60

aatgagtaca ctccgtttta taaacttagt gtaaaactgt atatagatgg agtagataat
120

atagaaaatt catatactga taataatgaa ttgggtgtaa attttaaaga gtacacaatt
180

tctattatta cagagtcacg cgacgtcgga tttgattcca tagatataga tgttataaac
240

gactataaaa ttcttgatat gtataccatt gactcgtcta ccattcaacg cagaggtcac
300

acatgcaaaa tatctaccaa attatcatgc cattatgata agcaccctta tattcacaaa
360

tatgaggggtg atgagcgcaca atattctatt actgcagagg gaaaatgcta taaaggaata
420

aaatatgaaa taagtatgat gcacgatgat acgctattga gaaaacatac tcttaaaatt
480

ggatctactt atatattcga tcgccatgga catagtaata catattattc aaaatatgat
540

ttttaa
546

<210> 20
<211> 181
<212> PRT
<213> Ectromelia virus cepa Naval

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(181)
<223> SCP-2

ES 2 429 639 A1

<400> 20

Met Tyr Lys Lys Leu Ile Thr Phe Leu Phe Val Ile Gly Ala Val Ala
 1 5 10 15

Ser Tyr Ser Asn Asn Glu Tyr Thr Pro Phe Asn Lys Leu Ser Val Lys
 20 25 30

Leu Tyr Ile Asp Gly Val Asp Asn Ile Glu Asn Ser Tyr Thr Asp Asn
 35 40 45

Asn Glu Leu Val Leu Asn Phe Lys Glu Tyr Thr Ile Ser Ile Ile Thr
 50 55 60

Glu Ser Cys Asp Val Gly Phe Asp Ser Ile Asp Ile Asp Val Ile Asn
 65 70 75 80

Asp Tyr Lys Ile Leu Asp Met Tyr Thr Ile Asp Ser Ser Thr Ile Gln
 85 90 95

Arg Arg Gly His Thr Cys Lys Ile Ser Thr Lys Leu Ser Cys His Tyr
 100 105 110

Asp Lys His Pro Tyr Ile His Lys Tyr Glu Gly Asp Glu Arg Gln Tyr
 115 120 125

Ser Ile Thr Ala Glu Gly Lys Cys Tyr Lys Gly Ile Lys Tyr Glu Ile
 130 135 140

Ser Met Met His Asp Asp Thr Leu Leu Arg Lys His Thr Leu Lys Ile
 145 150 155 160

Gly Ser Thr Tyr Ile Phe Asp Arg His Gly His Ser Asn Thr Tyr Tyr
 165 170 175

Ser Lys Tyr Asp Phe
 180

<210> 21

<211> 480

<212> DNA

<213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>

<221> C_region

<222> (1)..(480)

<223> Dominio SECRET del Cytokine Response Modifier D (CmrD)

<400> 21

tcctttaaca gcatagatgt agaaattaat atgtatcctg ttaacaagac ctcttgtaat
 60

ES 2 429 639 A1

tcgagtatag gaagtagcag taccatatca acttccgagt taacaattac tctaaaacat
120

gaggattgta ctactgtctt tattggagat tactattcag tcgttgataa actagcaact
180

lcaggllllcl llacaaaacga laaaglacal caagacclca caacgcaglg caagallaal
240

ctagaaatca aatgtaattc tggaggagaa tctagacaac taacaccac gacgaaggta
300

tactttatgc ctattcaga aacggtaact gtggtaggag actgtctctc taatctcgat
360

gtctatatag tatatgcaa tacggacgcy atatattccg acatggatgt cgtcgcttat
420

catactagtt atatactaaa tgttgatcat attccaccaa atgattgtga aagagattga
480

<210> 22
<211> 159
<212> PRT
<213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(159)
<223> Dominio SECRET del Cytokine Response Modifier D (CrMD)

<400> 22

Ser Phe Asn Ser Ile Asp Val Glu Ile Asn Met Tyr Pro Val Asn Lys
1 5 10 15

Thr Ser Cys Asn Ser Ser Ile Gly Ser Ser Ser Thr Ile Ser Thr Ser
20 25 30

Glu Leu Thr Ile Thr Leu Lys His Glu Asp Cys Thr Thr Val Phe Ile
35 40 45

Gly Asp Tyr Tyr Ser Val Val Asp Lys Leu Ala Thr Ser Gly Phe Phe
50 55 60

Thr Asn Asp Lys Val His Gln Asp Leu Thr Thr Gln Cys Lys Ile Asn
65 70 75 80

Leu Glu Ile Lys Cys Asn Ser Gly Gly Glu Ser Arg Gln Leu Thr Pro
85 90 95

Thr Thr Lys Val Tyr Phe Met Pro His Ser Glu Thr Val Thr Val Val
100 105 110

Gly Asp Cys Leu Ser Asn Leu Asp Val Tyr Ile Val Tyr Ala Asn Thr
115 120 125

ES 2 429 639 A1

Asp Ala Ile Tyr Ser Asp Met Asp Val Val Ala Tyr His Thr Ser Tyr
130 135 140

Ile Leu Asn Val Asp His Ile Pro Pro Asn Asp Cys Glu Arg Asp
145 150 155

<210> 23
<211> 477
<212> DNA
<213> Ectromelia virus cepa Naval

<220>
<221> C_region
<222> (1)..(477)
<223> Dominio SECRET del Cytokine Response Modifier D (CrMD)

<400> 23
tcctttaaca gcatagatgt agaaattaat atgtatcctg ttaacaagac ctcttgtaat
60

togagtatag gaagcagcag taccatatca acttccgagt taacaattac tctaacacat
120

gaggattgta ctctgtctt tattggagat tactattcag tcgttgataa actagcaact
180

tcaggtttct ttacaaacga taaagtacat caagacctca caacgcagtg caagattaat
240

ctagaaatca aatgtaattc tggaagagaa tctagacaac taacaccac gacgaaggta
300

tacottatgc ctcatcaga aacggtaact gtggtaggag actgtctctc taatctcgat
360

gtctatatag tatatgcaa tacggacgcg atatattccg acatggacgt cgtcgcgat
420

catactagtt atatactaaa tgttgatcat attccaccaa atgattgtga aagagat
477

<210> 24
<211> 159
<212> PRT
<213> Ectromelia virus cepa Naval

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(159)
<223> Dominio SECRET del Cytokine Response Modifier D (CrMD)

<400> 24

Ser Phe Asn Ser Ile Asp Val Glu Ile Asn Met Tyr Pro Val Asn Lys
1 5 10 15

Thr Ser Cys Asn Ser Ser Ile Gly Ser Ser Ser Thr Ile Ser Thr Ser
20 25 30

ES 2 429 639 A1

Glu Leu Thr Ile Thr Leu Thr His Glu Asp Cys Thr Pro Val Phe Ile
35 40 45

Gly Asp Tyr Tyr Ser Val Val Asp Lys Leu Ala Thr Ser Gly Phe Phe
50 55 60

Thr Asn Asp Lys Val His Gln Asp Leu Thr Thr Gln Cys Lys Ile Asn
65 70 75 80

Leu Glu Ile Lys Cys Asn Ser Gly Arg Glu Ser Arg Gln Leu Thr Pro
85 90 95

Thr Thr Lys Val Tyr Leu Met Pro His Ser Glu Thr Val Thr Val Val
100 105 110

Gly Asp Cys Leu Ser Asn Leu Asp Val Tyr Ile Val Tyr Ala Asn Thr
115 120 125

Asp Ala Ile Tyr Ser Asp Met Asp Val Val Ala Tyr His Thr Ser Tyr
130 135 140

Ile Leu Asn Val Asp His Ile Pro Pro Asn Asp Cys Glu Arg Asp
145 150 155

<210> 25
<211> 546
<212> DNA
<213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>
<221> C_region
<222> (1)..(546)
<223> Dominio SECRET del Cytokine Response Modifier B (CrmB)

<400> 25
acctttaact atatcgatgt ggaaattaat ctgtatcccg tcaacgacac atcgtgtact
60

cggaacgacca ctaccggtct cagtgaatcc atctcaactt cggaactaac gattactatg
120

aatcataaag actgcatcc cgtctttcgt aatggatact tctccgttct taatgaggta
180

gcaacttcag ggctctttac aggacaaaat agatatacaga atatttcaaa ggtatgcact
240

ctgaatttcg agattaaatg taataacaaa gattcttatt cttctctcaa acagttaacg
300

aaaacaaaga atgatgacga ctccatcatg ccgcattcgg aatcggtaac tctagtgggc
360

gactgtctat ccagcgtcga catctatata ctatatagta ataccaatac tcaagactac
420

ES 2 429 639 A1

gaaactgata caatctctta tcatgtgggt aatgttctcg atgtcgatag ccatatgccc
480

ggtagggtgcg atacacataa actgattact aattccaatt cccagtatcc caccacttt
540

LLaLaG
546

<210> 26
<211> 181
<212> PRT
<213> Cowpox virus cepa Brighton Red

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(181)
<223> Dominio SECRET del Cytokine Response Modifier B (CrmB)

<400> 26

Thr Phe Asn Tyr Ile Asp Val Glu Ile Asn Leu Tyr Pro Val Asn Asp
1 5 10 15

Thr Ser Cys Thr Arg Thr Thr Thr Thr Gly Leu Ser Glu Ser Ile Ser
20 25 30

Thr Ser Glu Leu Thr Ile Thr Met Asn His Lys Asp Cys Asp Pro Val
35 40 45

Phe Arg Asn Gly Tyr Phe Ser Val Leu Asn Glu Val Ala Thr Ser Gly
50 55 60

Phe Phe Thr Gly Gln Asn Arg Tyr Gln Asn Ile Ser Lys Val Cys Thr
65 70 75 80

Leu Asn Phe Glu Ile Lys Cys Asn Asn Lys Asp Ser Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Gln Leu Thr Lys Thr Lys Asn Asp Asp Asp Ser Ile Met Pro His
100 105 110

Ser Glu Ser Val Thr Leu Val Gly Asp Cys Leu Ser Ser Val Asp Ile
115 120 125

Tyr Ile Leu Tyr Ser Asn Thr Asn Thr Gln Asp Tyr Glu Thr Asp Thr
130 135 140

Ile Ser Tyr His Val Gly Asn Val Leu Asp Val Asp Ser His Met Pro
145 150 155 160

Gly Arg Cys Asp Thr His Lys Leu Ile Thr Asn Ser Asn Ser Gln Tyr
165 170 175

ES 2 429 639 A1

Pro Thr His Phe Leu
180

<210> 27
<211> 528
<212> DNA
<213> Variola major virus cepa Bangladesh

<220>
<221> C_region
<222> (1)..(528)
<223> Dominio SECRET del Cytokine Response Modifier B (CrmB)

<400> 27
acatttaact atactgatgt ggaaattaca ctgtatccag ttaacgacac atcgtgtact
60
cggacgacca ctaccggtct cagcgaatcc atcttaacgt cggaactaac tattactatg
120
aatcatacag attgcaatcc cgtatttcgt gaggaatact tctctgtcct taataaggta
180
gcaacttcag gattttttac aggagaaaat agatatcaaa atatttcaaa ggtgtgtact
240
ttaaattttg agattaaatg taataacaaa ggttcttctt tcaaacagct aacgaaagca
300
aagaatgatg acggtatgat gtcgcattcg gagacggtaa ctctagcggg tgactgtcta
360
tctagcgtcg acatctatat actatatagt aataccaatg ctcaagacta cgaaactgat
420
acaatctctt atcgtgtggg taatgttctc gatgatgata gccatagcc cggtagttgc
480
aatatacata aaccgatcac taattccaaa cccaccgct ttttatag
528

<210> 28
<211> 175
<212> PRT
<213> Variola major virus cepa Bangladesh

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(175)
<223> Dominio SECRET del Cytokine Response Modifier B (CrmB)

<400> 28

Thr Phe Asn Tyr Ile Asp Val Glu Ile Thr Leu Tyr Pro Val Asn Asp
1 5 10 15

Thr Ser Cys Thr Arg Thr Thr Thr Gly Leu Ser Glu Ser Ile Leu
20 25 30

ES 2 429 639 A1

Thr Ser Glu Leu Thr Ile Thr Met Asn His Thr Asp Cys Asn Pro Val
35 40 45

Phe Arg Glu Glu Tyr Phe Ser Val Leu Asn Lys Val Ala Thr Ser Gly
50 55 60

Phe Phe Thr Gly Glu Asn Arg Tyr Gln Asn Ile Ser Lys Val Cys Thr
65 70 75 80

Leu Asn Phe Glu Ile Lys Cys Asn Asn Lys Gly Ser Ser Phe Lys Gln
85 90 95

Leu Thr Lys Ala Lys Asn Asp Asp Gly Met Met Ser His Ser Glu Thr
100 105 110

Val Thr Leu Ala Gly Asp Cys Leu Ser Ser Val Asp Ile Tyr Ile Leu
115 120 125

Tyr Ser Asn Thr Asn Ala Gln Asp Tyr Glu Thr Asp Thr Ile Ser Tyr
130 135 140

Arg Val Gly Asn Val Leu Asp Asp Asp Ser His Met Pro Gly Ser Cys
145 150 155 160

Asn Ile His Lys Pro Ile Thr Asn Ser Lys Pro Thr Arg Phe Leu
165 170 175



- ②① N.º solicitud: 201230540
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.04.2012
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2315037 A1 (ANTONIO ALCAMÍ PERTEJO) 16.03.2009, página 3, línea 10 – página 5, línea 53; reivindicaciones 1-8,14; secuencias SEQ ID NO: 6,8,14,16,18,20,22,24,26,28.	1-12
A	WO 0071150 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 30.11.2000, página 1, línea 1 – página 7, línea 12; página 158, línea 8 – página 167, línea 27; ejemplos 1-4,7.	1-12
A	US 5464938 A (SMITH CA & GOODWIN RG.) 07.11.1995, columnas 1-5,13; ejemplos 10-13.	1-12
A	WO 03038440 A2 (CAMBRIDGE UNIVERSITY TECHNICAL SERVICES LIMITED [GB/GB]) 08.05.2003, resumen; reivindicaciones 1-23.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.07.2013

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/065 (2006.01)

A61K38/00 (2006.01)

A61P37/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, JPO PATENT DATABASE, PUBMED, EBI, D-GENE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.07.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2315037 A1	16.03.2009
D02	WO 0071150 A1	30.11.2000
D03	US 5464938 A	07.11.1995
D04	WO 03038440 A2	08.05.2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga el uso de un dominio SECRET de una proteína seleccionada entre CrmB, CrmD, SCP-1, SCP-2 y SCP-3, para fabricación de un medicamento para tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias. Dicho dominio corresponde a las secuencias definidas como SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 28 (reivindicaciones 1-6). Se refiere también al uso de este dominio fusionado a un vTNFR, que puede ser CrmB, CrmD o de origen humano, o a un anticuerpo humanizado anti-TNF (reivindicaciones 7-10), pudiendo incorporar el medicamento un agente inmunosupresor, un antiinflamatorio o un anticuerpo (reivindicaciones 11-12).

El documento D01 divulga un dominio C-terminal (CTD) del factor necrosante de tumores (TNF), codificados por poxvirus y denominados CrmB, CrmD, CTD-1, CTD -2 y CTD-3, que puede ir unido a una secuencia polipeptídica del mismo o diferente origen. Se refiere también al uso de dicho dominio o polipéptido para fabricar un medicamento, o en una composición farmacéutica, para tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (ver página 3, línea 10 - página 5, línea 53; reivindicaciones 1-8, 14; secuencias SEQ ID NO: 6, 8, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28).

El documento D02 divulga un gen humano que codifica para un polipéptido relacionado con los receptores TNF, denominado receptor factor necrosante de tumores 5 (TNFR-5) y su uso para elaboración de productos terapéuticos y en métodos de diagnóstico (ver página 1, línea 1 - página 7, línea 12; página 158, línea 8 - página 167, línea 27; ejemplos 1-4, 7).

El documento D03 divulga proteínas virales antagonistas de citoquinas, así como métodos de obtención de estas proteínas y su uso en composiciones farmacéuticas para regulación de la respuesta inmune (ver columnas 1-5; columna 13; ejemplos 10-13).

El documento D04 divulga una familia de glicoproteínas procedentes de herpesvirus alfa denominadas proteínas gG que muestran capacidad de unión a quimioquinas. Se refiere también a su uso en la elaboración de un medicamento para tratamiento de enfermedades producidas por infecciones víricas o relacionadas con actividad de las quimioquinas (ver resumen; reivindicaciones 1-23).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto de la presente invención es el uso de un dominio SECRET de una proteína seleccionada entre CrmB, CrmD, SCP-1, SCP-2 y SCP-3, para fabricación de un medicamento para tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias. Dicho dominio corresponde a las secuencias definidas como SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 28.

1.1. REIVINDICACIONES 1-12

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica ya que anticipa el uso de un dominio C-terminal (CTD) del factor necrosante de tumores (TNF), codificados por poxvirus y denominados CrmB, CrmD, CTD-1, CTD -2 y CTD-3, para elaboración de un medicamento para tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Aunque en el documento D01 el dominio C-terminal se denomina CTD y en la presente invención SECRET, este dominio corresponde a las mismas secuencias definidas como SEQ ID NO: 6, 8, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 que se encuentran divulgadas en D01.

En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1-12 se encuentra anticipado en D01. La capacidad de unión a GAGs del dominio SECRET es un modo de acción o actividad biológica lo que no constituye una característica técnica.

Por tanto, según lo expuesto en el documento D01, las reivindicaciones 1-12 no cumplen con los requisitos de novedad y de actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D02 y D03 anticipan polipéptidos relacionados con los receptores TNF y proteínas virales antagonistas de citoquinas, refiriéndose también a su uso en la elaboración de medicamentos para regulación de la respuesta inmune, así como a su aplicación en combinación con otros productos terapéuticos.

Sin embargo, debido a que las secuencias divulgadas en estos documentos no se corresponden exactamente con las reivindicadas en la presente solicitud, se considera que los documentos D02, D03 y también el D04 se refieren al estado de la técnica no siendo relevantes en relación con el objeto de la invención.