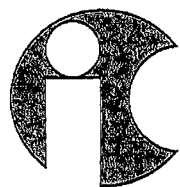


Cm



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-139622-00000-0000

Fecha: 2014-06-27 16:47:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 169

21. EXPEDIENTE No. _____

T = F = 169.

54. TÍTULO _____

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR ENFERMEDADES VIRALES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY

DOMICILIO PALO ALTO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

74. APODERADO C.C 35.456.344

22. BOGOTÁ, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-139622- -00000-0000

Fecha: 2014-06-27 16:47:22
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 169

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/068167	Fecha 2012/12/06
Publicación Internacional No.		WO 2013/086133 A1	Fecha 2013/06/13
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR ENFERMEDADES VIRALES			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 031/517			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		1705 El Camino Real, Palo Alto, California 94306, Estados Unidos de América	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Palo Alto	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		California	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN Estados Unidos de América
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1 EINAV		Shirit	Israelí
2 BAROUCH BENTOV		Rina	Estadounidense
3 NEVEU		Gregory	Francés
4 ZIVAV		Amotz	Israelí
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1.Estados Unidos de América	California	Palo Alto	1705 El Camino Real, Palo Alto, California 94306, Estados Unidos de América
2.Estados Unidos de América	California	Palo Alto	1705 El Camino Real, Palo Alto, California 94306, Estados Unidos de América
3.Estados Unidos de América	California	Palo Alto	1705 El Camino Real, Palo Alto, California 94306, Estados Unidos de América
4.Estados Unidos de América	California	Palo Alto	1705 El Camino Real, Palo Alto, California 94306, Estados Unidos de América
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)			

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO	
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia
		IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
U.S.A.		US	61/567,491	2011/12/06

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>	
☐ SI ☐ NO	
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.	

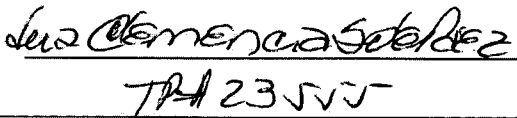
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>	
☐ SI ☐ NO	
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.	

13	REDUCCIÓN DE TASAS
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>	
☐ SI ☐ NO	
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.	
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐	
Universidades públicas o privadas ☐	
Entidades sin ánimo de lucro ☐	
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos	

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.	

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 14-0066539	Fecha 2014/06/24
		N° 14-0066818	Fecha 2014/06/25

16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>	

Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	Firma 
C.C 35.456.344 de Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 118 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 17 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 35 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital. Documentación Jurídica 9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$515.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 7 reivindicaciones adicionales a 10. por \$217.000	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2013/086133 A1

(43) International Publication Date
13 June 2013 (13.06.2013)

(51) International Patent Classification:
A61K 31/517 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/068167

(22) International Filing Date:
6 December 2012 (06.12.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/567,491 6 December 2011 (06.12.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY** [US/US]; 1705 El Camino Real, Palo Alto, CA 94306 (US).

(72) Inventors; and

(71) Applicants (for US only): **EINAV, Shirit** [IL/US]; 1705 El Camino Real, Palo Alto, CA 94306 (US). **BAROUCH-BENTOV, Rina** [US/US]; 1705 El Camino Real, Palo Alto, CA 94306 (US). **NEVEU, Gregory** [FR/US]; 1705 El Camino Real, Palo Alto, CA 94306 (US). **ZIVAV, Amotz** [IL/US]; 1705 El Camino Real, Palo Alto, CA 94306 (US).

(74) Agent: **FOSTER, David, C.**; SNR Denton US LLP, 7800 Willis Tower, 233 South Wacker Dr., Chicago, IL 60606 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING VIRAL DISEASES

(57) Abstract: The invention provides a method for treating viral infections and coinfections through the use of inhibitory agents that prevent a unique viral structural protein motifs from binding to host proteins from the clathrin adaptor proteins family and subsequently preventing viral replication.

WO 2013/086133 A1

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR ENFERMEDADES VIRALES

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense Ser. No. 61/567,491, presentada el 6 de diciembre de 2011, cuya divulgación completa se incorpora aquí como referencia.

DECLARACIÓN RESPECTO A INVESTIGACIÓN

PATROCINADA POR GOBIERNO FEDERAL

Esta invención se hizo con el apoyo del Gobierno bajo contrato AI079406 otorgado por el National Institutes of Health (Institutos Nacionales de la Salud). El Gobierno tiene algunos derechos en esta invención.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la virología. Más específicamente, la invención se relaciona con el tratamiento de enfermedades virales mediante la inhibición de interacciones de las proteínas adaptadoras de clatrina de célula huésped y motivos de YXXΦ o dileucina o su regulación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las infecciones humanas con Lentiviridae, tal como VIH, y Flaviviridae, tal como VHC, plantean desafíos significativos para la salud en general. Aunque los potentes fármacos anti-VHC están en el desarrollo clínico y las velocidades de respuesta a los regímenes basados en el interferón se han mejorado con la inclusión de los inhibidores de la proteasa (PI), la resistencia, las interacciones de fármaco-fármaco, y la toxicidad acumulativa continúan planteando desafíos. Las estrategias antivirales más efectivas todavía necesitan por lo tanto combatir las pandemias VHC. Además, las estrategias antivirales novedosas se necesitan para la inclusión en los regímenes de rescate para tratar el VIH en pacientes en los que falla la terapia antiretroviral altamente activa (HAART) debido al virus resistente.

RESUMEN DE LA INVENCION

Descrito de manera breve, las modalidades de esta divulgación incluyen compuestos, composiciones, composiciones farmacéuticas y métodos para tratar un huésped con una infección viral. En una modalidad, los virus susceptibles de acuerdo con la presente divulgación incluyen virus que comprenden por lo menos una proteína que comprende un motivo YXXΦ o un motivo de dileucina, referido aquí como "virus de unión a clatrina AP", Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión a clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión a clatrina AP

diferente de VHC, métodos para tratar la replicación de dicho virus en un huésped, métodos de inhibición de la unión de una proteína estructural viral que comprende los motivos YXX Φ o dileucina a subunidades huésped μ de complejos de clatrina AP1-AP4, tal como AP2M1, AP1M1, AP3M1 o AP4M1, métodos de tratamiento de la fibrosis hepática relacionada con la hepatitis viral en un huésped, y similares.

Un método ejemplar para tratar un huésped con una infección viral de los virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, entre otros, pueden incluir: administrar al huésped una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de inhibición para reducir la carga viral en el huésped. En una modalidad, el agente de inhibición se selecciona del grupo que consiste de agentes que inhiben de manera competitiva la unión entre una proteína viral que comprende los motivos YXX Φ o de dileucina y una proteína huésped seleccionada del grupo que consiste de las subunidades μ de clatrina AP1-AP4; y los agentes que inhiben la actividad de la proteína quinasa huésped de la quinasa que modula la actividad de las proteínas huésped seleccionadas del grupo que consiste de subunidades μ de clatrin AP1-AP4. Un método ejemplar para tratar la infección viral de los virus de unión de clatrin AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones VHC-VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, en un huésped, entre otros, pueden incluir: administrar un agente de inhibición al huésped que tiene dicha infección o infecciones virales. En

una modalidad, el agente de inhibición se selecciona del grupo que consiste de agentes que inhiben de manera competitiva la unión entre una proteína estructural viral que comprende los motivos YXX Φ o de dileucina y una proteína huésped seleccionada del grupo que consiste de AP2M1, y agentes que inhiben la actividad de la proteína quinasa huésped de las quinasas que modulan la actividad de las proteínas huésped seleccionadas del grupo que consiste de AP2M1 y otras subunidades μ de complejos de clatrina AP.

Un método ejemplar para inhibir la unión de los motivos YXX Φ o de dileucina con los polipéptidos huésped, entre otros, incluye administrar un agente de inhibición al huésped que tiene una infección viral. En una modalidad, el agente de inhibición se selecciona del grupo que consiste de agentes que inhiben de manera competitiva la unión entre una proteína estructural viral que comprende los motivos YXX Φ o de dileucina y una proteína huésped seleccionada del AP2M1 u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP, y agentes que inhiben la actividad de la proteína quinasa de las quinasas que modulan la actividad de las proteínas huésped seleccionadas del grupo que consiste de AP2M1 y/u otras subunidades μ de complejos de clatrin AP.

Una composición farmacéutica ejemplar para tratar un huésped que tiene una infección viral de virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, entre otros, pueden incluir un agente de inhibición.

En una modalidad, el agente de inhibición se selecciona del grupo que consiste de agentes que inhiben de manera competitiva la unión entre una proteína estructural viral que comprende los motivos YXX Φ o de dileucina y una proteína huésped seleccionada de AP2M1 y/u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP, y agentes que inhiben la actividad de la proteína quinasa que modula la actividad de las proteínas huésped seleccionadas del grupo que consiste de AP2M1 y/u otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP.

Una composición ejemplar, entre otras, incluye un agente de inhibición. En una modalidad, el agente de inhibición se selecciona del grupo que consiste de agentes que inhiben de manera competitiva la unión entre una proteína viral que comprende el motivo YXX Φ o de dileucina y una proteína huésped seleccionada del grupo que consiste de AP2M1 y/u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP, y agentes que inhiben la actividad de la proteína quinasa de la quinasa que modula la actividad de las proteínas huésped seleccionadas del grupo que consiste de AP2M1 y/u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar la co-infección de VHC-VIH mediante la administración de una cantidad efectiva de un agente que inhibe la unión de VHC y VIH a las proteínas huésped seleccionadas del grupo que consiste de AP2M1 y otras subunidades μ de los complejos de clatrin AP. En una modalidad, el agente de inhibición inhibe AAK1 o GAK. En otra modalidad, el agente se selecciona del grupo que consiste de

erlotinib, sunitinib y PKC-412. En otra modalidad, el agente evita la unión de una proteína estructural de Lentiviridae o Flaviviridae que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina a una proteína huésped seleccionada del grupo que consiste de AP2M1 y/u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP. En incluso otra modalidad, el agente inhibe AAK.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir las infecciones mediante por lo menos un primer diferente de VHC, otro elemento de Flaviviridae, o un elemento de Lentiviridae, o combinaciones de los mismos, mediante la administración a un paciente que necesita una cantidad efectiva de un agente que inhibe la unión de una proteína estructural a partir de un virus que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina con una proteína huésped seleccionada del grupo que consiste de AP2M1 y/u otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP. En una modalidad, el agente inhibe AAK1 o GAK. En otra modalidad, el agente se selecciona del grupo que consiste de erlotinib, sunitinib y PKC-412.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el cribado de agentes antivirales poniendo en contacto un virus susceptible como se describe aquí o una proteína viral con un agente candidato y una proteína seleccionada del grupo que consiste de AP2M1 y/u otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP, y determinar un efecto del agente candidato en la unión del virus con la proteína huésped.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el cribado de agentes antivirales poniendo en contacto un virus susceptible como se describe aquí con un agente candidato y una célula que expresa una proteína seleccionada del grupo que consiste de AP2M1 y otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP, y determinar el efecto del agente candidato en el montaje viral o brote. En una modalidad, el agente candidato inhibe la actividad de AAK1 o GAK.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir el montaje o brote de los virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones tales como co-infecciones VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferentes de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, en una célula huésped poniendo en contacto la célula huésped con un agente que previene la unión de una proteína estructural viral que contiene un motivo YXX Φ o de dileucina con una proteína huésped seleccionada del grupo que consiste de AP2M1 y otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP. En una modalidad, el agente bloquea la unión de la proteína estructural viral con la proteína huésped. En otra modalidad, el agente compite con la proteína estructural viral para unirse con la proteína huésped. En otra modalidad, el agente compite con la proteína huésped para unirse con la proteína estructural viral. En incluso otra modalidad, el método comprende el cribado de los inhibidores de AAK1 y GAK para virus de no Flaviviridae.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente descripción y se incluyen para demostrar mejor ciertos aspectos de la invención. La invención puede entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las modalidades específicas aquí presentadas:

La Figura 1: Muestra un núcleo viral con un motivo YXX Φ que une AP2M1. (A) Esquemas del núcleo. Se indica la localización del motivo identificado. (B)-(C) Secuencias de consenso de los motivos YXX Φ a partir de las proteínas representativas humana (B) y viral (C). (D) La secuencia de consenso de todos los aislamientos de VHC, clones se usan en este estudio, y los mutantes de núcleo diseñado. (E) Imágenes fluorescentes de un chip de microfluidos y esquemas. Izquierda: AP2M1-V5-his fue anclado a la superficie del dispositivo vía su interacción con los anticuerpos anti-His y se rotuló con anticuerpos anti-V5-FITC. Medio: núcleo etiquetado T7 o NS3 se incubaron con un límite superficial AP2M1 y rotulado con anticuerpos anti-T7-Cy3. Las interacciones fueron atrapadas mecánicamente mediante la señal MITOMI. Cy3 que representa una proteína viral unida se muestra después de un lavado. Derecho: una superposición de las señales Cy3 y FITC, que representana presa viral ligada con la proporción de cebo humano. Las curvas de unión in vitro F del núcleo T7 y NS3-T7 con AP2M1 de unión de superficie. El eje Y representa la proteína viral unida a la proporción AP2M1 de unión de superficie.

Figura 2: Muestra una unión de núcleo viral AP2M1 en células y en el contexto de la infección de VHC. (A) Esquemas del formato PCAs. A y B representan proteínas de presa y cebo, y GLuc1/2 son fragmentos de *Gaussia* Luciferasa. (B) Las células fueron co-transfectadas con combinaciones de plásmidos indicados debajo del párrafo con los indicados en la leyenda. El eje Y representa la luminiscencia relativa a la señal de núcleo-AP2M1. La barra con bandas a la derecha representa la unión de AP2M1 con la proteína de carga huésped TFR. (C) Unión del núcleo-AP2M1 en presencia de AP2M1 libre, núcleo o NESI. El eje Y representa la proporción de luminiscencia (la señal de luminiscencia promedio detectada en las células transfectadas con Gluc1-AP2M1 y Gluc2-núcleo divididos entre el promedio de la luminiscencia medida en las cavidades de control transfectadas con Gluc1-AP2M1 y un vector Gluc2 vacío con los transfectados con Gluc2-núcleo y un vector Gluc1 vacío relativo a la unión de núcleo-AP2M1 en presencia de PUC19 vacío. (D) Inmunoprecipitaciones (IPs) en membranas de células infectadas con VHC. Paneles izquierdos: Anticuerpos anti-AP2M1 o IgG se usaron para IP. Las membranas fueron inmunoelctrotransferidas con fosfo-AP2M1, anti-AP2M1, anti-núcleo, y anticuerpos anti-actina. Cal-A representa caliculina-A. Paneles derechos: Anticuerpos anti-núcleo o IgG se usaron para IP. Las membranas fueron inmunoelctrotransferidas con un anti-núcleo, anti-AP2M1, y anticuerpos anti-actina. (E) Imágenes de microscopía IF confocal representativa de AP2M1 y núcleo en células Huh-7.5 3 días posteriores a la ectroporación con J6/JFH VHC

ARN. Los datos representan medio $\pm$ s.d. (barras de error) de tres experimentos independientes por triplicado (n>20 en E). * p <0.05, ** p <0.01, *** p<0.001.

Figura 3: Muestra un motivo YXX Φ de núcleo que media la unión AP2M1 y el montaje viral, funcionalmente intercambiable con otras señales YXX Φ . (A) Unión de tipo natural (WT) y mutantes de núcleo con AP2M1 mediante PCAs. El eje Y representa una proporción de luminiscencia (la señal de luminiscencia promedio detectada en las células transfectadas con Gluc1-AP2M1 y las diversas formas de Gluc2-núcleo divididas entre el promedio de luminiscencia medido en las cavidades de control con Gluc1-AP2M1 y un vector Gluc2 vacío con los transfectados con el respectivo Gluc2-núcleo y un vector Gluc1 vacío) respecto a la unión de núcleo-AP2M1 WT. (B) La replicación de VHC ARN mediante ensayos de *Renilla* luciferasa en postelectoporación de 6 horas (blanco) y 72 horas (negro) con J6/JFH(p7-Rluc2A) que alberga las correspondientes mutaciones. Δ E1-E2 es un control defectuoso de montaje. GNN es un mutante de polimerasa defectuosa de replicación. (C) Inefectividad extracelular mediante ensayos de luciferasa en células nuevas Huh-7.5 infectadas con sobrenadantes derivados de las células electroporadas. (D) Inefectividad intracelular mediante ensayos de luciferasa en células nuevas Huh-7.5 infectadas con los lisados celulares clarificados derivados de células electroporadas. (E) Títulos de inefectividad intra y extracelular medidos limitando los ensayos de dilución. TCID₅₀ es una dosis infecciosa de cultivo tisular al 50%. (F) el ARN viral se libera en el sobrenadante del cultivo a 72 horas posteriores a la electroporación medido por qRT-PCR. (G) La proteína de núcleo

VHC se libera en el sobrenadante del cultivo a las 72 horas posteriores a la electroporación determinado por ELISA respecto al control WT. (H) Niveles de proteína del núcleo mediante análisis western en lisados preparados de células infectadas con el virus que hospeda las correspondientes mutaciones. Se muestra el medio y s.d. (barras de error) de resultados de por lo menos tres experimentos independientes por triplicado. Las líneas horizontales punteadas representan los niveles de fondo de la actividad de la luciferasa. La URL es relativa a las unidades de luz. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 4: Muestra la inhibición del montaje de VHC mediante reducción de AP2M1. (A) Niveles de proteína AP2M1 mediante análisis western cuantitativo en clones estables que hospedan constructos lentivirales shARN que tienen como objetivo el gen AP2M1 y una secuencia sin objetivo (NT). Se muestra una membrana representativa y los datos combinados de las tres mediciones independientes. El eje Y representa una proporción de AP2M1 a proteína actina respecto al control NT. (B) la proporción AP2M1/S18 ARN mediante qRT-PCR en clones estables seleccionado respecto al control NT. (C) Los clones indicados fueron electroporados con J6/JFH(p7-Rluc2A). La replicación VHC ARN en estos clones mediante ensayos de luciferasa posteriores a la electroporación a 9 horas (blanco) y 72 horas (negro). (D) Inefectividad extracelular medida mediante ensayos de luciferasa en células nuevas inoculadas con sobrenadantes derivados de varios clones de célula estable. (E) Inefectividad intracelular mediante ensayos de luciferasa en células nuevas Huh-7.5 infectadas con lisados celulares clarificados derivados de las células electroporadas. (F) Títulos de inefectividad

intra y extracelular medidos limitando los ensayos de dilución. TCID₅₀ es una dosis infecciosa de cultivo tisular al 50%. (G) El ARN viral se libera en el sobrenadante del cultivo a 72 horas posteriores a la electroporación medido por qRT-PCR. (H) La proteína de núcleo de VHC se libera en al sobrenadante del cultivo a 72 horas posteriores a la electroporación, como se determina mediante ELISA. (I) Producción viral infecciosa relativo al control NT (panel superior) y los niveles de la proteína AP2M1 mediante un análisis de western blot (panel inferior) en células concurrentemente transducidas con lentivirus que expresan cADN WT AP2M1 resistente a shAP2M1 y shARN (AP2M1-WT). Se muestra el medio y s.d. (barras de error) de los resultados de por lo menos tres experimentos independientes. La URL es las unidades relativas de luz. ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 5: Muestra que la interrupción de la unión de núcleo-AP2M1 suprime el reclutamiento de AP2M1 a LD y altera la localización subcelular del núcleo y su co-localización con E2. El análisis de inmunofluorescencia (IF) confocal cuantitativo de la localización subcelular del núcleo y AP2M1 y la co-localización del núcleo-E2 en las células Huh-7.5. (A) Una imagen fusionada representativa de AP2M1 endógeno (azul) y el marcador LD, Bodipy (verde), en células nuevas Huh-7.5. (B)-(D) Imágenes fusionadas de células Huh-7.5 infectadas con J6/JFH VHC manchado para el núcleo (rojo), el marcador LD, Bodipy (verde), y AP2M1 (azul). (E) Co-localización porcentual de las señales indicadas en células nuevas (blancas) o infectadas (negras) mediante un análisis cuantitativo de co-localización de (A)-(D). (F) Una imagen fusionada de cuatro canales. Las flechas amarillas en

el recuadro indican la co-localización del núcleo y AP2M1 a LD. (G)-(J) Imágenes fusionadas representativas y análisis de co-localización cuantitativa de AP2M1 (rojo) y el marcador de lípido, LipidTOX (azul), en células Huh-7.5 transfectadas con plásmidos que expresan AP2M1-mCherry solo (G) o AP2M1mCherry con núcleo WT (H) o mutante de núcleo Y136A (I). La expresión de núcleo (verde) en las células mostradas en los paneles (H) e (I) se demuestra en los respectivos paneles inferiores. (K)-(P) Imágenes fusionadas representativas y análisis cuantitativo de co-localización del núcleo (rojo) y Bodipy (verde), que demuestra una localización incrementada del núcleo a LD en células Huh-7.5 electroporadas con J6/JFH VHC ARN que hospeda la mutación de núcleo Y136A (panel derecho) comparado con el núcleo WT (panel izquierdo). (L) Bodipy (verde) en las células de control (NT) (panel izquierdo) o Huh-7.5 (panel derecho) agotado de AP2M1 electroporado con J6/JFH VHC ARN, que muestra una localización dramática del núcleo a LD en células agotadas de AP2M1. (M) TGN46 (verde), demostrando la localización disminuida del núcleo a TGN en células Huh-7.5 electroporadas con J6/JFH ARN hospedando la mutación de núcleo Y136A (panel derecho) comparado con el núcleo WT (panel izquierdo). (N) TGN46 (verde) en las células de control (NT) (panel izquierdo) o Huh-7.5 agotado de AP2M1 (panel derecho) electroporado con J6/JFH VHC ARN, que muestra la localización disminuida del núcleo de TGN en las células agotadas de AP2M1. (O) E2 (verde) que demuestra la co-localización disminuida del núcleo y E2 en células Huh-7.5 electroporadas con J6/JFH ARN que hospeda la mutación del núcleo Y136A (panel derecho) comparado con el núcleo WT (panel izquierdo). (P) E2 (verde) en células de control (NT) (panel izquierdo) o Huh-7.5 (panel derecho) agotado de AP2M1 con

J6/JFH VHC ARN, que muestra la co-localización disminuida del núcleo E2 en células agotadas de AP2M1. Se muestran las imágenes representativas en un aumento x60. Los gráficos representan un análisis cuantitativo de co-localización de pilas Z usando coeficientes de Manders. Los valores indican los valores medios M2 representados como co-localización porcentual (la fracción de la intensidad verde que coincide con la intensidad roja o en el caso de las Figuras (G)-(I), la fracción de la intensidad azul que coincide con la intensidad roja) $\pm$ s.d. (barras de error); n = 10-15. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figura 6: Muestra que AAK1 y GAK regulan la unión de núcleo-AP2M1 y se involucran en el montaje de VHC. (A) Mecanismos reguladores de la unión de AP2M1 con las proteínas de carga huésped que hospedan las señales YXX Φ . (B) Unión del núcleo con el tipo natural y mutante T156A AP2M1 mediante PCAs (negro) y microfluidos (blanco). (C)-(E) Los Huh-7.5 fueron transfectados con los plásmidos que codifican mutante WT o T156A AP2M1 y electroporado con J6/JFH(p7-Rluc2A) 48 horas posterior a la transfección. (C) Viabilidad celular mediante ensayos basados en azul alamar 48 horas posterior a la transfección relativa al control WT AP2M1. (D) Replicación de VHC ARN en células que sobreexpresan el mutante WT o T156A AP2M1 mediante ensayos de luciferasa 6 horas (negro) y 72 horas (blanco) posterior a la electroporación con J6/JFH(p7-Rluc2A). (E) Infectividad extracelular (negra) e intracelular (blanca) mediante ensayos de luciferasa en células nuevas Huh-7.5 infectadas con sobrenadantes o lisados celulares derivados de las células indicadas, respectivamente, relativo al

control WT. (F)-(G) Células Huh7.5 fueron transfectadas con los correspondientes siARNs. (F) Proporción de AAK1 (izquierda) o GAK (derecha) a S18 ARN en estas células relativo a las secuencias NT mediante qRT-PCR. (G) Análisis cuantitativo western. Los números representan AAK1 (superior) o GAK (inferior) a las proporciones de proteína de actina relativo al control NT. (H) Unión del núcleo-AP2M1 mediante PCAs en células Huh-7.5 agotadas para AAK1 o GAK mediante siARNs. El eje Y representa la proporción de luminiscencia (la señal de luminiscencia promedio detectada en las células transfectadas con Gluc1-AP2M1 y Gluc2-núcleo divididas entre el promedio de la luminiscencia medida en células NT transfectadas con Gluc1-AP2M1 y un vector Gluc2 vacío con aquellos transfectados con Gluc2-núcleo y un vector Gluc1 vacío) relativo al control NT. (I)-(K) Las células agotadas de AAK1 o GAK fueron electroporadas con J6/JFH(p7-Rluc2A). (I) Viabilidad celular con ensayos basados en azul alamar en células agotadas relativo al control NT. (J) Replicación VHC ARN en estas células mediante ensayos de luciferasa 6 horas (negro) y 72 horas (blanco) posterior a la electroporación. (K) Inefectividad extracelular (negro) e intracelular (blanco) mediante ensayos de luciferasa en células nuevas Huh-7.5 infectadas con sobrenadantes o lisados celulares derivados de las células indicadas, respectivamente, relativo al control NT. (L) Unión del núcleo con AAK1 y GAK mediante PCAs. El eje Y representa la proporción de luminiscencia relativa a la unión del núcleo-AP2M1. Los datos representan el medio y s.d. (barras de error) de por lo menos dos experimentos por triplicado. La URL es las unidades relativas de luz. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 7: Inhibición farmacológica de la unión del núcleo-AP2M1 y el montaje VHC. (A) Reguladores de AP2M1 y los inhibidores descubiertos. (B) Los inhibidores Kds de la unión con AAK1 o GAK (Karaman *et al.*, *Nat Biotechnol* 26:127-132, 2008). La IC_{50} para estos compuestos efectúa en el núcleo-AP2M1 la unión, y las EC_{50} s para su efecto en la inefectividad extracelular, inefectividad intracelular, y la infección viral con VHC desarrollado del cultivo celular (VHCcc). (C) Inhibición de la unión del núcleo-AP2M1 mediante los compuestos medidos mediante PCAs. (D)-(G) Las células Huh-7.5 electroporadas con J6/JFH(p7-Rluc2A) fueron tratadas diariamente tanto con erlotinib, sunitinib o PKC-412 durante 3 días. Los sobrenadantes y los lisados celulares fueron cosechados a las 72 horas y se usaron para inocular las células nuevas Huh-7.5. Las curvas de respuestas de dosis de los efectos de los inhibidores en la inefectividad extracelular (D) e intracelular (E) relativo a los controles no tratados. Estos compuestos no tuvieron efecto en la replicación de VHC ARN (F) o viabilidad celular (G) mediante luciferasa y ensayos basados en azul alamar, respectivamente (GNN es un mutante de polimerasa de replicación defectuosa). (H) El efecto de los inhibidores en la fosforilación de AP2M1 mediante análisis western de los lisados celulares se cosecharon después de la electroporación con J6/JFH(p7-Rluc2) y tratamiento con los compuestos en presencia de Calyculin A (Cal-A). Se muestran las membranas representativas manchadas con anticuerpos anti-fosfo-AP2M1 (p-AP2M1) y anti-actina, y el análisis cuantitativo de tres experimentos. El eje Y representa una proporción de proteína pAP2M1/actina relativo a los controles no tratados. (I) El efecto de los inhibidores en la infección viral (negro) y viabilidad celular (gris) en células infectadas con VHCcc después de

72 horas de tratamiento diario relativo a los controles no tratados. Los datos representan el medio y s.d. (barras de error) desde por lo menos tres experimentos por triplicado. La URL es las unidades relativas de luz. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 8: Agotamiento transitorio de AP2M1 mediante siARNs agrupados inhibe el montaje de VHC. (A) La proporción AP2M1/S18 ARN medida por qRT-PCR en células Huh-7.5 transfectadas con un pozo de cuatro siARNs (ON-TARGETplus SMARTpools. Dharmacon) que tienen como objetivo AP2M1 o una fuente de secuencias sin objetivo (NT) a 48 horas posterior a la transfección relativa a los controles NT. (B) Los niveles de proteína AP2M1 mediante análisis cuantitativo western en células 48 horas posterior a la transfección con los correspondientes siARNs agrupados. Los números representan AP2M1 a la proporción de proteína de actina relativa al control NT. (C) Viabilidad celular mediante ensayos de azul alamar 48 horas posterior a las transfecciones de siARNs relativo al control NT. (D) Las células fueron electroporadas con J6/JFH(p7-Rluc2A) a 48 horas después de la transfección con los siARNs agrupados indicados. La replicación VHC ARN en estas células mediante los ensayos de luciferasa a 6 horas (negro) y 72 horas (blanco) posterior a la electroporación. (E) La infectividad extracelular (negra) e intracelular (blanca) medida en células nuevas Huh-7.5 infectadas con sobrenadantes o lisados celulares clarificados derivados de células electroporadas que hospedan los siARNs indicados mediante ensayos de luciferasa, respectivamente. (F) Producción de virus infeccioso medida limitando los ensayos de dilución. (G)

Infectividad extracelular (negra) e intracelular (blanca) medida mediante ensayos de formación central en células nuevas Huh-7.5 infectadas con sobrenadantes o lisados celulares clarificados derivados de células Huh-7.5 agotadas de modo transitorio para AP2M1 mediante siARNs e infectadas con virus J6/JFH desarrollado de cultivo (título: 1.2×10^5 TCID₅₀/ml). Los resultados son relativos a los controles NT. Se muestra el medio $\pm$ s.d. (barras de error) de resultados de por lo menos dos experimentos independientes. La URL es las unidades relativas de luz. TCID₅₀ es una dosis infecciosa de cultivo tisular al 50%.

Figura 9: Muestra que el agotamiento de AAK1 y GAK o la inhibición farmacológica anula la replicación del VIH-1 en las células TZM-b1 (células HeLa CXCR4-positivo que expresan CD4 y CCR5 y contienen además genes reporteros integrados para luciferasa y *E. coli* β -galactosidasa, ambos bajo el control de una secuencia de repetición de terminal largo VIH (gen tat)). (A) Replicación de VIH en AAK1 o células agotadas de GAK relativas al control NT. (B) El efecto antiviral de los inhibidores de AAK1 y GAK en la replicación del VIH relativo al control no tratado.

Figura 10: Muestra el ensayo de unión proteína-proteína basado en microfluidos. En este esquema se muestran tres células unitarias individuales (de los cientos en un dispositivo de microfluidos). (A) Compartimientos y válvulas micromecánicas. Una válvula se crea cuando un canal de control cruza un canal de flujo. La membrana delgada resultante en la unión entre los dos canales puede desviarse mediante la actuación hidráulica. Usar sistemas de válvulas

mutiplexadas permite que un número grande de microválvulas elastoméricas realicen manipulaciones de fluidos complejas dentro de estos dispositivos.

(B) Protocolo experimental. ● representa anticuerpos anti-histidina biotinilado de unión de superficie (mostrados en B1 y B2). ● representa la proteína humana de cebo rotulada FITC de unión de superficie (mostrada en B3). ● representa una proteína viral de presa rotulada Cy3 (mostrada en B4 y B5). 1) El dispositivo de microfluído se unió a un portaobjetos de vidrio y se sometió a un patrón de superficie que dio como resultado un área circular recubierta con anticuerpos anti-histidina biotinilado en cada célula unitaria (ver c). 2) Las proteínas humanas de cebo etiquetado V5-his se expresaron del chip que usa una mezcla *in vitro* de transcripción/traslación (TNT) y se cargaron en el dispositivo. 3) Estas proteínas se unieron a los anticuerpos superficiales anti-his. 4) Las proteínas virales rotuladas T7 se expresaron fuera del chip mediante la misma mezcla TNT *in vitro* de mamífero en presencia de las membranas microsomales y se cargaron en el dispositivo junto con los anticuerpos etiquetados FITC anti-V5 y etiquetado Cy3 anti-T7. 5) Las “válvulas sándwich” se cerraron para permitir la incubación de la proteína viral con las proteínas humanas y su etiquetado con los respectivos anticuerpos fluorescentes. 6) Luego se realizó MITOMI mediante la actuación de la “membrana botón” que facilita atrapar los complejos de unión de superficie mientras que se expulsa cualquiera de las moléculas de fase de solución. Las “válvulas sándwich” se abrieron después de una breve lavada para remover el material no unido y no atrapado. 7) El dispositivo se escaneó mediante

un escáner de colección. La proteína viral atrapada y las proteínas humanas de unión de superficie fueron detectadas. La proporción de la proteína viral unida a la proteína humana expresada se calculó para cada punto de datos midiendo la señal mediana de Cy3 a la señal mediana de FITC (representado por O, mostrado en B7).

(C) Patrón de superficie. 1) El área superficial accesible fue derivada haciendo fluir una solución de BSA biotinilada (🏠) a través de todos los canales de flujo. 2) Una solución de neutravidina (🔍) fue cargada. 3) La membrana “botón” fue activada. 4) Toda el área superficial accesible restante excepto un área circular de 60 μm enmascarado por el botón fue pasivada con una solución biotinilada (🏠). 5) Se abrió la membrana “botón”. 6) Una solución de anticuerpos biotinilados-anti-his (🔍) se cargó permitiendo una funcionalización específica del área circular previamente enmascarada. 7) Proteína humana expresada *in vitro* (🔍) se unió a los anticuerpos biotinilados recubriendo el área circular discreta. Cada uno de los pasos descritos fue seguido por un lavado PBS.

Figura 11: Muestra que las mutaciones YXX Φ del núcleo no afectan la replicación VHC ARN mediante los ensayos qRT-PCR. Replicación de VHC ARN, mediante qRT-PCR en células Huh-7.5 72 horas después de la electroporación con J6/JFH(p7-Rluc2A) que hospeda las correspondientes mutaciones YXX Φ del núcleo relativo al control WT. $\Delta\text{E1-E2}$ es un control de montaje defectuoso. GNN es un mutante de polimerasa de replicación defectuosa. Se muestra el medio y

s.d. (barras de error) de los resultados de los dos experimentos independientes por triplicado.

Figura 12: Muestra que el agotamiento de AP2M1 no tiene efecto en la replicación VHC ARN mediante los ensayos qRT-PCR. La replicación de HVC ARN, mediante qRT-PCR en las células Huh-7.5 que hospedan el correspondiente shARNs 72 horas después de la electroporación con J6/JFH(p7-Rluc2A) respecto al control NT. Se muestran el medio y s.d. (barras de errores) de los resultados de dos experimentos independientes pro triplicado.

Figura 13: Muestra el agotamiento transitorio de AP2M1 mediante siARNs agrupado inhibe el montaje VHC. (A) La proporción de AP2M1/S18 ARN medida mediante qRT-PCR en células Huh-7.5 transfectadas con una fuente de cuatro siARNs (On-TARGETplus SMARTpools, Dharmacon) teniendo como objetivo AP2M1 o una fuente de secuencias (NT) sin objetivo 48 horas después de la transfección relativa a los controles NT. (B) Niveles de proteína AP2M1 mediante análisis cuantitativo Western en las células 48 horas después de la transfección con el correspondiente siARNs agrupado. Los números representan AP2M1 a la proporción de proteína de actina relativo al control NT. (C) La viabilidad celular mediante ensayos azul alamar 48 horas posterior a las transfecciones siARNs respecto al control NT. (D) Las células fueron electroporadas con J6/JFH(p7-Rluc2A) 48 horas después de la transfección con los indicados siARNs agrupados. La replicación VHC ARN en estas células mediante ensayos de luciferasa a 6 horas (negra) y 72 horas (blanca) posterior a la electroporación. (E) Inefectividad

extracelular (negra) e intracelular (blanca) medida en células nuevas Huh-7.5 infectadas con los sobrenadantes o lisados celulares clarificados derivados de las células electroporadas que hospedan a los siARNs indicados mediante ensayos de luciferasa, respectivamente. (F) La producción del virus infeccioso medida por los ensayos de dilución limitante. (G) Inefectividad extracelular (negra) e intracelular (blanca) medida mediante los ensayos de formación central en células nuevas Huh-7.5 infectadas con sobrenadantes o lisados de célula clarificada derivadas de células Huh-7.5 agotadas de manera transitoria para AP2M1 mediante siARNs e infectadas con virus J6/JFH desarrollado de cultivo (título: 1.2×10^5 TCID₅₀/ml). Los resultados son relativos a los controles NT. Se muestran el medio $\pm$ s.d. (barras de error) de los resultados de dos experimentos independientes. La URL es unidades de luz relativa. TCID₅₀ es una dosis infecciosa de cultivo tisular al 50%.

Figura 14: Muestra que una mutación de núcleo Y136A no parece haber afectado la localización del núcleo a las membranas ER en células infectadas VHC. (A) Análisis de inmunodeficiencia (IF) confocal cuantitativo para la localización del núcleo a la membrana ER en las células Huh-7.5 infectadas con VHC desarrollado de cultivo. (A) y (B) son imágenes fusionadas representativas del núcleo (rojo) y el marcador ER, calreticulina (verde), demostrando una localización parcial comparable del núcleo a la membrana ER en las células Huh-7.5 infectadas con el virus WT (A) o con virus que hospedan la mutación del núcleo Y136A (B). Se muestran imágenes representativas a un aumento de x60. (C) Análisis de co-localización de pilas Z usando los coeficientes de Manders (con

un valor más alto que representa más co-localización). Los valores indican valores M2 medios representados como co-localización porcentual (la fracción de intensidad verde que coincide con la intensidad $\pm$ s.d. (barras de error); $n = 10-15$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Antes de describir la presente divulgación más detalladamente, deberá entenderse que esta divulgación no está limitada a las modalidades particulares descritas, y la modalidad de la invención como tal puede, naturalmente, variar. También deberá entenderse que la terminología usada aquí es con la finalidad de describir solamente las modalidades particulares, y no está destinada a ser limitante, ya que el ámbito de la presente divulgación estará limitado solamente por las reivindicaciones que se acompañan.

Como será evidente para los expertos en la técnica, al leer esta divulgación, cada una de las modalidades individuales aquí descritas e ilustradas tienen componentes y características discretas que se pueden separar fácilmente de o combinado con las características de cualquiera de las otras diversas modalidades sin apartarse del ámbito o espíritu de la presente divulgación. Cualquier método mencionado puede realizarse en el orden de los eventos mencionado o en cualquier orden que sea lógicamente posible.

Antes de describir detalladamente las modalidades de la presente divulgación, deberá entenderse que salvo que se indique de otra manera, la

presente divulgación no está limitada a los materiales particulares, reactivos, materiales de reacción, proceso de fabricación, o similares, en la medida que estos pueden variar. Deberá atenderse además que la tecnología aquí usada es con la finalidad de describir las modalidades particulares solamente, y no está destinada a ser limitante. En la presente divulgación también es posible que las etapas se pueden realizar en diferente secuencia, donde esta es lógicamente posible. Como se usa en la descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a “un compuesto” incluye una pluralidad de compuestos. En esta descripción y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que serán definidos de manera que tengan los siguientes significados salvo que la intención contraria sea evidente.

Definición

Al describir y reivindicar la sustancia divulgada, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones establecidas más adelante.

“Flaviviridae virus” se refiere a cualquier virus de la familia Flaviviridae, que incluye aquellos virus que infectan a los seres humanos y animales no humanos. Las secuencias de polinucleótido y de polipéptido que codifican estos virus son bien conocidos en la técnica, y se pueden encontrar en la base de datos NCBI's GenBank, por ejemplo, como los números de Acceso GenBank NC_004102, AB031663, D11355, D11168, AJ238800, NC_001809, NC_001437, NC_004355,

NC_004119, NC_003996, NC_003690, NC_003687, NC_003675, NC_003676, NC_003218, NC_001563, NC_000943, NC_003679, NC_003678, NC_003677, NC_002657, NC_002032 y NC_001461, cuyos contenidos de entradas en una base de datos son incorporados aquí como referencia en su totalidad.

Según se usa aquí, los términos “tratamiento”, “que trata” y “tratar” se definen por actuar en una enfermedad, trastorno o condición con un agente para reducir o mejorar los efectos farmacológicos y/o fisiológicos de la enfermedad, trastorno o condición y/o sus síntomas. “Tratamiento” según se usa aquí, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un huésped (por ejemplo, un mamífero, típicamente una persona o un animal no humano de interés veterinario), e incluye: (a) reducir el riesgo de ocurrencia de la enfermedad en un sujeto determinado que va a estar predispuesto a la enfermedad pero no aún no diagnosticado como infectado con la enfermedad, (b) obstaculizar el desarrollo de la enfermedad, y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar una regresión de la enfermedad y/o aliviar uno o más de los síntomas de la enfermedad. “Tratamiento” se refiere además a abarcar el suministro de un agente de inhibición para proporcionar un efecto farmacológico, incluso en ausencia de una enfermedad o condición. Por ejemplo, “tratamiento” abarca el suministro de un agente que inhibe la enfermedad o el patógeno que proporciona efectos mejorados o deseables en el sujeto (por ejemplo, reducción de la carga del patógeno, reducción de los síntomas de la enfermedad, etc.)

Según se usa aquí, los términos “tratar profilácticamente” o “que se trata profilácticamente” se refiere a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad.

Según se usa aquí, el término “huésped”, “sujeto”, “paciente” u “organismo” incluye humanos y animales (por ejemplo, ratones, ratas, cerdos, gatos, perros y caballos). Los huéspedes típicos a los que se les puede administrar los compuestos de la presente divulgación serán los mamíferos, particularmente primates, especialmente humanos. Para aplicaciones veterinarias, será apropiada una amplia variedad de sujetos, por ejemplo, animales de granja tales como ganado, ovejas, cabras, vacas, cerdos y similares; aves de corral tales como pollos, patos, gansos, pavos y similares; y animales domesticados, particularmente mascotas tales como perros y gatos. Para aplicaciones de diagnóstico o investigación, una amplia variedad de mamíferos pueden ser sujetos apropiados, incluyendo roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hamsters), conejos, primates y cerdos, tales como cerdos endogámicos y similares. El término “huésped vivo” se refiere a un huésped como se mencionó anteriormente u otro organismo que está vivo. El término “huésped vivo” se refiere a todo huésped u organismo y no solo a una parte extirpada (por ejemplo un hígado u otro organismo) del huésped vivo.

El término “compuesto aislado” se refiere a un compuesto que ha sido sustancialmente separado de, o enriquecido respecto a, otro compuesto con el

que se presenta en la naturaleza. Los compuestos aislados son usualmente por lo menos 80%, por lo menos 90% puros, por lo menos 98% puros, o por lo menos aproximadamente 99% puros, en peso. La presente divulgación se refiere a incluir diastereómeros, así como sus formas racémicas y resueltas, enantioméricamente puras y sus sales farmacéuticamente aceptables.

El término "forma de dosificación unitaria", según se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y/o animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un compuesto (por ejemplo, un compuesto antiviral, como se describe aquí) calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria dependen del compuesto particular empleado, la ruta y la frecuencia de administración, el efecto que se va a conseguir, y la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el huésped.

Un "excipiente farmacéuticamente aceptable", "diluyente farmacéuticamente aceptable", "portador farmacéuticamente aceptable" o "adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente, diluyente, portador y/o adyuvante que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es por lo general segura, no tóxica, y ni biológicamente o de otra forma indeseable, e incluye un excipiente, diluyente, portador y adyuvante que es aceptable para uso veterinario y/o uso farmacéutico humano. "Un excipiente, diluyente, portador y/o

adyuvante farmacéuticamente aceptable”, según se usa aquí en la descripción y las reivindicaciones incluye uno o más de dichos excipientes, portadores y adyuvantes.

Según se usa aquí, una “composición farmacéutica” está destinada a abarcar una composición apropiada para la administración a un sujeto, tal como un mamífero, especialmente un humano. En general una “composición farmacéutica” es estéril, y preferentemente libre de contaminantes que son capaces de provocar una respuesta no deseada en el sujeto (por ejemplo, el(los) compuesto(s) en la composición farmacéutica es de grado farmacéutico). Las composiciones farmacéuticas se pueden diseñar para la administración a sujetos o pacientes que lo necesitan vía un número de rutas diferentes de administración incluyendo oral, intravenosa, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, intratecal, intramuscular, subcutánea, por inhalación, y similares.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva”, según se usa aquí se refiere a aquella cantidad de una modalidad del agente (que se puede referir como un compuesto, un agente inhibidor, y/o un fármaco) que es administrada que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, es decir, la infección, que es tratada, y/o aquella cantidad que evitará, en cierta medida, uno o más de los síntomas de la enfermedad, es decir, la infección, que el huésped que está siendo tratado tiene o está en riesgo de desarrollar.

Los virus son pequeños agentes infecciosos intracelulares que se replican vía el uso de la maquinaria de célula huésped. El montaje del virus y el surgimiento de Flaviviridae se entiende aún muy escasamente, aunque datos recientes sugieren que la vía endocítica puede ser involucrada, tal como con el Virus de la Hepatitis C (VHC). Las proteínas huésped están involucradas en estos procesos, aunque antes de la presente divulgación, las proteínas huésped involucradas en mediar el montaje tardío y el brote no fueron considerados como objetivo como agentes antivirales. La presente divulgación, sin embargo, proporciona métodos antivirales y composiciones que tiene como objetivo las proteínas huésped para un montaje tardío y el brote. En particular, las proteínas adaptadoras de clatrina huésped y sus reguladores involucrados en las vías endocíticas o secretoras son objetivos efectivos. El papel de las proteínas adaptadoras de clatrina y sus reguladores en la producción de Flaviviridae infecciosa eran desconocidos anteriormente. La presente divulgación demuestra que las proteínas adaptadoras de clatrina huésped, tal como AP2M1, APIM1, AP3M1 y AP4M1, y sus proteínas reguladoras, tales como, pero sin limitación, AAK1 y GAK son objetivos apropiados para las terapias antivirales. Además, la presente divulgación proporciona un motivo de amino ácido viral novedoso que media la interacción con una proteína huésped.

Un motivo YXX Φ conservado fue descubierto en la proteína de núcleo de VHC, una proteína de membrana de amino ácido 191 que forma un cápside viral (Figura 1). Este motivo YXX Φ se conserva a través de todos los aislamientos de VHC disponibles en las bases de datos hasta la fecha. Este motivo también fue

descubierto en las proteínas estructurales a partir de otra Flaviviridae y otros virus. Este motivo YXXΦ se ajusta con la señal de clasificación de consenso en las proteínas de carga de huésped de membrana, reconocido por la subunidad μ de los complejos de proteína adaptadora (AP) de clatrina (Figura 1a). La AP2M1 media la endocitosis dependiente de clatrina, mediante cuyo proceso las proteínas de carga son clasificadas en pozos recubiertos de clatrina destinados para la fusión con endosomas tempranos. Se ha mostrado que el reconocimiento de los motivos YXXΦ o de dileucina en las proteínas retrovirales mediante AP2M1 o AP1M1 está involucrado en mediar el montaje y el brote de los retrovirus (Figura 1b) (Batonick *et al.*, *Virology* 342:190-200, 2005; Camus *et al.*, *Molec Biol Cell* 18:3193-3203, 2007; Berlioz-Torrent *et al.*, *J. Virol* 73:1350-1361, 1999; Byland *et al.*, *Molec Biol cell* 18:414-425, 2007; Wyss *et al.*, *J Virol* 75:2982-2992, 2001; Ohno *et al.*, *Virology* 238:305-315, 1997; Boge *et al.*, *J Biol Chem* 273:15773-15778, 1998; Egan *et al.*, *J Virol* 70:6547-6556, 1996; Rowell *et al.*, *J Immunol* 155:473-488, 1995; Lodge *et al.*, *EMBO J* 16:695-705, 1997; Deschambeault *et al.*, *J Virol* 73:5010-5017, 1999). Sin embargo, el papel de AAK1 y GAK en infección por VIH no ha sido estudiado, y estos mecanismos no han sido considerados como objetivos farmacológicamente. En consecuencia, la presente divulgación proporciona métodos y composiciones para tratar o prevenir la infección viral de VHC, Flaviviridae, Flaviviridae diferente de VHC, VIH, Lentiviridae diferente de VIH, virus de unión de Clatrina AP, unión de Clatrina AP diferente de Flaviviridae, virus de unión de Clatrina AP diferente de VHC, o co-infecciones tales como co-infecciones de VHC/VIH.

La inhibición de la interacción entre el motivo YXXΦ viral y las proteínas adaptadoras huésped, tales como, pero sin limitación AP2M1, da como resultado la producción reducida de virus infecciosos de VHC, Flaviviridae, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de Clatrina AP, virus de unión de Clatrina AP diferente de Flaviviridae, virus de unión de Clatrina AP diferente de VHC, o co-infecciones tales como co-infecciones de VHC/VIH. Además, la inhibición de la actividad de proteínas que regulan las proteínas adaptadoras de clatrina puede dar como resultado una producción reducida de virus infecciosos de VHC, Flaviviridae, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de Clatrina AP, virus de unión de Clatrina AP diferente de Flaviviridae, virus de unión de Clatrina AP diferente de VHC, o co-infecciones tales como co-infecciones de VHC/VIH. De este modo, los planteamientos diseñado para interrumpir las interacciones del motivo YXXΦ viral con las proteínas adaptadoras de clatrina, tales como AP2M1 y similares, pueden ser útiles para inhibir la producción de virus infecciosos.

La regulación de la actividad de muchas proteínas se presenta mediante la acción de las proteínas quinasas y las fosfatasa de proteína. GAK y AAK1 son dos proteínas quinasas que modulan la actividad de AP2M1 u otras subunidades μ de complejos de Clatrina AP, que indican que la administración de los inhibidores de la proteína quinasa tal como erlotinib, sunitinib, o PKC-412 pueden impedir la interacción de AP2M1 u otras subunidades μ de complejos AP clatrin con motivos YXXΦ viral o de dileucina, inhibiendo de este modo la infección viral de VHC, Flaviviridae, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de Clatrina AP, virus de unión de Clatrina AP diferente de Flaviviridae, virus de unión de Clatrina AP

diferente de VHC, VIH, Lentiviridae diferente de VIH, o co-infecciones tales como co-infecciones VHC/BIH, como se describe más detalladamente a continuación.

Por lo tanto, las modalidades de la presente divulgación proporcionan métodos para tratar una infección viral de virus de unión de Clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de Clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de Clatrina AP diferente de VHC, o cualquier otro virus envuelto que secuestra AP2M1 otras subunidades μ de los complejos de Clatrina AP/AAK1/GAK, composiciones (incluyendo agentes de inhibición y combinaciones de dichos agentes con otras terapias antivirales) para tratar una infección de dichos virus, y similares. En particular, las modalidades de la presente invención proporcionan métodos para tratar infecciones causadas por los virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones tales como co-infecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, y composiciones para tratar estas infecciones u otros virus envueltos que unen las proteínas adaptadoras de clatrina, tales como AP2M1, o se regulan mediante AAK1 o GAK.

Las modalidades de la presente divulgación proporcionan métodos para tratar profilácticamente una infección viral de los virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de

Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, composiciones (incluyendo agentes de inhibición y combinaciones de dichos agentes con otras terapias antivirales) para tratar profilácticamente una infección mediante dicho virus, y similares. En particular, las modalidades de la presente invención proporcionan métodos para tratar profilácticamente VHC y/o VIH, y composiciones para tratar VHC y/o VIH. En una modalidad alternativa, la presente invención proporciona métodos para tratar una infección de VHC/VIH o Flaviviridae diferente de VHC. Si bien la presente discusión puede describir la invención con respecto al VHC, deberá notarse que la divulgación se refiere no solamente al VHC, sino también a los virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, y composiciones para tratar estas infecciones o cualquier otro virus envuelto que une AP2M1 u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP o se regula mediante AAK1 o GAK, o cualquier otro virus envuelto que une las proteínas adaptadoras de clatrina, tal como AP2M1 y similares, u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP y su interacción es regulada por AAK1/GAK.

En vista del reconocimiento de que las proteínas virales que comprenden un motivo YXX Φ o de dileucina pueden mediar la interacción con las proteínas huésped, las modalidades de la presente invención proporcionan composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que incluyen una agente de inhibición que se puede usar para tratar un huésped infectado mediante un virus de la familia

de virus de Flaviviridae. En particular, el agente de inhibición se puede usar para tratar huéspedes infectados con una infección viral de virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, HIV, co-infecciones, tales como co-infecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, o pacientes que padecen de co-infecciones, en particular VHC y VIH o Flaviviridae diferente de VHC. En consecuencia, en la presente se encuentra el uso de dos tipos de agentes de inhibición: (1) aquellos que inhiben la interacción entre una proteína viral que comprende el motivo YXXΦ o de dileucina y las proteínas adaptadoras de clatrina huésped, tales como AP2M1 y otras subunidades μ de complejos de clatrina AP; y (2) aquellos que inhiben la actividad de la quinasa que regula las proteínas huésped. En algunas modalidades, el agente de inhibición inhibe AAK1 o GAK.

Según se describe en los Ejemplos, se ha observado que el motivo VHC YXXΦ en una proteína estructural se une con la proteína huésped AP2M1. Esta interacción se ha usado para identificar los agentes de inhibición que interfieren con la interacción y de este modo pueden ser candidatos para el desarrollo clínico de fármacos para tratar una infección viral de virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC.

Los agentes de inhibición aquí descritos son útiles en el tratamiento de infecciones virales, en donde el virus es un virus que contiene el motivo YXXΦ, y Y es un residuo de tirosina, X es cualquier amino ácido y Φ es un residuo hidrófobo voluminoso. Estos pueden incluir, pero sin limitación, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina y valina. Los agentes de inhibición descritos aquí son útiles en el tratamiento de infecciones virales, donde el virus comprende un virus que contiene el motivo de dileucina. Los motivos de dileucina pueden incluir, pero sin limitación, leucina-leucina, isoleucina-leucina, leucina-isoleucina, [D/E]XXXL[L/I] o DXXLL (en donde X es cualquier aminoácido). Los virus que contienen el motivo Φ o de dileucina incluyen, entre otros, Lentiviridae, tales como VIH, y virus de la familia de Flaviviridae. Las Flaviviridae ejemplares incluyen, pero sin limitación, flavivirus, pestivirus y virus de la hepatitis C. Otros virus que contienen el motivo Φ o de dileucina incluyen virus de la fiebre amarilla (YFV); virus del Dengue, incluyendo Dengue tipos 1-4; virus de la encefalitis japonesa; virus de la encefalitis del Valley de Murray; virus de la encefalitis de St. Louis; virus del Nilo Occidental; virus de la encefalitis transmitida por garrapata; virus de la hepatitis C (VHC); virus Kunjin; virus de la encefalitis centroeuropea; virus de la encefalitis rusa de primavera-verano; virus Powassan; virus de la enfermedad Kyasanur Forest; virus Ilheus; virus Aposi, virus GB A y B; virus del mal de Louping y virus de la fiebre hemorrágica de Omsk

En una modalidad, los agentes de inhibición (por ejemplo, agentes anti-VHC) para usar en la inhibición de la replicación del VHC y tratar la infección de VHC, son de interés particular. La Flaviviridae diferente de VHC y los virus

envueltos diferentes de Flaviviridae también son de interés. El VHC contemplado por la divulgación puede ser de cualquier genotipo (genotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6 y similares), así como subtipos de un genotipo VHC (por ejemplo, 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, etc.). Debido a que el genotipo VHC 1 es típicamente el más difícil de tratar, los métodos y composiciones de la invención para tratar infecciones del genotipo VHC 1 y los subtipos del genotipo son de particular interés. En una modalidad, las co-infecciones de VHC son de interés. En particular, las co-infecciones de VHC/VIH son de interés.

Si bien la siguiente descripción pertenece al VHC, dicha referencia es solamente por claridad y no está destinada a limitar la divulgación como se describe más detalladamente a continuación para VHC. Según se anotó anteriormente, los métodos y las composiciones de la invención se pueden aplicar a cualquier virus que tenga un motivo YXXΦ o de dileucina en una proteína estructural (por ejemplo, infección viral de VHC, Flaviviridae, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, co-infecciones tales como co-infecciones de VHC/HIV), Lentiviridae o VIH. Las composiciones y los métodos también se pueden aplicar a las co-infecciones, y las infecciones con Flaviviridae diferente de VHC, y virus envuelto diferente de Flaviviridae.

La presente divulgación describe además los métodos *in vitro* sin célula de agentes de identificación (agentes de inhibición) que modulan la unión entre una proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina y una proteína

adaptadora de clatrina huésped tal como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP. Un agente de prueba que inhibe la unión de las proteínas virales que contienen el motivo YXX Φ o de dileucina con las proteínas huésped que incluyen las proteínas adaptadoras de clatrina, tal como AP2M1 u otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP, se pueden examinar además respecto a su capacidad para inhibir la replicación viral en un ensayo basado en células. Por ejemplo, un agente de prueba de interés puede ponerse en contacto con una célula de mamífero que hospeda todo o parte de un genoma de VHC, y se puede determinar el efecto del agente de prueba en la replicación de VHC. Las células apropiadas incluyen células de hígado de mamífero que son permisivas para la replicación de VHC, por ejemplo, una línea celular de hepatocito humano inmortalizada que es permisiva para el VHC. Por ejemplo, una célula de mamífero apropiada es hepatocito Huh7 o un subclon de hepatocito Huh7, por ejemplo, Huh-7.5. Las líneas celulares apropiadas se describen en, por ejemplo, Blight *et al.* (*J Virol* 76:13001, 2002) y Zhang *et al.* (*J Virol* 78:1448, 2004). En una modalidad, el genoma VHC en la célula comprende un reportero, por ejemplo, una secuencia nucleótida que codifica la luciferasa, una proteína fluorescente, u otra proteína que proporciona una señal detectable; y determinar el efecto, de haber, del agente de prueba en la replicación de VHC se consigue mediante la detección de una señal del reportero. Otros sistemas de ensayo viral son conocidos en la técnica.

En una modalidad, los agentes de prueba son fracciones orgánicas. En esta modalidad, como se describe de manera general en la WO 94/24314, que se

incorpora aquí como referencia, los agentes de prueba se sintetizan de una serie de substratos que pueden ser químicamente modificados. "Químicamente modificado" aquí incluye las reacciones químicas tradicionales, así como las reacciones enzimáticas. Estos substratos incluyen generalmente, pero sin limitación, grupos alquilo (incluyendo alcanos, alquenos, alquinos y heteroalquilo), grupos arilo (incluyendo arenos y heteroarilo), alcoholes, éteres, aminas, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, amidas, compuestos cíclicos, compuestos heterocíclicos (incluyendo purinas, pirimidinas, benzodiazepinas, beta-lactámicos, tetraciclinas, cefalosporinas y carbohidratos), esteroides (incluyendo estrógenos, andrógenos, cortisona, ecodisona, etc.), alcaloides (incluyendo ergots, vinca, curare, pirolizidina y mitomicinas), compuestos organometálicos, compuestos que tienen un heteroátomo, aminoácidos, y nucleósidos. Las reacciones químicas (incluyendo enzimáticas) pueden hacerse en las fracciones para formar nuevos substratos o agentes candidato que luego pueden ser puestos a prueba usando los presentes métodos.

De este modo, en las modalidades específicas, un agente de prueba de interés (por ejemplo, un agente de inhibición de la invención) inhibe la replicación viral en por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 35%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos

aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90%, o más, comparador con el nivel de la replicación de VHC en ausencia del agente de prueba.

En particular, las modalidades de la presente invención incluyen agentes de inhibición que inhiben la unión de las proteínas virales que contienen un motivo YXXΦ o de dileucina con las proteínas adaptadoras de clatrina huésped tal como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP mediante por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 35%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90%, o más, comparado con la unión de proteínas virales que contienen un motivo YXXΦ o de dileucina con proteínas adaptadoras de clatrina huésped tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP en ausencia del agente del agente de prueba.

En incluso otra modalidad, el agente de inhibición es aquel que inhibe la unión de una proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina con las proteínas adaptadoras de clatrina huésped tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP con una concentración inhibidora al

50% (IC_{50}) de aproximadamente 100 μ M a 50 μ M, aproximadamente 50 μ M a 25 μ M, aproximadamente 25 μ M a 10 μ M, aproximadamente 10 μ M a 5 μ M, aproximadamente 5 μ M a 1 μ M, aproximadamente 1 μ M a 500 nM, aproximadamente 500 nM a 400 nM, aproximadamente 400 nM a 300 nM, aproximadamente 300 nM a 250 nM, aproximadamente 250 nM a 200 nM, aproximadamente 200 nM a 150 nM, aproximadamente 150 nM a 100 nM, aproximadamente 100 nM a 50 nM, aproximadamente 50 nM a 30 nM, aproximadamente 30 nM a 25 nM, aproximadamente 25 nM a 20 nM, aproximadamente 20 nM a 15 nM, aproximadamente 15 nM a 10 nM, aproximadamente 10 nM a 5 nM, o menos de aproximadamente 5 nM.

En incluso otra modalidad, el agente de inhibición inhibe la unión de por lo menos una proteína viral que contiene un motivo YXX Φ o de dileucina con proteínas adaptadoras de clatrina huésped tales como AP2M1 u otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP. En una modalidad, el agente de inhibición inhibe la unión de por lo menos una proteína viral que contiene un motivo YXX Φ o de dileucina con las proteínas huésped tal como Ap2M1 u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP con una IC_{50} de menos de aproximadamente 500 nM, por ejemplo, en algunas modalidades, el agente de inhibición inhibe la unión de por lo menos una proteína viral que contiene un motivo YXX Φ o de dileucina con las proteínas estructurales huésped tal como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP con una IC_{50} de aproximadamente 500 nM a 400 nM, aproximadamente 400 nM a 300 nM, aproximadamente 300 nM a 250 nM, aproximadamente 250 nM a 200 nM,

aproximadamente 200 nM a 150 nM, aproximadamente 150 nM a 100 nM, aproximadamente 100 nM a 50 nM, aproximadamente 50 nM a 30 nM, aproximadamente 30 nM a 25 nM, aproximadamente 25 nM a 20 nM, aproximadamente 20 nM a 15 nM, aproximadamente 15 nM a 10 nM, aproximadamente 10 nM a 5 nM, o menos de aproximadamente 5 nM.

En incluso otra modalidad, el agente de inhibición, cuando se contacta con una célula infectada por un virus (por ejemplo, una célula del hígado infectada por VHC), inhibe la replicación viral en la célula en por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 35%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90%, o más, comparado con el nivel de replicación viral en una célula infectada viral no contactada con el agente de inhibición.

En incluso otra modalidad, el agente de inhibición, cuando se pone en contacto con una célula infectada por un virus (por ejemplo, una célula de hígado infectada por VHC), reduce la cantidad de partículas virales infecciosas producidas por la célula infectada en por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos

aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 35%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90%, o más, comparado con el número de partículas virales infecciosas producidas por la célula no contactada con el agente de inhibición.

En incluso otra modalidad, además de determinar el efecto de un agente de prueba en las proteínas virales que contienen un motivo YXXΦ o de dileucina a las proteínas adaptadoras de clatrina huésped tal como AP2M1 u otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP, los agentes de prueba se evaluaron respecto a cualquier actividad citotóxica que pudieran presentar hacia una célula eucariótica viva, usando ensayos bien conocidos, tales como exclusión de colorante azul tripán, un ensayo de MTT(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio), y similares. Los agentes que no presentan una actividad citotóxica significativa pueden considerarse agentes preferidos para futuros desarrollos como fármacos.

En incluso otra modalidad, el agente de inhibición, cuando se administra en una o más dosis a un individuo infectado con un virus como se describe aquí (por ejemplo, un humano), reduce la carga viral en el individuo en por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos

aproximadamente 35%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90%, o más, comparado con la carga viral en el individuo no tratado con el agente de inhibición.

Agentes de Inhibición

Las modalidades de la presente divulgación proporcionan agentes de inhibición que se pueden usar para tratar un huésped infectado por un virus de la familia de virus Flaviviridae. En particular, la Flaviviridae diferente de VHC. En particular, el agente de inhibición se puede usar para tratar huéspedes infectados con el virus de la Hepatitis C o co-infecciones, en particular VHC + VIH. El agente de inhibición puede estar en uno o más de los siguientes grupos: inhibidores de las proteína quinasas AAK1 o GAK, que regulan el adaptador viral de la proteína-clatrina, tal como AP2M1 (u otras subunidades μ de complejos de clatrina AP), uniendo y mediando el montaje de virus y/o el brote. Debido a que AP2M1 y otras subunidades μ de complejos de clatrina AP median varias etapas en los ciclos de vida de múltiples virus, la inhibición de AP2M1 y otras subunidades μ de complejos de clatrina AP, tal como mediante inhibición de sus proteína quinasas o fosfatasas reguladoras, pueden afectar o inhibir los múltiples virus. En consecuencia, las proteína quinasas que regulan estas proteínas huésped pueden ser funcionalmente relevantes en otras familias virales. Si bien no es exclusivamente específico (como la mayoría de los compuestos), los inhibidores de la proteína

quinasa descubiertos unen AAK1 o GAK con altas afinidades comparado con sus otros objetivos y no tienen efecto en la replicación de VHC ARN, demostrando una selectividad relativamente buena.

Otros agentes que se pueden usar como inhibidores de GAK y AAK1 incluyen, pero sin limitación, ARNi, antisentido, ribozomas o moléculas pequeñas que compiten con erlotinib, sunitinib o PKC-412 para unirse a GAK o AKK1. Además, los inhibidores que son capaces de competir con los motivos YXXΦ o dileucina para unirse con las proteínas huésped incluyen, pero sin limitación, agentes de unión tales como anticuerpos dirigidos a YXXΦ o dileucina o contra AP2M1 u otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP. Además, las proteínas de unión dominante-negativo o los aptámeros pueden inhibir GAK o AAK1. En otra modalidad, los receptores señuelo o los polipéptidos que corresponden con el sitio de unión de YXXΦ o dileucina de AP2M1 otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP pueden inhibir GAK o AAK1.

Las modalidades de la presente invención incluyen sales de los agentes de inhibición. Las modalidades de la presente invención incluyen profármacos de los agentes de inhibición. Las modalidades de la invención incluyen en composiciones, composiciones farmacéuticas, composiciones líquidas, composiciones en gel, y similares, conteniendo cada una un agente de inhibición aquí identificado, y cada una de estas composiciones, en una modalidad, pueden estar en forma de una liberación controlada o una formulación de liberación sostenida. En una modalidad, el agente de inhibición se puede usar en

combinación con otro agente usado para tratar una infección viral de la familia Flaviviridae, y como se anotó previamente, cualquiera de los agentes (el agente de inhibición y el otro agente) o ambos agentes puede estar en forma de una liberación controlada o una liberación sostenida. En algunos casos, el término “agente de inhibición” puede estar referido a un agente activo o fármaco.

Formulaciones Farmacéuticas y Rutas de Administración

Las modalidades de la presente divulgación incluyen uno o más agentes de inhibición aquí identificados y formulados con uno o más excipientes, diluyentes, portadores y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Además, las modalidades de la presente invención incluyen dichos agentes de inhibición formulados con una o más sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables. En particular, uno o más agentes de inhibición se puede formular con uno o más excipientes, diluyentes, portadores, y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables para proporcionar una modalidad de una composición de la invención.

En una modalidad, el agente de inhibición se puede combinar con otro agente antiviral para preparar una composición de la invención, y la composición puede incluir uno o más excipientes, diluyentes, portadores y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

En una modalidad, un agente de inhibición que inhibe la unión de una proteína que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina con una proteína

adaptadora de clatrina huésped tal como AP2M1 u otras subunidades μ de los complejos de clatrina AP (referidos más adelante como “un agente activo sujeto” o “fármaco”) se pueden formular con uno o más excipientes, diluyentes, portadores y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Una amplia variedad de excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica. Los excipientes farmacéuticamente aceptables han sido ampliamente descritos en una variedad de publicaciones, incluyendo, por ejemplo, Gennaro (2000), “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999); y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000).

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como los vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes están fácilmente disponibles al público. Más aún, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como los agentes de regulación del pH y agentes de tamponamiento, agentes de regulación de tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

En una modalidad de la presente divulgación, el agente de inhibición se administra al huésped usando cualquier medio capaz de dar como resultado el efecto deseado (por ejemplo, reducción de la carga viral, reducción de la fibrosis hepática, aumento de la función hepática, y similares). De este modo, el agente de inhibición se puede incorporar en una variedad de formulaciones para

administración terapéutica. Por ejemplo, el agente de inhibición se puede formular en composiciones farmacéuticas mediante la combinación con apropiados portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhaladores y aerosoles.

En las formas de dosificación farmacéutica, el agente de inhibición puede administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o un agente activo sujeto puede usarse solo o en asociación apropiada, así como en combinación, con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente ejemplares y no son de ninguna manera limitantes.

Para preparaciones orales, el agente de inhibición se puede usar solo o en combinación con aditivos apropiados para hacer comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz, o almidón de papa; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, acacia, o gelatinas; con desintegradores, tales como almidón de maíz, almidón de papa, o carboximetilcelulosa de sodio; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes de tamponamiento, agentes humectantes, conservantes y agentes saborizantes.

Las modalidades del agente de inhibición se pueden formular en preparaciones para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionándolos en un solvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifático superior, o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservadores.

Las modalidades del agente de inhibición se pueden utilizar en formulaciones de aerosol que se van a administrar vía inhalación. Las modalidades del agente de inhibición se pueden formular en propulsores presurizados aceptables tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Además, las modalidades del agente de inhibición se pueden hacer en supositorios mezclando con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases hidrosolubles. Las modalidades del agente de inhibición se pueden administrar de manera rectal vía un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, Carbowax y polietilenglicoles, que se funden a temperatura corporal, incluso se solidifican a temperatura ambiental.

Las formas de dosificación unitaria para administración oral o rectal, tal como jarabes, elixires y suspensiones, pueden proporcionarse aquí en donde cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, comprimido, o

supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más agentes de inhibición. De manera similar, las formas de dosificación unitaria para inyección o administración intravenosa pueden comprender el agente de inhibición en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal, u otro portador farmacéuticamente aceptable.

Las modalidades del agente de inhibición se pueden formular en una composición inyectable de acuerdo con la invención. Típicamente, también se puede preparar composiciones inyectables se preparan como soluciones líquidas o suspensiones; las formas sólidas apropiadas para solución en, o soluciones en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o el ingrediente activo (agente de inhibición) encapsulado en vehículos de liposoma de acuerdo con la invención.

En una modalidad, el agente de inhibición se formula para distribución mediante un sistema de distribución continuo. El término "sistema de distribución continuo" se usa aquí de manera intercambiable con "sistema de distribución controlada" y abarca dispositivos de distribución continuos (por ejemplo, controlados) (por ejemplo, bombas) en combinación con catéteres, dispositivos de inyección, y similares, una amplia variedad de los cuales son conocidos en la técnica.

Las bombas de infusión mecánicas o electromecánicas también pueden ser apropiadas para usar con la presente divulgación. Ejemplos de dichos dispositivos

incluyen los descritos en, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 4,692,147; 4,360,019; 4,487,603; 4,360,019; 4,725,852; 5,820,589; 5,643,207; 6,198,966; y similares. En general, la distribución del agente de inhibición se puede cumplir usando cualquiera de una variedad de sistemas de bombeo rellenables. Las bombas proporcionan liberación consistente, controlada durante el tiempo. En algunas modalidades, el agente de inhibición está en una formulación líquida en un depósito impermeable de fármacos, y se distribuye de una manera continua al individuo.

En una modalidad, el sistema de distribución del fármaco es un dispositivo por lo menos parcialmente implantable. El dispositivo implantable puede ser implantado en cualquier sitio de implantación apropiado usando métodos y dispositivos bien conocidos en la técnica. Un sitio de implantación es un sitio en el cuerpo de un sujeto en el que se introduce y coloca un dispositivo de distribución del fármaco. Los sitios de implantación incluyen, pero no necesariamente se limitan a un sitio subdérmico, subcutáneo, intramuscular, u otro sitio apropiado en el cuerpo del sujeto. Los sitios de implantación subcutánea se usan en algunas modalidades debido a la conveniencia en la implantación y remoción del dispositivo de distribución del fármaco.

Los dispositivos de liberación de fármaco apropiados para usar en la divulgación se pueden basar en cualquiera de una variedad de modos de operación. Por ejemplo, el dispositivo de liberación de fármaco se puede basar en un sistema de difusión, un sistema convectivo, o un sistema erosionable (por

ejemplo, un sistema basado en la erosión). Por ejemplo, el dispositivo de liberación de fármaco puede ser una bomba electromecánica, una bomba osmótica, una bomba electroosmótica, una bomba de presión de vapor, o una matriz de ruptura osmótica, por ejemplo en donde el fármaco se incorpora en un polímero y el polímero proporciona liberación de la formulación del fármaco concomitante con la degradación de un material polimérico impregnado con fármaco (por ejemplo, un material biodegradable polimérico impregnado con fármaco). En otras modalidades, el dispositivo de liberación de fármaco se basa en un sistema de electrodifusión, una bomba electrolítica, una bomba efervescente, una bomba piezoeléctrica, un sistema hidrolítico, etc.

Los dispositivos de liberación de fármacos basados en una bomba de infusión mecánica o electromecánica también pueden ser adecuados para su uso con la presente divulgación. Los ejemplos de tales dispositivos incluyen los descritos en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nos. 4,692,147; 4,360,019; 4,487,603; 4,360,019; 4,725,852, y similares. En general, un método de tratamiento en materia puede llevarse a cabo usando cualquiera de una variedad de sistemas de bomba recargables, no intercambiables. Las bombas y otros sistemas convectivos son generalmente preferidos debido a su liberación generalmente más consistente, controlada en el tiempo. Las bombas osmóticas se utilizan en algunas modalidades debido a sus ventajas combinadas de liberación controlada más uniforme y tamaño relativamente pequeño (véase, por ejemplo, la solicitud PCT publicada N° WO 97/27840 y Patentes de EE.UU. N°s 5,985,305 y 5,728,396). Los ejemplos de dispositivos impulsados osmóticamente adecuados

para su uso en la descripción incluyen, pero no se limitan necesariamente a, los descritos en la Patente de EE.UU. Nos. 3,760,984; 3,845,770; 3,916,899; 3,923,426; 3,987,790; 3,995,631; 3,916,899; 4,016,880; 4,036,228; 4,111,202; 4,111,203; 4,203,440; 4,203,442; 4,210,139; 4,327,725; 4,627,850; 4,865,845; 5,057,318; 5,059,423; 5,112,614; 5,137,727; 5,234,692; 5,234,693; 5,728,396; y similares.

En algunas modalidades, el dispositivo de administración de fármacos es un dispositivo implantable. El dispositivo de administración de fármacos puede ser implantado en cualquier sitio de implantación adecuado utilizando métodos y dispositivos reconocidos en la técnica. Tal como se ha señalado en el presente documento, un sitio de implantación es un sitio dentro del cuerpo de un sujeto en el que se introduce y se coloca un dispositivo de suministro de fármacos. Los sitios de implantación incluyen, pero no se limitan necesariamente a un lugar subdérmico, subcutáneo, intramuscular, u otro lugar adecuado dentro del cuerpo de un sujeto.

En algunas modalidades, un agente activo es suministrado mediante un sistema de suministro de fármacos implantable, por ejemplo, un sistema que es programable para proporcionar a la administración del agente. Los sistemas programables, implantables ejemplares incluyen bombas de infusión implantables. Los ejemplos de bombas de infusión implantables, o dispositivos útiles en relación con tales bombas, se describen en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N°s 4,350,155; 5,443,450; 5,814,019; 5,976,109; 6,017,328; 6,171,276; 6,241,704;

6,464,687; 6,475,180; y 6,512,954. Un dispositivo ejemplar, además, que se puede adaptar a la presente divulgación es la bomba de infusión de Synchromed (Medtronic).

Los vehículos excipientes adecuados para el agente de inhibición son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Los métodos de preparación de tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes tras la consideración de esta divulgación, para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a edición, 1985. La composición o formulación a administrar, en cualquier caso, contendrá una cantidad de agente de inhibición de la adecuada para lograr el estado deseado en el sujeto que está siendo tratado.

Las composiciones de la presente invención incluyen los que comprenden una liberación sostenida o matriz de liberación controlada. Además, las modalidades de la presente invención se pueden utilizar en conjunción con otros tratamientos que utilizan formulaciones de liberación sostenida. Tal como se usa en el presente documento, una matriz de liberación sostenida es una matriz hecha de materiales, normalmente polímeros, que son degradables por hidrólisis enzimática o a base de ácido, o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz sufre la acción de las enzimas y fluidos corporales. Una matriz de liberación

sostenida es elegida deseablemente a partir de materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), polilactida coglicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxylic, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, ácidos poliamino, ácidos amino tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, propileno polivinílico, polivinilpirrolidona, y silicona. Las matrices biodegradables ilustrativas incluyen una matriz de polilactida, una matriz de poliglicólido, y una matriz de polilactida coglicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

En otra modalidad, la composición farmacéutica de la presente divulgación (así como composiciones de combinación) es entregada en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente de inhibición puede administrarse usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una modalidad puede utilizarse una bomba (Sefton 1987; Buchwald et al 1980; Saudek et al 1989). En otra modalidad, se utilizan materiales poliméricos. En aún otra modalidad, un sistema de liberación controlada es colocado en proximidad del blanco terapéutico, es decir, el hígado, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica. En aún otra modalidad, un sistema de liberación controlada es colocado en proximidad del blanco terapéutico, requiriendo así sólo una fracción de la sistémica. Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990).

En otra modalidad, las composiciones de la presente invención (así como las composiciones de combinación por separado o conjuntamente) incluyen las formadas por impregnación de un agente de inhibición descrita en este documento en los materiales absorbentes, tales como suturas, vendajes y gasas, o como revestimiento sobre la superficie de materiales de fase sólida, tales como grapas, cremalleras y catéteres quirúrgicos para suministrar las composiciones. Otros sistemas de suministro de este tipo serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación.

Métodos de tratamiento

Las modalidades de la presente invención incluyen métodos de tratamiento de una infección por infección viral a partir de virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP distintos del VHC. En particular, los agentes inhibidores descritos en el presente documento pueden usarse para tratar una infección por un virus de la familia Flaviviridae de virus. En una modalidad, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un portador infectado con un virus tal como se describe anteriormente mediante la administración al portador de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de inhibición en una o más dosis, para reducir la carga viral en el portador.

Las modalidades de la presente invención incluyen métodos para tratar profilácticamente una infección por una infección viral a partir del virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP distintos de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC. En particular, los agentes de inhibición descritos en el presente documento se pueden usar para tratar profilácticamente una infección por un virus de la familia Flaviviridae de virus. En una modalidad, la presente divulgación proporciona un método para tratar profilácticamente un portador infectado con un virus a partir de la familia Flaviviridae de virus mediante la administración al portador de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de inhibición en una o más dosis, para reducir la carga viral en el portador. En una modalidad, un método de tratamiento profiláctico de un portador infectado con un virus de la familia Flaviviridae de virus, el método comprende administrar al portador una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de inhibición para reducir la carga viral en el portador. Los detalles adicionales con respecto a clemizol y dosificación de clemizol se han descrito anteriormente.

En una modalidad, los agentes de inhibición descritos en el presente documento son utilizados en combinación con otro agente (por ejemplo, un agente antiviral) para tratar una infección con infección viral a partir del virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como coinfecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de

VHC. En una modalidad, los agentes inhibición descritos en el presente documento son utilizados en combinación con otro agente (por ejemplo, un agente antiviral) para tratar profilácticamente una infección con un virus de la familia Flaviviridae de virus. Las modalidades del método implican administrar a un individuo en necesidad del mismo uno o más agentes de inhibición que inhiben la unión de las proteínas virales que contienen un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas adaptadoras de clatrina como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP. En una modalidad, la presente invención proporciona métodos para tratar una infección por flavivirus, por ejemplo, una infección por VHC, y métodos de reducción de la fibrosis hepática que puede ocurrir como secuela de una infección por VHC.

En una modalidad, el agente de inhibición incluye uno o más agentes de inhibición descritos anteriormente. En diversas modalidades, el agente de inhibición es un inhibidor de la proteína quinasa, tales como inhibidores de la AAK1 o GAK, que regula la unión de proteínas virales - AP2M1 o unión de una proteína viral para otras subunidades μ de complejos clatrina AP y mediar el montaje/brote del virus, o variantes de estas proteínas de los mismos.

En una modalidad, una cantidad eficaz del agente de inhibición es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un portador (por ejemplo, un ser humano) con necesidad del mismo, reduce la carga viral en el individuo en al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 15% , al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 25%, al menos alrededor de 30%, al

menos alrededor de 35%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 45%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 55% , al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, o al menos alrededor de 90%, o más, en comparación con la carga viral en el individuo no tratado con el agente de inhibición.

La carga viral puede ser medida mediante la medición del grado o nivel de virus en el suero. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, una reacción cuantitativa en cadena de polimerasa (PCR) y una prueba de ADN ramificado (bADN). Los ensayos cuantitativos para la medición de la carga viral (grado) de ARN del VHC se han desarrollado. Muchos de estos ensayos están disponibles comercialmente, incluyendo una PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) (Amplicor VHC Monitor.TM., Roche Molecular Systems, Nueva Jersey) ; y un ensayo de amplificación de señal de ADN ramificado [Quantiplex™ ensayo de ARN del VHC (bADN), Chiron Corp., Emeryville, CA.]. Véase, por ejemplo, Gretch et al. (1995). También de interés es una prueba de ácido nucleico (NAT) vendido por Chiron Corporation bajo el nombre comercial Procleix™, que pone a prueba NAT simultáneamente para la presencia de VIH -1 y VHC (Vargo et al. 2002).

En algunas modalidades, una cantidad eficaz del agente de inhibición es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un portador (por ejemplo, un ser humano) con necesidad del mismo, aumenta la función hepática en el individuo en al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 15%, al

menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 25%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 35%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 45%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 55%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70% , al menos alrededor de 75% , al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, o al menos alrededor de 90%, o más, en comparación con la función hepática en el individuo no tratado con el agente de inhibición.

En algunas modalidades, una cantidad eficaz del agente de inhibición es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un portador (por ejemplo, un ser humano) con necesidad del mismo, reduce la fibrosis hepática en el portador en al menos alrededor de 10%, en al menos alrededor de 15%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 25%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 35%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 45%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 55%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, o al menos alrededor de 90%, o más, en comparación con el grado de fibrosis hepática en el individuo no tratado con el agente de inhibición.

Las modalidades de la presente divulgación proporcionan métodos, agentes de inhibición, y formulaciones farmacéuticas útiles en el tratamiento de pacientes que sufren de una infección viral a partir de virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co-infecciones de

VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC. En una modalidad, el paciente está coinfectado con Flaviviridae diferente de VHC. En una modalidad, el paciente está infectado con el VHC, pero no se sabe que está infectado con otro virus, incluyendo, pero no limitado a, VIH. En otra modalidad, el paciente está infectado con el VHC y uno o más virus adicionales, incluyendo, pero no limitado a, VIH. En una modalidad, el paciente es tratado por una infección viral mediante la administración de un solo agente de inhibición tal como se describe en el presente documento, como útil en el tratamiento de la infección por el VHC. En otra modalidad, el paciente es tratado por una infección viral mediante la administración de tanto un agente de inhibición descrito en el presente documento, como útil en el tratamiento de la infección por VHC , así como uno o más agentes adicionales conocidos por ser útiles en el tratamiento de la infección viral, incluyendo, pero no limitándose a los medicamentos para el tratamiento de VIH, como Atripla, Complera, Combivir, Retrovir, Truvada, Viracept, Fuzeon, Selzentry, Isentress, o similares. En una modalidad, uno o más agentes adicionales no incluyen un antagonista de CCR-5. En otra modalidad, uno o más agentes adicionales sí incluye un antagonista de CCR-5, y el paciente está infectado con el VHC, pero no sabe que está infectado (o no está infectado) con el VIH.

Dosis

Las modalidades del agente de inhibición pueden ser administradas a un portador en una o más dosis. En una modalidad, el agente de inhibición puede ser

administrado en una cantidad de alrededor de 10 mg a 1000 mg por dosis, por ejemplo, alrededor de 10 mg a 20 mg, alrededor de 20 mg a 25 mg, alrededor de 25 mg a 50 mg, alrededor de 50 mg a 75 mg, alrededor de 75 mg a 100 mg, alrededor de 100 mg a 125 mg, alrededor de 125 mg a 150 mg, alrededor de 150 mg a 175 mg, alrededor de 175 mg a 200 mg, alrededor de 200 mg a 225 mg, alrededor de 225 mg a 250 mg, alrededor de 250 mg a 300 mg, alrededor de 300 mg a 350 mg, alrededor de 350 mg a 400 mg, alrededor de 400 mg a 450 mg, alrededor de 450 mg a 500 mg, alrededor de 500 mg a 750 mg, o alrededor de 750 mg a 1000 mg por dosis.

En una modalidad, la cantidad del agente de inhibición por dosis es determinada sobre una base de peso por cuerpo. Por ejemplo, en una modalidad, el agente de inhibición puede ser administrado en una cantidad de alrededor de 0,5 mg/kg a 100 mg/kg, por ejemplo, alrededor de 0,5 mg/kg a 1 mg/kg, alrededor de 1 mg/kg a 2 mg/kg, alrededor de 2 mg/kg a 3 mg/kg, alrededor de 3 mg/kg a 5 mg/kg, alrededor de 5 mg/kg a 7 mg/kg, alrededor de 7 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, alrededor de 10 mg/kg a 15 mg/kg, alrededor de 15 mg/kg a 20 mg/kg, alrededor de 20 mg/kg a 25 mg/kg, alrededor de 25 mg/kg a 30 mg/kg, alrededor de 30 mg/kg a 40 mg/kg, alrededor de 40 mg/kg a 50 mg/kg, alrededor de 50 mg/kg a 60 mg/kg, alrededor de 60 mg/kg a 70 mg/kg, alrededor de 70 mg/kg a 80 mg/kg, alrededor de 80 mg/kg a 90 mg/kg, o alrededor de 90 mg/kg a 100 mg/kg, o más de alrededor de 100 mg/kg.

Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar como una función del agente de inhibición específico administrado, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a efectos secundarios. Las dosificaciones preferidas para un compuesto dado son fácilmente determinables por los expertos en la técnica mediante una variedad de medios.

En una modalidad, se administran dosis múltiples de agente de inhibición. La frecuencia de administración del agente de inhibición puede variar dependiendo de cualquiera de una variedad de factores, por ejemplo, la gravedad de los síntomas, y similares. Por ejemplo, en una modalidad, el agente de inhibición es administrado una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos semanas (qow), una vez por semana (qw), dos veces por semana (biw), tres veces por semana (tiw), cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana, en días alternos (qod), diario (qd), dos veces al día (qid), o tres veces al día (tid). Tal como se discutió anteriormente, en una modalidad, el agente de inhibición es administrado de manera continua.

La duración de la administración del agente de inhibición, por ejemplo, el período de tiempo durante el que es administrado el agente inhibidor, puede variar, dependiendo de cualquiera de una variedad de factores, por ejemplo, la respuesta del paciente, etc. Por ejemplo, el agente de inhibición puede ser administrado durante un periodo de tiempo de alrededor de un día a una semana, alrededor de dos semanas a cuatro semanas, alrededor de un mes a dos meses, alrededor de dos meses a cuatro meses, alrededor de cuatro a seis meses,

alrededor de seis meses a ocho meses, alrededor de ocho meses a 1 año, alrededor de 1 año a 2 años, o alrededor de 2 años a 4 años, o más.

Vías de administración

Las modalidades de la presente invención proporcionan métodos y composiciones para la administración del agente de inhibición a un portador (por ejemplo, un ser humano) usando cualquier método y vía adecuada para la administración de fármacos, incluyendo métodos in vivo y ex vivo, así como vías de administración sistémicas y localizadas.

Las vías de administración incluyen intranasal, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intradérmica, aplicación tópica, intravenosa, rectal, nasal, oral, y otras rutas enterales y parenterales de administración. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea, o ajustarse dependiendo del agente y/o el efecto deseado. Un agente activo puede administrarse en una sola dosis o en dosis múltiples.

Las modalidades del agente de inhibición pueden ser administradas a un portador usando métodos y rutas adecuadas para la administración de fármacos convencionales, incluyendo las rutas sistémicas o localizadas convencionales. En general, las vías de administración contempladas por la divulgación incluyen, pero no se limitan a, enteral, parenteral, o rutas de inhalación.

Las vías parenterales de administración distintas de la administración por inhalación incluyen, pero no se limitan a, tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal, e intravenosa, es decir, cualquier vía de administración que no sea a través del canal alimentario. La administración parenteral puede llevarse a cabo para efectuar la administración sistémica o local del agente de inhibición. Cuando se desea la distribución sistémica, la administración típicamente implica la administración tópica o mucosa absorbida sistémicamente o invasivamente de preparaciones farmacéuticas.

El agente de inhibición también puede ser suministrado al sujeto por administración entérica. Las rutas enterales de administración incluyen, pero no se limitan a, al suministro oral y rectal (por ejemplo, usando un supositorio).

Los métodos de administración del agente de inhibición a través de la piel o la mucosa incluyen, pero no se limitan a, la aplicación tópica de una preparación farmacéutica adecuada, transmisión transdérmica, inyección y administración epidérmica. Para la transmisión transdérmica, promotores de la absorción o iontoforesis son métodos adecuados. La transmisión iontoforética puede realizarse usando "parches " disponibles comercialmente que suministran sus productos de forma continua a través de impulsos eléctricos a través de la piel intacta durante períodos de varios días o más.

Terapias de Combinación

Las modalidades de la presente invención incluyen métodos, agentes de inhibición, y formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de la infección viral. Las modalidades de los agentes de inhibición y formulaciones farmacéuticas útiles en los métodos de la presente divulgación pueden ser empleados en combinación con otros agentes antivirales para tratar la infección viral. En una modalidad, de conformidad con los métodos de la presente invención, un agente de inhibición que se utiliza para el tratamiento de un portador infectado por la infección a partir del virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co- infecciones VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP distintos de VHC es utilizado en combinación con uno o más de otros agentes antivirales para tratar la infección. En una modalidad, de conformidad con los métodos de la presente invención, un agente de inhibición que impide la unión de al menos una proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP (también referido en el presente documento como un " YXXΦ de VHC o antagonista de dileucina") puede ser utilizado en combinación con uno o más de otros agentes antivirales para tratar la infección viral.

Por ejemplo, la práctica médica actual para tratar la infección por el VHC emplea típicamente la terapia de combinación con ribavirina (tales como Rebetol o Copegus), ya sea un interferón-alfa (tal como el interferón alfa 2b) o interferón

pegilado (tales como Pegasys, comercializado por Roche, o PEG-Intron, comercializado por Schering Plough), y un inhibidor de proteasa. De acuerdo con los métodos de la presente descripción, un compuesto de inhibición puede ser utilizado en combinación con estas terapias estándar para el tratamiento de la infección por VHC.

Un número de inhibidores de proteasa del VHC y de la polimerasa son, ya sea aprobados o en desarrollo, para el tratamiento de la infección por VHC, y de acuerdo con los métodos de la presente divulgación, la co-administración de un agente de inhibición que impide la unión de al menos una proteína viral que contiene un motivo YXX Φ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP y un inhibidor de la proteasa del VHC pueden ser eficaces en el tratamiento de VHC. En una modalidad, se emplea / emplean también en esta terapia de combinación, un alfa interferón y/o un análogo de nucleósido tales como ribavirina. Los inhibidores de la proteasa del VHC adecuados incluyen, pero no se limitan a, telaprevir (VX - 950, Vertex), BILN 2061 y BI12202 (Boehringer Ingelheim), boceprevir (SCH 503034, Schering Plough), ITMN191 (Roche / InterMune / Array BioPharma), MK - 7009 (Merck), TMC435350 (Tibotec/Medivir), ACH - 1095 y ACH - 806 (Achillion / Gilead) , y otros inhibidores de la proteasa NS3/NS4A, incluyendo, pero no limitado a, compuestos en desarrollo por Presidio.

De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, la co-administración de un agente de inhibición que impide la unión de al menos una

proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP y un inhibidor de la polimerasa ARN de VHC puede ser eficaz en el tratamiento de VHC. En una modalidad, un alfa interferón y / o un análogo de nucleósido tales como ribavirina y/o un inhibidor de la proteasa del VHC es/son empleados también en esta terapia de combinación. Los inhibidores de polimerasa ARN de VHC adecuados incluyen, pero no se limitan a, valopicitabina (NM283, Idenix/Novartis), VHC-796 (Wyeth/ViroPharma), R1626 (Roche), R7128 (Roche/Pharmasset), GS-9190 (Gilead), MK- 0608 (Merck), PSI- 6130 (Pharmasset) y PFE- 868,554 (PFE). En una modalidad, el método proporciona tratamientos de combinación con agentes que inhiben AAK1 y GAK.

Un número de agonistas receptores (TLR) de tipo Toll están en desarrollo para el tratamiento de la infección por VHC, y de acuerdo con los métodos de la presente divulgación, la co-administración de un YXXΦ o antagonista de dileucina que impide la unión de al menos una proteína vírica que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP y un agonista de TLR pueden ser eficaces en el tratamiento de VHC. En una modalidad, un alfa interferón y/o un análogo de nucleósido tales como ribavirina y/o un inhibidor de la proteasa del VHC y/o un inhibidor de polimerasa ARN de VHC es/son también empleados en esta terapia de combinación. Los agonistas de TLR adecuados incluyen, pero no se limitan a, los agonistas de TLR7 [es decir, ANA245 y ANA975 (Anadys/Novartis)] y agonistas TLR9 [es decir, Actilon(Coley) y la IMO-2125 (Idera)].

Un número de derivados de thiazolide están en desarrollo para el tratamiento de la infección por VHC, y de acuerdo con los métodos de la presente divulgación, la co-administración de un antagonista que impide la unión de al menos una proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP, y un thiazolide, incluyendo, pero no limitado a, Nitazoxanida (Alinia, u otras formulaciones de liberación sostenida de la nitazoxanida u otros tiazolidas, Laboratorios Romark) pueden ser eficaces en el tratamiento del VHC. En una modalidad, un alfa interferón y/o un análogo de nucleósido tales como ribavirina y/o un inhibidor de la proteasa del VHC y/o un inhibidor de polimerasa ARN de VHC y/o un agonista del TLR es/son también empleados en esta terapia de combinación.

En otra modalidad de los métodos de la presente divulgación, la co-administración de un agente de inhibición que impide la unión de al menos una proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP, y un inhibidor de la ciclofilina [es decir, MIN-811 (Novartis) y DEBIO-025 (Debiopharm)] y/o un inhibidor de la alfa-glucosidasa [es decir, Celgosivir (Migenix)] y/o uno o más agentes a partir de uno o más de las otras clases de agentes terapéuticos de VHC discutidos en este documento son utilizados para tratar la infección por el VHC.

Otros agentes que pueden ser utilizados en combinación con agentes de inhibición de la presente divulgación que impiden la unión de al menos una

proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP incluyen (i) agentes que dirigen NS5A, incluyendo, pero no limitándose a, A- 831 (Arrow Therapeutics), AZD2836 (Astra Zeneca), y agentes en el desarrollo por XTL/Presidio o BMS (véase las publicaciones PCT WO 2006/133326 y WO 2008/021928, incorporadas en la presente por referencia); (ii) agentes que dirigen TBC1D20 y/o la interacción de la NS5A con TBC1D20 (véase la publicación PCT WO 2007/018692 y la solicitud de patente de EE.UU. Ser. Nº 11/844, 993, incorporada en la presente por referencia); (iii) actividad GTPasa de agentes que dirigen NS4B (véase publicación PCT WO 2005/032329 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2006/0199174, incorporada en la presente como referencia); (iv) agentes que inhiben la asociación de membrana mediada por las hélices anfipáticas de VHC, tales como las que se encuentran en NS5A, NS4B, y NS5B (véase la publicación PCT WO 2002/089731, supra); (v) agentes que dirigen PIP2 o dominios BAAPP en las proteínas del VHC, tales como las que se encuentran en NS4B y NS5A (véase solicitud de patente provisional de EE.UU. 60/057,188, supra); (vi) agentes que dirigen la entrada, montaje, o liberación del VHC, incluyendo los anticuerpos a los co-receptores; (vii) agentes que dirigen helicasa NS3 del VHC; (viii) siARNs, shARNs, ARN antisentido u otras moléculas basadas en ARN que dirigen secuencias en VHC; (ix) agentes que dirigen microARN122 u otros microARNs que modulan la replicación del VHC; (x) agentes que dirigen interacciones o vías PD-1, PD-L1, o PD-L2 (véase las publicaciones de solicitud de patente EE.UU. 2008/0118511, 2007/0065427, 2007/0122378,

incorporadas en la presente como referencia); y (xi) agentes que dirigen la función de hélice anfipática del VHC, tales como inhibidores de AH2.

En otra modalidad de la presente divulgación, un agente de inhibición que impide la unión de al menos una proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP es utilizado en combinación con uno o más fármacos capaces de tratar una infección por VIH para el tratamiento de un paciente que está coinfectado con el VIH y el VHC. En otra modalidad de la presente divulgación, un agente de inhibición que impide la unión de al menos una proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP es utilizado en combinación con uno o más fármacos capaces de tratar una infección por VHB para tratar a un paciente que está coinfectado con el VHB y el VHC. En una modalidad, un agente de inhibición que impide la unión de al menos una proteína viral que contiene un motivo YXXΦ o de dileucina para albergar proteínas tales como AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP es utilizado en combinación con un inhibidor de PD- L1 para tratar una infección viral.

Tal como se mencionó anteriormente, las modalidades de la presente invención incluyen la administración de un agente de inhibición identificado en el presente documento (o mediante el uso de una modalidad de la pantalla de la invención) en conjunción con al menos un agente terapéutico adicional para tratar una infección viral. Los agentes terapéuticos adicionales adecuados incluyen, pero

no se limitan a, ribavirina; un análogo de nucleósido (es decir, levovirina, viramidina, etc); un inhibidor de NS3; un inhibidor de NS5; un interferón; y un agente de administración de efecto secundario.

En una modalidad, al menos un agente terapéutico adecuado adicional incluye ribavirina. La ribavirina, I-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida, disponible a partir de ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, California, es descrita en el Merck Index, compuesto N° 8199, undécima edición. Su fabricación y formulación son descritas en la Patente de EE.UU. N° 4,211,771. La divulgación también contempla el uso de derivados de ribavirina (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 6,277,830).

En una modalidad, al menos un agente terapéutico adecuado adicional incluye levovirina. La levovirina es el L-enantiómero de la ribavirina, y exhibe la propiedad de aumentar una respuesta inmune Th1 a través de una respuesta inmune Th2. La levovirina es fabricada por ICN Pharmaceuticals.

En una modalidad, al menos un agente terapéutico adecuado adicional incluye viramidina. La viramidina es un derivado 3-carboxamidina de ribavirina, y actúa como un profármaco de la ribavirina. Esta se convierte de manera eficiente en ribavirina por desaminasas de adenosina.

Los análogos de nucleósidos que son adecuados para su uso en una terapia de combinación incluyen, pero no se limitan a, ribavirina, levovirina,

viramidina, isatoribina, un nucleósido L-ribofuranosil como se divulga en la Patente de EE.UU. N° 5,559,101 y son abarcados por la Fórmula I de la Patente de EE.UU. N° 5,559,101 (por ejemplo, 1-β-L-ribofuranosiluracilo, 1-β-L-ribofuranosil-5-fluorouracilo, 1-β-L-ribofuranosilcitosina, 9-β-L-ribofuranosiladenina, 9-β-L-ribofuranosilhipoxantina, 9-β-L-ribofuranosilguanina, 9-β-L-ribofuranosil-6-tioguanina, 2-amino-α-L-ribofuranil[1',2':4,5]oxazolina, 0₂,0₂-anhidro-1-α-L-ribofuranosiluracilo, 1-α-L-ribofuranosiluracilo, 1-(2,3,5-tri-O-benzoil-α-L-ribofuranosil)-4-tiouracilo, 1-α-L-ribofuranosilcitosina, 1-α-L-ribofuranosil-4-tiouracilo, 1-α-L-ribofuranosil-5-fluorouracilo, 2-amino-β-L-arabinofuranol[1',2':4,5]oxazolina, 0₂,0₂-anhidro-β-L-arabinofuranosiluracilo, 2'-desoxi-β-L-uridina, 3'5'-Di-O-benzoil-2'-deoxy-4-tio β-L-uridina, 2'-desoxi-β-L-citidina, 2'-desoxi-β-L-4-tiouridina, 2'-desoxi-β-L-timidina, 2'-desoxi-β-L-5-fluorouridina, 2',3'-didesoxi-β-L-uridina, 2'-desoxi-β-L-5-fluorouridina, y 2'-desoxi-β-L-inosina); un compuesto tal como se divulga en la Patente de EE.UU. N° 6,423,695 y abarcados por la Fórmula I de la Patente de EE.UU. N° 6,423,695; un compuesto tal como se divulga en la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2002/0058635, y abarcados por la Fórmula 1 de la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2002/0058635; un análogo de nucleósido tal como se divulga en el documento WO 01/90121 A2 (Idenix); un análogo de nucleósido tal como se divulga en el documento WO 02/069903 A2 (Biocryst Pharmaceuticals Inc.); un análogo de nucleósido tal como se divulga en el documento WO 02/057287 A2 o WO 02/057425 A2 (ambas de Merck/Isis); y similares.

En una modalidad, al menos un agente terapéutico adicional adecuado puede incluir inhibidores de NS3 VHC. Los inhibidores de proteínas-3(NS3) de VHC adecuados no estructurales incluyen, pero no se limitan a, un tripéptido tal como se describe en la Patente de EE.UU. N°s 6,642,204; 6,534,523; 6,420,380; 6,410,531; 6,329,417; 6,329,379; y 6,323,180 (Boehringer - Ingelheim); un compuesto tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6,143,715 (Boehringer-Ingelheim); un compuesto macrocíclico tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6,608,027 (Boehringer-Ingelheim); un inhibidor de NS3 tal como se describe en la Patente de EE.UU. N°s. 6,617,309; 6,608,067; y 6,265,380 (Vertex Pharmaceuticals); un compuesto azapéptido tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6,624,290 (Schering); un compuesto tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5,990,276 (Schering); un compuesto tal como se describe en Pause et al. (2003); el inhibidor NS3 de BILN 2061 (Boehringer-Ingelheim); Lamarre et al (2002), y Lamarre et al (2003); el inhibidor NS3 de VX-950 (Vertex Pharmaceuticals; Kwong et al (2003); inhibidor NS3 de SCH6 (Abib et al. (2003); Programa y Resúmenes de la 54ª Reunión anual de la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD, 2003); y cualquiera de los inhibidores de la proteasa NS3 divulgados en WO 99/07733, WO 99/07734, WO 00/09558, WO 00/09543, WO 00/59929, o WO 02/060926 (por ejemplo, los compuestos de 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 18, 19, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 55, 59, 71, 91, 103, 104, 105, 112, 113, 114, 115, 116, 120, 122, 123, 124, 125, 126, y 127 divulgados en la tabla de las páginas 224-226 en el documento WO 02/060926); un inhibidor de la proteasa de NS3 tal como se describe en una

cualquiera de las publicaciones de patente de EE.UU. N° 2003/019067, 2003/0187018, y 2003/0186895; y similares.

En una modalidad, el inhibidor de NS3 utilizado en una terapia de combinación de la invención es un miembro de la clase de inhibidores de NS3 específicos, es decir, los inhibidores NS3 que inhiben la actividad de la proteasa NS3 serina y que no muestran actividad inhibidora significativa contra otras proteasas de serina tales como elastasa de leucocitos humana, elastasa pancreática porcina, o la quimotripsina pancreática bovina, o proteasas de cisteína tales como la catepsina B del hígado humano.

En una modalidad, al menos un agente terapéutico adecuado adicional incluye inhibidores de NS5B. Los inhibidores de proteína-5 (NS5; ARN polimerasa dependiente de ARN) no estructurales de VHC adecuados incluyen, pero no se limitan a, un compuesto tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6,479,508 (Boehringer-Ingelheim); un compuesto tal como se describe en cualquiera de las Solicitudes de Patente Internacional N°s PCT/CA02/01127, PCT/CA02/01128, y PCT/CA02/01129, todas ellas presentadas el 18 de julio de 2002 por Boehringer Ingelheim; un compuesto tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6,440,985 (ViroPharma); un compuesto tal como se describe en WO 01/47883, por ejemplo, JTK-003 (Japan Tobacco); un análogo de dinucleótido tal como se describe en Zhong et al. (2003); un compuesto de benzotiadiazina tal como se describe en Dhanak et al. (2002); un inhibidor de NS5B tal como se describe en WO 02/100846 A1 o WO 02/100851 A2 (ambos de Shire); un inhibidor

de NS5B tal como se describe en WO 01/85172 A1 o WO 02/098424 A1 (ambos de Glaxo SmithKline); un inhibidor de NS5B tal como se describe en WO 00 / 06529 o WO 02/06246 A1 (tanto de Merck); un inhibidor de NS5B tal como se describe en WO 03/000254 (Japan Tobacco); un inhibidor de NS5B tal como se describe en EP 1 256, 628 A2 (Agouron); JTK - 002 (Japan Tobacco); JTK-109 (Japan Tobacco); y similares.

En una modalidad, el inhibidor de NS5 utilizado en las terapias de combinación de la invención es un miembro de la clase de inhibidores de NS5 específicos, es decir, los inhibidores de NS5 que inhiben ARN polimerasa dependiente de ARN de NS5 y que carece de efectos inhibitorios significativos hacia otras ARN polimerasas dependientes de ARN y hacia ARN polimerasas dependientes de ADN.

En una modalidad, al menos un agente terapéutico adicional es un interferón, es decir, interferón-alfa (IFN- α). Cualquier IFN- α conocido puede ser utilizado en los métodos de tratamiento de la invención. El término "interferón-alfa" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una familia de polipéptidos relacionados que inhiben la replicación viral y la proliferación celular, y modulan la respuesta inmune. El término "IFN- α " incluye IFN- α de origen natural; IFN- α sintética; IFN- α derivado (es decir, IFN- α PEGilado, IFN- α glicosilado, y similares); y análogos IFN- α de origen natural o sintético; esencialmente cualquier IFN- α que tiene propiedades antivirales, tal como se describe para IFN- α de origen natural.

Los interferones adecuados incluyen, pero no se limitan a, IFN- α de origen natural (incluyendo, pero no limitado a, IFN- α 2a, IFN- α 2b de origen natural); El interferón α -2b recombinante tal como el interferón Intron-A disponible de Schering Corporation, Kenilworth, N.J.; el interferón recombinante α -2a tal como el interferón Roferon disponible de Hoffmann-La Roche, Nutley, N.J.; el interferón recombinante α -2C tal como el interferón Berofor α 2 disponible de Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn.; el interferón α -n1, una mezcla purificada de interferones α naturales tales como Sumiferon disponibles de Sumitomo, Japón o como el interferón Wellferon α -n1 (INS) disponible de Glaxo-Wellcome Ltd., Londres, Gran Bretaña; y el interferón α -n3 una mezcla de un interferones α naturales fabricada por Interferon Sciences y disponible de la Purdue Frederick Co., Norwalk, Conn., bajo el nombre comercial Alferon.

El término "IFN- α " abarca también el consenso de IFN- α . El consenso de IFN- α (también referido como "CIFN" y "IFN-con" y "interferón de consenso") abarca, pero no se limita a, las secuencias de aminoácidos designados IFN-con₁, IFN-con₂ y IFN-con₃ que son divulgados en las Patentes de EE.UU. N°s. 4,695,623 y 4,897,471; y el interferón de consenso tal como se define por determinación de una secuencia de consenso de interferones alfa de origen natural (es decir, Infergen.RTM., InterMune, Inc., Brisbane, CA.). El IFN-con₁ es el agente de interferón de consenso en el alfacon- 1 producto Infergen™. El producto de interferón de consenso Infergen™ se denomina en la presente por su nombre comercial (Infergen™) o por su nombre genérico (interferón alfacon-1). Las secuencias de ADN que codifican el IFN-con pueden ser sintetizadas tal como se

describe en las patentes mencionadas anteriormente u otros métodos estándar. En una modalidad, al menos un agente terapéutico adicional es C1FN.

En una modalidad, los polipéptidos de fusión que comprenden un IFN- α y un polipéptido heterólogo también pueden ser utilizados en las terapias de combinación de la invención. Los polipéptidos de fusión IFN- α adecuados incluyen, pero no se limitan a, Albuferon-alfa™ [un producto de fusión de la albúmina humana e IFN- α ; Ciencias del Genoma Humano; véase, por ejemplo, Osborn et al.(2002)]. También son adecuados para su uso en la presente divulgación, las formas de genes-barajado de IFN- α . Véase, por ejemplo, Masci et al. (2003). Otros interferones adecuados incluyen, Multiferon (Viragen), Interferón Medusa (Flamel Technology), Locteron (Octopus) y Interferón Omega (Intarcia/Boehringer Ingelheim).

El término "IFN- α " también abarca derivados de IFN- α que son derivados (es decir, están modificados químicamente con respecto al péptido de origen natural) para alterar ciertas propiedades tales como la vida media en suero. Tales como, el término "IFN- α " incluye IFN- α glicosilado; IFN- α derivado con polietilenglicol ("IFN- α PEGilado"); y similares.

El IFN- α PEGilado, y métodos para fabricar la misma, se discuten en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N°s. 5,382,657; 5,981,709; y 5,951,974. El IFN- α PEGilado abarca un conjugados de PEG y algunos de las moléculas IFN- α descritas anteriormente, incluyendo, pero no limitándose a, el PEG conjugado a

interferón alfa-2a (Roferon, Hoffman La-Roche, Nutley, N.J.), el interferón alfa 2b (Intron, Schering-Plough, Madison, N.J.), el interferón alfa-2c (Berofor Alfa, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania); y el interferón de consenso tal como se define mediante la determinación de una secuencia de consenso de interferones alfa de origen natural (Infergen™, InterMune, Inc., Brisbane, CA).

En una modalidad, los polipéptidos IFN- α pueden ser modificados con uno o más restos de polietilenglicol, es decir, PEGilados. La molécula PEG de un polipéptido de IFN- α PEGilado se conjuga a una o más cadenas laterales de aminoácidos de polipéptido IFN- α PEGilado. En una modalidad, el IFN- α PEGilado contiene un resto de PEG en sólo un aminoácido. En otra modalidad, el IFN- α PEGilado contiene un resto de PEG en dos o más aminoácidos, es decir, el IFN- α contiene un resto de PEG unido a dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez diferentes residuos de aminoácidos. El IFN- α puede ser acoplado directamente al PEG (es decir, sin un grupo de enlace) a través de un grupo amino, un grupo sulfhidrilo, un grupo hidroxilo, o un grupo carboxilo.

Para determinar la combinación óptima de un agente de inhibición, tales como PKC-412, erlotinib, sunitinib, y similares, con otros agentes anti-VHC, los ensayos de replicación del VHC y/o estudios en animales pueden ser realizados en presencia de diversas combinaciones de la varios agentes anti-VHC. El aumento de la inhibición de la replicación en presencia de un agente adicional (por encima de la observada con la monoterapia) es evidencia del beneficio potencial de la terapia de combinación.

Por ejemplo, los ensayos de replicación del VHC que emplea un informador de luciferasa unido al genoma del VHC en presencia de diversas combinaciones de la PKC-412, erlotinib, sunitinib, y similares. En tales ensayos, la actividad de la luciferasa es directamente proporcional a la replicación del genoma ARN del VHC.

En una modalidad, los agentes de administración de efectos secundarios pueden ser utilizados en los métodos de tratamiento de la invención, y éstos incluyen agentes que son eficaces en el tratamiento del dolor; los agentes que mejoran el malestar gastrointestinal; los analgésicos, los antiinflamatorios, los antipsicóticos, los antineuroticos, los ansiolíticos y los agentes hematopoyéticos. Además, las modalidades de la invención contemplan el uso de cualquier compuesto para el cuidado paliativo de pacientes que sufren de dolor o cualquier otro efecto secundario en el transcurso del tratamiento con una terapia al sujeto. Los agentes paliativos ejemplares incluyen acetaminofeno, ibuprofeno, otros NSAIDs, bloqueadores de H₂ y antiácidos. En una modalidad, la divulgación proporciona un método de tratamiento con agentes que inhiben GAK y agentes que inhiben AAK1. En una modalidad, tal co-tratamiento proporciona efectos sinérgicos, tales como efectos antivirales.

Portadores adecuados para el tratamiento

Los portadores adecuados para el tratamiento con una modalidad del agente de inhibición o una modalidad del método incluyen los portadores que están infectados con la infección viral de los virus de unión de clatrina AP,

Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, co-infecciones, tales como co- infecciones de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP distintos de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP distintos del VHC. Tal como se utiliza en el presente documento, el término Flaviviridae incluye cualquier miembro de la familia Flaviviridae, incluyendo, pero no limitado a, el virus del Dengue, incluyendo el virus Dengue 1, el virus Dengue 2, el virus Dengue 3, el virus del Dengue 4 (véase, por ejemplo, los GenBank Accession N° M23027, M19197, A34774, y M14931); el virus de la Fiebre Amarilla; el virus del Nilo Occidental; el virus de la encefalitis japonesa; el virus de la encefalitis de San Luis; el Virus de la diarrea viral bovina (VBVD); y virus de hepatitis C (VHC); y cualquier serotipo, cepa, genotipo, subtipo, cuasiespecies, o aislamiento de cualquiera de los anteriores. Cuando el Flaviviridae es VHC, el VHC es cualquiera de una serie de genotipos, subtipos, o cuasiespecie, incluyendo, por ejemplo, el genotipo 1, incluyendo 1a y 1b, 2, 3, 4, 6, etc y subtipos (es decir, 2a, 2b, 3a, 4a, 4c, etc), y cuasiespecies.

Los portadores adecuados para el tratamiento con las modalidades de la presente invención incluyen pacientes con falta del tratamiento. El término "pacientes con falta del tratamiento" (o "falta de tratamiento") tal como se utiliza en el presente documento se refiere generalmente a los pacientes infectados por el VHC que no respondieron a la terapia previa para el VHC (referido como "pacientes sin reacción") o que inicialmente respondieron a la terapia previa, pero en los que no se mantuvo la respuesta terapéutica (referido como "recayentes"). La terapia anterior generalmente puede incluir el tratamiento con cualquier agente antiviral que no sea un agente de inhibición de la presente divulgación.

Los portadores adecuados para el tratamiento con modalidades de la presente descripción incluyen a individuos que han sido diagnosticados clínicamente como infectados con el VHC. Las personas que están infectadas con el VHC pueden identificarse mediante la detección de ARN del VHC en la sangre, y/o teniendo un anticuerpo anti-VHC en su suero.

Las personas que son diagnosticadas clínicamente como infectados con el VHC incluyen individuos ingenuos (es decir, los personas no tratadas previamente del VHC).

Los portadores adecuados para el tratamiento con las modalidades de la presente divulgación incluyen personas que tienen cualquier indicio de VHC detectable. El paciente puede estar infectado con cualquier genotipo del VHC (genotipo 1, incluyendo 1a y 1b, 2, 3, 4, 6, etc y subtipos (por ejemplo, 2a, 2b, 3a, etc), particularmente con una dificultad para tratar genotipo tales como el genotipo 1 del VHC y subtipos de VHC particulares y cuasiespecies.

Asimismo, las personas con VHC positivos son adecuado para el tratamiento (tal como se describe anteriormente) quienes exhiben fibrosis o cirrosis temprana grave (Child'sPugh no descompensada de clase A o menor), o cirrosis más avanzada (Child'sPugh descompensada de clase B o C) debido a la infección crónica por el VHC y quienes están en viremia a pesar del tratamiento antiviral previo, o quienes tienen una contraindicación para el tratamiento con un agente antiviral conocido.

En una modalidad, las personas con VHC positivos con fibrosis hepática de etapas de 3 ó 4 de acuerdo con el sistema de puntuación METAVIR, que se conoce en la técnica, son adecuados para el tratamiento con los métodos de la presente divulgación. En otra modalidad, los portadores adecuados para el tratamiento con las modalidades de la presente divulgación son los pacientes con cirrosis descompensada con manifestaciones clínicas, incluyendo los pacientes con cirrosis hepática muy avanzada, incluyendo los que esperan un trasplante de hígado. En todavía modalidad, los portadores adecuados para el tratamiento con las modalidades de la presente divulgación incluyen pacientes con grados más leves de fibrosis, incluyendo aquellos con fibrosis temprana (etapas 1 y 2 en los sistemas de puntuación METAVIR, Ludwig, y Scheuer; o etapas 1, 2, o 3 en el sistema de puntuación de Ishak, todos los cuales son conocidos en la técnica). En una modalidad, el método encuentra uso en el tratamiento de trasplante de hígado después de VHC para el carcinoma hepatocelular inducida por el VHC. En una modalidad, esto sirve para prevenir la reinfección del injerto.

En una modalidad de la presente divulgación, para ayudar de manera óptima a seleccionar los pacientes con más probabilidades de beneficiarse de la terapia, así como para supervisar la eficacia del tratamiento, sobre todo en la cara de fármaco potencial mutante resistente a los virus, el uso de pruebas de diagnóstico apropiadas previstas por la presente invención puede ser de gran beneficio. Por ejemplo, la evaluación de la sensibilidad del virus específico que se encuentra en un determinado paciente a la terapia prevista puede ayudar a

identificar la mejor combinación entre el paciente candidato y el tratamiento apropiado correspondiente.

En una modalidad, el método proporciona al tratamiento de pacientes infectados con virus tal como se describe en el presente documento, particularmente a aquellos infectados con VHC que también son afectados por el cáncer, tales como cáncer hepático.

Ensayos:

La presente divulgación también proporciona métodos in vitro y basados en células de selección de agentes antivirales. En una modalidad, la divulgación proporciona métodos para detectar la interacción entre el motivo YXXΦ y las proteínas del portador. En una modalidad, la presente divulgación proporciona un ensayo de unión para detectar proteínas o agentes que inhiben la unión de un motivo YXXΦ o de dileucine a AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP. Por ejemplo, la divulgación proporciona un método en el que los agentes candidatos tal como se describen en el presente documento se ponen en contacto con un Flaviviridae y AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP. La unión de la Flaviviridae a las proteínas es detectada tal como se conoce en la técnica. La actividad reducida en presencia de un agente candidato en relación con los controles indica la identificación de un inhibidor de unión. En otra modalidad, se utilizan ensayos de unión basados en células. En otra modalidad, se utilizan ensayos de células para la detección de los efectos en el montaje o

brote viral. En esta modalidad, los agentes candidatos se ponen en contacto con un Flaviviridae y una célula que expresa AP2M1 u otras subunidades μ de complejos clatrina AP. Los efectos celulares, tales como brote o montaje viral, o la unión entre el Flaviviridae y la célula pueden ensayarse por métodos conocidos en la técnica. En una modalidad, se utiliza un ensayo de replicación. Un ejemplo de un ensayo de replicación se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2011/0052536 A1, que se incorpora expresamente en la presente por referencia. La unión, brote, o montaje en reducción y similares, del virus en presencia del agente candidato en relación con los controles, indica la identificación de un inhibidor de la unión o agente antiviral. En algunas modalidades, en ensayo de afinidad in vitro de microfluidos, tal como se conoce en la técnica, también se utiliza para permitir la detección de las interacciones débiles y transitorias de proteínas.

En una modalidad, los ensayos de complementación de fragmento de proteínas, tal como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica, son utilizados para validar la interacción entre el núcleo y AP2M1. En otra modalidad, un ensayo de co-immunprecipitación es utilizado para identificar la interacción entre las proteínas.

EJEMPLOS:

Los siguientes ejemplos son incluidos para demostrar las modalidades preferidas de la invención y se expone a una comprensión clara de los principios

de la divulgación. Se debe apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen, representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y por lo tanto pueden considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben, a la luz de la presente divulgación, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las modalidades específicas que se divulgan y todavía obtenerse un resultado igual o similar sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados pueden ser sustituidos por los agentes descritos en el presente documento mientras que se lograrían los mismos o similares resultados. Todos aquellos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Muchas variaciones y modificaciones pueden hacerse a las modalidades de la divulgación descritas anteriormente sin apartarse sustancialmente del espíritu y los principios de la divulgación. Todas estas modificaciones y variaciones están destinadas a ser incluidas en el presente documento dentro del alcance de esta divulgación.

Ejemplo 1

La identificación de un motivo YXXΦ dentro del núcleo HCV

La inspección de la secuencia primaria de la proteína del núcleo de VHC revela un motivo YIP(V/L) conservado dentro del segundo dominio (D2) de la proteína (FIGURAS 1A,D). Este motivo se ajusta al consenso de señal de clasificación YXXΦ reconocido por AP2M1 (Ohno, J Cell Sci 119:3719-3721, 2006; Nakatsu et al, Cell Struct Funct 28:419-429, 2003; Owen et al., Ann Rev Cell Devel Biol 20:153-191,2004).

El Núcleo une AP2M1

Las interacciones de clasificación de señales con adaptadores de clatrina y componentes endocíticas son normalmente débiles (Kd de la unión en una gama μM), transitorios (Nakatsu et al, Cell Struct Func 28:419-429, 2003; Aguilar et al, J. Biol Chem 276:13.145-13152, 2001), e involucran a las proteínas de membrana, por lo tanto difíciles de estudiar por las tecnologías estándar (Cusick et al., Hum Mol Genet 2005; Bailer Curr Opin Microbiol 12:453-459, 2009). Para determinar si el núcleo de VHC se une a AP2M1, se utilizaron plataformas proteómicas que superen estos desafíos. En ensayos in vitro de afinidad de microfluidos se basaron en la captura mecánica de las interacciones moleculares (MITOMI), lo que elimina el problema fuera de la tasa frente a plataformas actuales, y por lo tanto permite el estudio de las interacciones débiles y transitorios, con el consumo de proteínas de nanolitros (Maerkl et al., Science 315:233-237, 2007; Einav y otros, Nat. Biotech

26:1019-1027, 2008; Gerber et al., Nat. Meth 6:71-74, 2009). Se utilizó un formato de microfluidos que permite un análisis de alta fidelidad de las interacciones proteína- proteína (P- PIs) (Gerber et al., Nat. Meth 6:71-74, 2009). En la expresión de proteínas in vitro en presencia de membranas microsomales y los experimentos de unión con Mitomi se realizaron esencialmente tal como se describe (Maerkl et al., Science 315:233-237, 2007; Einav et. al, Nat Biotech 26:1019-1027, 2008; Gerber et al., Nat. Meth 6:71-74, 2009) (FIGURA 9). Estos ensayos detectan la unión de AP2M1 al núcleo. El grado de unión se correlacionó con el aumento de la concentración del núcleo (Figura 1F). Unión de fondo de AP2M1 a una proteína de control VHC, NS3, fue 4-20 veces menor y no aumentó significativamente con el aumento de la concentración de proteína.

Para determinar si la interacción núcleo AP2M1 ocurre en las células, fueron utilizados los ensayos de complementación de proteínas de fragmento (PCAs) basados en la reconstitución reversible de un *Gaussia princeps* indicador de luciferasa, (FIGURA 2A). El formato actual fue optimizado para mejorar la señal, proporcionando de este modo un medio altamente sensible para medir P-inhibidores de la proteasa (Cassonnet et al., Nat. Meth 8:990-992, 2011). Se detectó señal de luciferasa significativa en células Huh-7.5 cotransfectadas con plásmidos que codifican los dos fragmentos informativos fusionados a las proteínas presas y cebo (GLuc1-AP2M1 y GLuc2-núcleo). Se detectaron los niveles de fondo de la unión en las células cotransfectadas con cualquiera de las construcciones GLuc1-AP2M1 o GLuc2-núcleo y el vector recíproco vacío, los dos vectores GLuc vacíos o GluC1 fusionados con tres proteínas no relacionadas

(SPIRE, RACL y ARPC). La afinidad aparente de AP2M1 al núcleo era mayor que al receptor de transferrina (TFR), una proteína de carga del portador que alberga una señal de YXXΦ, conocido para ser reconocido por AP2M1 (Gminard et al., Traffic 5, 181-193, 2004) (FIGURA 2B). La unión no era genotipo específico, como proteínas del núcleo derivados o bien de los niveles comparables demostrados de genotipos 2a (Lindenbach et al., Science 309:623-626, 2005.) o 1b (Lohmann et al., Science 285: 110-113, 1999) de la de unión AP2M1. Además, no hubo diferencias significativas en el núcleo que une a las dos isoformas de AP2MI (a/b) (FIGURA 2B). Los resultados comparables fueron demostrados en células Huh-7.5 (hepatoma humano derivado), que representa el modelo celular más relevante (FIGURA 2B), y las células 293T (datos no mostrados). La unión específica apareció, como concentraciones crecientes de núcleo libre o AP2M1, pero no la proteína de interacción de señal de la exportación nuclear (NESI), una proteína de control implicada en la mediación de montaje del virus de la hepatitis D (Wang et al., J. Virol 79:8113-8120, 2005), disminuyó progresivamente la unión del núcleo AP2MI (FIGURA 2C).

Para determinar si el núcleo se une a AP2M1 en el contexto de la infección de VHC auténtica, los ensayos de co-inmunoprecipitación en fracciones de membrana preparadas a partir de células Huh-7.5 infectadas con células VHC de cultivo crecido (J6/JFH) fueron realizados (Lindenbach et al., Science 309:623-626, 2005). La AP2M1 podría provocar la caída del núcleo cuando fueron añadidos los anticuerpos anti-AP2M1 pero no los controles de IgG a los lisados de membrana. La unión fue aumentada significativamente por Calyculin A [un

inhibidor de desfosforilación AP2M1, que "bloquea" AP2M1 en su conformación activa de unión YXX Φ (Ricotta et al., J. Biol. Chem. 283:5510-5517, 2008)] (FIGURA 2D). La unión en condiciones de reciprocidad fue demostrada de manera similar (Fig. 2D). La colocalización de núcleo con AP2M1 en células Huh-7.5 72 horas después de la electroporación con ARN de VHC J6/JFH también fue investigada. El análisis de la inmunofluorescencia confocal cuantitativa (IF) reveló colocalización extensa del núcleo y AP2M1 en estas células (con colocalización $67\pm 6\%$ de puntos manchados AP2M1 con núcleo) (FIGURA 2E).

Motivo YXX Φ del Núcleo en la unión AP2M1 y montaje de VHC

Se probó usando de una serie de mutaciones puntuales (FIGURA 1D), si la unión de AP2M1 está mediada por el motivo YXX Φ de núcleo. Una mutación núcleo Y136A redujo la unión AP2M1 medida por los PCAs por ~ 10 veces en comparación con el núcleo tipo salvaje (WT), mientras que una mutación V(Φ) 139A causó menos inhibición de la unión (FIGURA 3A). Para estudiar el papel de motivo de núcleo YXX Φ en la infección por VHC, estas mutaciones se introdujeron en el genoma VHC J6/JFH(p7-Rluc2A), un virus informador que contiene luciferasa de Renilla, que replica y produce altos títulos de virus en células Huh-7.5 (Murray et al, J. Virol 81:10.220-10231, 2007). Las células fueron sometidas a electroporación con ARN transcrito in vitro generado a partir de cada constructo. La replicación del ARN del VHC de estos mutantes virales fue comparable a la del virus WT, tal como se midió por ensayos conectados por gen informantes de luciferasa (FIGURA 3B), y qRT - PCR (Fig. 11 y 12). Por el contrario, un mutante

de la polimerasa defectuoso, J6/JFH(p7-Rluc2A)-GNN, no se replicó. Los ensayos de luciferasa en células ingenuas inoculados con sobrenadantes derivados a partir de células sometidas a electroporación con genoma viral portadoras de la mutación del núcleo Y136A medido a niveles indetectables de infectividad extracelular. La mutación V139A disminuye la infectividad por registros ~ 1.5 en comparación con el virus WT (Figura 3C). La infectividad intracelular, medida en células ingenuas infectadas con sobrenadantes clarificados derivadas de células sometidas a electroporación lisadas, reflejaron la infectividad extracelular disminuida (FIGURA 3D), lo que sugiere que el motivo YXX Φ interceda en el montaje de viriones y lo libere. Esencialmente ningún virus infeccioso fue producido, ya sea intra o extracelularmente por montaje (Δ E1-E2) o controles reflectivos de replicación (GNN). Los títulos de infectividad del virus WT medido mediante ensayos de dilución limitante eran comparables a los informados previamente con este sistema informativo (Kopp et al., J. Virol 84:1666-1673, 2010). De acuerdo con los ensayos de luciferasa descritos anteriormente, mientras que la mutación de núcleo V139A disminuyó los títulos de infectividad adicionales extras e intracelulares por un registro de $\sim 1-1.5$ en comparación con el virus de WT, un nivel no detectable de títulos de infectividad fue medido con el virus alberga la mutación de núcleo Y136A o eliminación E1-E2 (FIGURA 3E). El efecto de las mutaciones de núcleo sobre la infectividad correlacionó con su efecto sobre la unión AP2M1. Para excluir la posibilidad de que las mutaciones del núcleo afectaron la infectividad mediante la provocación de desmontaje de partículas o la producción de partículas defectuosas de proteínas de núcleo y que contienen ARN, se determinó la producción de partículas no infecciosas. Los niveles

detectables de ARN del VHC y la liberación de proteínas de núcleo se midieron en sobrenadantes de células que albergan genomas de replicación mediante ensayos de qRT-PCR y ELISA, respectivamente, como se describió (Murray *et al*, J. Virol 81: 10.220-10.231, 2007; Kopp J Virol 84: 1666-1673, 2010) (FIG. 3F, 3G). Sin embargo, los niveles liberados por los mutantes de núcleo Y136A y V139A no fueron significativamente mayores que los liberados por el mutante de montaje defectuoso $\Delta E1-E2$, lo que sugiere que no se produjeron partículas no infecciosas. La expresión del núcleo no se vio afectada por las mutaciones, como el análisis Western (FIG. 3H) y la microscopía por fluorescencia (no se muestra los datos) demostraron la expresión de proteínas en niveles WT. La reversión del fenotipo de infectividad se detectó mediante ensayos de luciferasa en células Huh-7.5 infectadas con el VHC que alberga las mutaciones del núcleo Y136A y V139A tras dos semanas de pases. Esta reversión coincidió con la aparición de los revertantes del sitio primario mediante el análisis de secuenciación. Estos resultados proporcionan evidencia adicional para el requisito de mantener un motivo funcional YXX Φ para apoyar la replicación del VHC. Juntos, estos datos sugieren que se requiere el motivo de unión AP2M1 dentro del núcleo para el montaje viral *in vitro*.

El motivo del núcleo YXX Φ es funcionalmente intercambiable con otras señales de clasificación YXX Φ

Para determinar si el motivo del núcleo YXX Φ es funcionalmente intercambiable con las señales homólogas, una mutación V139L, así "intercambiando" la secuencia del genotipo del núcleo 2a con las de genotipo 1b

fue introducido. Del mismo modo, las secuencias de YTPL y YRRL, conocidos por mediar en la unión de HLA-DM (Ohno *et al.*, *J Biol Chem.* 273:25915-25921, 1998) y el receptor de trombopoyetina (Hitchcock *et al.*, *Blood* 112:2222-2231, 2008) a AP2M1, respectivamente, fueron usados para sustituir la secuencia del núcleo YXX Φ (FIG. 1D). La unión de estas secuencias de núcleo que albergan a AP2M1 era ya sea comparable o mayor que la del núcleo WT, según lo determinado por PCA's (FIG. 3A). Estas mutaciones no tuvieron efecto sobre la replicación del ARN del VHC (FIG. 3B). En correlación con su fenotipo bioquímico, la infectividad intracelular y extracelular de los mutantes de núcleo V139L y YTPL fueron comparables a la del virus WT (FIG. 3C, 3D). Esta capacidad de intercambio funcional apoya que los motivos del núcleo YXX Φ ejerzan su función a través de la interacción con las proteínas de la célula huésped. A pesar de su unión eficiente a AP2M1 (FIG. 3A) y la estabilidad mediante el análisis Western (FIG. 3H), el mutante YRRL no produjo niveles detectables de virus infeccioso (FIG. 3C, 3D). Curiosamente, este mutante libera el ARN del VHC y la proteína de núcleo en los sobrenadantes de las células electroporadas a niveles comparables a la de núcleo WT, que probablemente refleja la producción de partículas no infecciosas (FIG. 3F, 3G). El mutante YRRL puede, por lo tanto, afectar otra función de núcleo en la producción de virus infeccioso que es independiente de su unión a AP2M1.

AP2M1 en montaje VHC

Se determinó la relevancia funcional de AP2M1 al ciclo de vida del VHC. Se establecieron clones Huh-7.5 estables que albergan ARN de horquilla corta

(shARN) construcciones lentivirales dirigidas a regiones distintas en el gen AP2M1 o una secuencia no-objetivo (NT). Se logró la supresión efectiva de los niveles de AP2M1 (FIG. 4A, 4B), sin efectos citostáticos o citotóxicos aparentes. Se estudió el efecto de la depleción AP2M1 en la producción de virus infecciosos en estos clones después de la electroporación con J6/JFH (p7-Rluc2A) ARN. El reducir AP2M1 no tuvo ningún efecto sobre la replicación del ARN del VHC como se midió en estos clones estables por ensayos de luciferasa (FIG. 4C) y qRT-PCR 72 horas después de la electroporación (datos no mostrados). Los sobrenadantes recogidos a las 72 horas post-electroporación se utilizaron para inocular las células ingenuas Huh-7.5, seguido de ensayos de luciferasa a las 72 horas post-inoculación. Como se muestra en la FIG. 4D, el agotamiento AP2M1 reduce la infectividad extracelular por >2 logS en comparación con el control NT. La infectividad intracelular, medido en células ingenuas infectadas con sobrenadantes clarificados derivadas de células de electroporación lisadas reflejó la infectividad extracelular disminuida (FIG. 4E) y se correlacionó con el grado de agotamiento AP2M1. Las mediciones de títulos de infectividad intra o extracelular limitando los ensayos de dilución demostrando resultados consistentes (FIG. 4F). El agotamiento AP2M1 no aumentó la producción de partículas no infecciosas, como se sugirió por los niveles de ARN del VHC y la liberación de la proteína de núcleo medido en los sobrenadantes de las células mediante los ensayos qRT-PCR y ELISA, respectivamente (FIG. 4G, 4H). Se demostraron efectos similares sobre la producción de virus infeccioso en células Huh-7.5 agotados transitoriamente por AP2M1 mediante siARNs y, ya sea una electroporación con el ARN J6/JFH (p7-Rluc2A) o infectadas con el virus de cultivo crecido J6/JFH (título: 1.2×10^5

TCID₅₀/ml) (Lindenbach *et al.*, *Science* 309:623-626, 2005). Los efectos de silenciamiento endógeno AP2M1 en la producción de virus infeccioso fueron rescatados por la expresión ectópica del shARN resistentes WT AP2M1 que alberga una mutación inestable en el sitio dirigido por el shARN, excluyendo en gran medida la posibilidad de efectos fuera del objetivo que causan el fenotipo observado (FIG. 41). El ARNi estable y transitorio se acerca así, y ambos sugieren que AP2M1 es importante para el montaje eficiente VHC.

La interrupción del vinculante del núcleo AP2M1 que suprime el reclutamiento de AP2M1 a LD, altera la localización sub-celular del núcleo, y la co-localización del núcleo con E2

Para probar la hipótesis que el defecto en el montaje de HCV que resulta de mutaciones principales YXXΦ o AP2M1 silenciando correlatos con alteraciones en la localización sub-celular de AP2M1 y/o núcleo, se realizó un análisis de inmunofluorescencia confocal cuantitativa (SI). Las células 10-15 elegidas al azar fueron analizadas para cada categoría para el grado de localización del núcleo o AP2M1 a los distintos compartimentos intracelulares utilizando el software ImageJ (JACoP) y el coeficientes de colocación de Manders (MCC). Estos últimos fueron elegidos, ya que miden estrictamente la co-ocurrencia independiente de la proporcionalidad de la señal (Dunn *et al.*, *Am J Physiol Physiol-Cell* 300: C723-C742, 2011). El endógeno AP2M1 co-localizado mínimamente con el marcador LD, Bodipy, en células ingenuas Huh-7.5, con el 8,2% de la tinción positiva LD para AP2M1 LD (FIG. 5 A, 5E). En contraste, la infección con el virus J6/JFH parecía aumentar significativamente la localización de AP2M1 a LD, con 40± 8%

de LD siendo positivo el AP2M1 (FIG. 5B, 5E) (valor de $p=0,0006$). Del mismo modo, y como se ha descrito anteriormente (Kopp *et al.*, *J. Virol* 84:1666-1673, 2010; Boulant *et al*, *Revista General de Virología* 88:2204-2213, 2007; Collier *et al.*, *PLoS patógenos* 8: e1002466-e1002466, 2012), el núcleo fue parcialmente localizado a LD ($37\pm14\%$ de núcleo positivo LD) (FIG. 5C, 5E). Además, la colocalización parcial del núcleo con AP2M1 se produjo en parte en LD (FIG. 5D, 5F).

Para probar si el núcleo está implicado en medir el aumento de la localización de AP2M1 a LD medido en las células infectadas de HCV, el AP2M1-mCherry fue sobreexpresado, ya sea solo o en combinación con el núcleo WT o núcleo mutante Y136A mediante la transfección de células Huh-7.5. El LD fue etiquetado con HCS LipidTOX (Invitrogen). De manera similar a las células ingenuas, el AP2M1 fue mínimamente localizado a LD en células Huh-7.5 que sobreexpresan solo AP2M1 ($8\pm2\%$ de LD positivo para AP2M1) (FIG. 5G, 5J). En contraste, como en las células infectadas, cuando se coexpresada con el núcleo WT, el AP2M1 pareció acumular significativamente en LD, con $51,8\pm20\%$ de LD siendo AP2M1 positivo (valor de $p = 4.8\times10^{-5}$) (FIG. 5H, 5J). No se demostró ningún aumento en la colocalización, sin embargo, cuando AP2M1 fue coexpresada con el núcleo que alberga la mutación Y136A (con 10% AP2M1 LD positivo) (valor de $p= 0.001$) (FIG. 5I, 5J), lo que sugiere que el motivo de ese núcleo YXXΦ pueden mediar el reclutamiento de AP2M1 a LD.

Se puso a prueba el efecto de la interrupción de la interacción de núcleo-AP2M1 en el núcleo de localización para LD, ER y TGN y su co-localización con la proteína de envoltura E2 en las células electroporadas con J6/JFH ARN del VHC. Como se indica anteriormente, el núcleo se localizó en todos estos compartimentos intracelulares (Kopp *et al.*, *J. Virol* 84, 1666-1673, 2010; Boulant *et al.*, *Revista General de Virología* 88, 2204-2213, 2007) (con un porcentaje de co-localización que va de 30 a 45%). Curiosamente, la localización de núcleo alberga la mutación Y136A a LD fue significativamente mayor que la del núcleo WT ($78 \pm 13\%$ vs. $32 \pm 16\%$, respectivamente, valor de $p = 2.7 \times 10^{-6}$) (FIG. 5K). Del mismo modo, el porcentaje de co-localización del núcleo con el marcador LD se incrementó dramáticamente de $25 \pm 10\%$ en las células NT a $87 \pm 6.6\%$ siguiendo el silenciamiento de AP2M1 (valor de $p = 1.55 \times 10^{-8}$) (Fig. 5L). Aunque ni el núcleo de mutación Y136A ni el agotamiento AP2M1 tuvieron un efecto aparente sobre la co-localización del núcleo con el marcador ER, calreticulina (FIG. 14), ambos fueron asociados con una disminución significativa en la co-localización del núcleo con el marcador TGN, TGN46 (FIG. 5M, 5N) y la proteína de envoltura E2 (FIG. 5O, 5P).

En conjunto, estos resultados sugieren que la interacción del núcleo con AP2M1 facilita el reclutamiento de AP2M1 a LD y que el defecto observado en el montaje VHC debido a la interrupción de la interacción del núcleo-AP2M1 que se asocia con la acumulación del núcleo en LD, disminuyendo la co-localización del núcleo con E2, y el tráfico de núcleo deteriorado a TGN.

AAK1 y GAK regulan el núcleo AP2M1 vinculante y están involucrados en el montaje del VHC

La fosforilación de T156 dentro de AP2M1 mediante las quinasas serina/treonina AAK1 y GAK (Ricotta *et al.*, *Revista de Biología Celular* 156, 791-795, 2002; Korolchuk *et al.*, *Traffic* 3, 428-439, 2002; Zhang *et al.*, *Traffic* 6, 1103-1113, 2005) estimula la unión de AP2M1 a las señales de tirosina de proteínas de carga y es transitoria debido a la desfosforilación por PP2A (Ricotta *et al.*, *Revista de Biología Celular* 283, 5.510-5.517, 2008) (FIG. 6A). De hecho, la caliculina A (un inhibidor de PP2A) aumentó la unión del núcleo a AP2M1 (Fig. 2D) y una mutación T156A AP2M1 la deterioró (FIG. 6B). Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de AP2M1 que alberga la mutación T156A sobre la producción infecciosa de HCV, las células Huh-7.5 fueron transfectadas con plásmidos que codifican ya sea el WT o el mutante T156A AP2M1. Además, 48 horas después de la transfección, las células fueron electroporadas con J6/JFH (p7-Rluc2A) ARN de VHC y se sometieron a ensayos de replicación de ARN del VHC y de infectividad, como se describió anteriormente. La sobreexpresión del mutante T156A AP2M1 no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular y fue prescindible para la replicación del ARN del VHC, reduciendo aun significativamente la infectividad extra e intracelular en comparación con el WT AP2M1 (FIG. 6C-E), consistente con un efecto negativo dominante en el montaje de VHC.

Para estudiar la hipótesis de que AAK1 y GAK están involucrados en la regulación de la interacción de AP2M1 con núcleo, los experimentos de unión se realizaron en las células agotadas Huh-7.5 para AAK1 o GAK mediante siARNs

(FIG. 6F, 6G). El agotamiento de, ya sea, AAK1 o GAK disminuyó significativamente la unión del núcleo-AP2MI en comparación con NT, según se midió por PCA (FIG. 6H), con ningún efecto citotóxico aparente (datos no mostrados). Las células agotadas AAK1 y GAK fueron luego electroporadas con J6/JFH (P7-Rluc2A) de ARN del VHC. Ya que el agotamiento de, ya sea, AAK1 o GAK no tuvieron un efecto citotóxico y fue prescindible para la replicación del ARN del VHC, redujo significativamente la infectividad intracelular y extracelular (FIG. 6TK).

El efecto de AAK1 y GAK en el montaje VHC no fue resultado de su unión directa al núcleo (FIG. 6L). Estos resultados proporcionan evidencia para la participación de AAK1 y GAK en la regulación de la unión central AP2MI y en la mediación de montaje de VHC. Además, validan la importancia de AP2M1 para el montaje eficiente de VHC mediante un enfoque dominante que interfiere, apoyando así los datos de ARNi.

Inhibidores farmacológicos de AAK1 y GAK interrumpen el núcleo AP2MI vinculante y el montaje VHC

El análisis de los mapas de calor y ensayos de afinidad de los inhibidores de quinasa (Karaman *et al.*, *Nat. Biotech* 26, 127-132, 2008) reveló compuestos, tales como el sunitinib y PKC-412, que se unen AAK1, y erlotinib GAK, que se une con alta afinidad (rango nM) (Karaman *et al.*, *Nat. Biotech* 26, 127-132, 2008) (FIG. 7A, 7B). Estos compuestos inhibieron la unión de una manera dependiente de la dosis de núcleo-AP2M1, según lo determinado por los PCA (FIG. 7C), con

concentraciones inhibitorias medio máximos (IC₅₀) de ~ 0,04-0.2µM. Cuando se usa para tratar células electroporadas Huh-7.5 con el genoma VHC J6/JFH (P7-Rluc2A), estos compuestos tuvieron un efecto dependiente de dosis dramático en extra-(FUG. 7D) e infectividad intracelular (FIG. 7E) a las 72 horas (con concentración efectiva media máxima (CE₅₀) de 0,15-1.8µM) (FIG. 7B). No hubo ningún efecto sobre la replicación del ARN del VHC y sin toxicidad celular aparente (FIG. 7F, 7G). De hecho, el efecto inhibitor sobre la unión y la infectividad de núcleo-AP2MI se asoció con reducciones en los niveles de fosfo-AP2MI en las células relevantes mediante el análisis Western (FIG. 7H,). Por último, estos compuestos inhibieron significativamente la infección viral en las células Huh-7.5 infectadas con el VHC crecido en cultivo tisular (título: 6.3x10⁵ TCID₅₀/ml) (FIG. 7I, 7B,). Estos resultados proporcionan una validación farmacológica para la participación de AAKI y GAK en la regulación de la interacción de núcleo AP2MI y para el rol de AP2MI en el montaje VHC. Además, ellos proporcionan compuestos candidatos dirigidos al montaje.

Ejemplo 2

Agotamiento de AAKI y GAK o la inhibición farmacológica que anula la replicación de VIH-1

Existe un importante cuerpo de evidencia para apoyar que las interacciones de AP1M1 y AP2M1 con HIV Gag y Env (gp41) median varias etapas críticas a lo largo de la ruta de montaje/ liberación (Batonick *et al*, *Virology* 342:.. 190-200, 2005; Camus *et al.*, *Molec Biol Cell*. 18:3193-3203, 2007; Berlioz-Torrent *et al.*, *J Virol* 73: 1350-1361, 1999; Byland *et al.*, *Molec Biol Cell* 18:414-425, 2007; Wyss

et al., *J. Virol* **75**:2982-2992, 2001; Ohno et al., *Virology* 238:305-315, 1997; Boge et al., *J. Biol. Chem.* 273: 15773-15778, 1998; Egan et al., *J. Virol* 70:6547-6556, 1996; Rowell et al., *J Immunol* **155**:473-488, 1995; Lodge et al., *EMBO J.* 16:695-705, 1997; Deschambeault et al., *J Virol* 73:5010-5017, 1999). Lo más importante, un motivo de tirosina dentro de Env media la propagación de célula a célula (Gminard et al., *Traffic* 5, 181-193, 2004; Lindenbach et al., *Science* 309, 623-626, 2005), un mecanismo pensado para tener en cuenta continuamente la replicación del VIH a pesar de ART (Sigal et a., *Nature* 477, 95-98, 2011), posiblemente a través de AP1M1 que clasifica las membranas basolaterales. Sin embargo, el rol de AAKI y GAK en la infección por VIH no se ha estudiado, y estos mecanismos no han sido objeto farmacológicamente.

Para probar la hipótesis de que AAKI y GAK son importantes para la infección por VIH, se utilizaron células TZM-bl derivados de HeLa, que expresan CD4, CCR5 y CXCR4, así como β -galactosidasa y genes informadores de luciferasa de luciérnaga que responden a la transcripción del VIH (Wei et al, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46: 1896-1905, 2002). Las células fueron transfectadas con siARNs dirigidos a AAKI, GAK o una secuencia de NT seguida por la infección con el clon infeccioso VIH-1 NL4-3 (Adachi et al., *J. Virol* 59:284-291, 1986), tal como se describió (Zhou et al, *Cell Host & Microbe* 4:495-504, 2008). La actividad luciferasa se midió a las 96 horas después de la infección. El agotamiento AAKI y GAK inhibieron significativamente la replicación del VIH (Fig. 10). Para probar el efecto de los inhibidores farmacológicos de AAKI y GAK contra VIH, VIH-1 infectado de células TZM-b1 derivados de HeLa fueron tratados

diariamente con diluciones en serie de sunitinib, erlotinib o PKC-412 durante 4 días seguido de ensayos de luciferasa. Se observó un efecto antiviral de dosis de respuesta significativa con ningún efecto sobre la viabilidad (Fig. 10). El EC_{50} de erlotinib fue de $1,4 \pm 0,3$ (valor $P = 0.0058$), sunitinib - $0.8 \pm 0,4$ (valor $P = 0,1$) y PKC-412 a 8.5 ± 4 (valor $P = 0.1$). Dado que estos estudios se llevaron a cabo 96 horas después de la infección, se evaluaron todas las etapas de la infección de entrada para liberar y propagar (Zhou *et al*, *Cell Host & Microbe* 4:495-504, 2008), y por lo tanto, sugieren que AAKI y GAK son importantes para toda la replicación del VIH.

Métodos

Plásmidos. Los ORFs que codifican AP2M1, GAK, AAKI, TFR, SPIRE, RAC1, ARPC y NESI fueron seleccionados de la biblioteca Human ORFeome de los clones de cADN (Rual *et al*, *Genome research* 14, 2128-2135, 2004) (Open biosystems) y recombinados en, ya sea, pcADN-Dest40 (para C-terminal V5-su etiquetado), pGLuc (para fragmento luciferasa *Gaussia Princeps* (Glue) etiquetado) (Cassonnet *et al.*, *Nat Methods* 8, 990-992, 2011), y/o pCherry (por etiquetado de proteína de fluorescente mCherry) los vectores que utilizan la tecnología de puerta de enlace (Invitrogen). Los ORFs que codifican núcleo de longitud completa de T7-etiquetados y NS3 fueron amplificados de vectores descritos (Blight *et al.*, *Science* 290, 1972-1974, 2000) y se ligaron en pcADN3.1 (Invitrogen). pFL-J6/JFH (p7-Rluc2A) (Murray *et al.*, *J Virol* 81, 10220-10231, 2007) fue un regalo del doctor CM Arroz (Tscherne *et al.*, *J Virol* 80, 1734-1741, 2006). Las mutaciones del núcleo YXXΦ y mutaciones AP2M1 fueron introducidos

en estos plásmidos mediante la mutagénesis dirigida al sitio (usando el kit QuikChange (Stratagene)).

Anticuerpos y compuestos. Ver las tablas 1 y 2.

ARNi y rescate de silenciamiento génico. El 40-100 nM individual o siARNs agrupados (FIG. 8) fueron transfectadas en las células usando siIMPORTER (Upstate, Millipore) 48 horas antes de la electroporación de ARN del VHC. Cinco partículas de transducción lentiviral MISSION individuales (Sigma) que albergan ARN de horquilla corta (shARNs) dirigidas a diversos sitios en el ARN AP2M1 y un control de shARN fue utilizado para transducir las células Huh-7.5 de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los reactivos ARNi utilizados en este estudio se resumen en la Tabla 3. El rescate AP2M1 se realizó mediante la transducción de células Huh-7.5 empobrecidas de forma estable para AP2M1 con el lentivirus que expresa el shARN resistente AP2M1 48 horas antes de la electroporación con el genoma de HCV.

Ensayos de afinidad microfluídica. La fabricación y el diseño del dispositivo se realizaron esencialmente como se describe (Maerkl *et al.*, *Science* 315, 233-237, 2007). Las proteínas humanas V5 con sus etiquetados y las proteínas virales-T7 etiquetado se expresaron fuera del chip por mezcla de mamífero *in vitro* de transcripción/traducción (TNT) (Promega) (en presencia de las membranas microsomales). El dispositivo fue sometido a los patrones de superficie que resulta en un área circular recubierto con biotina contra sus anticuerpos dentro de cada celda unitaria (Einav *et al.*, *Nature Biotechnology* 26,

1019-1027, 2008; Gerber *et al.*, *Nature Methods* 6, 71 - 74, 2009). Los experimentos de unión proteína-proteína se realizaron como se ha descrito (Gerber *et al.*, *Nature Methods* 6, 71-74, 2009). Brevemente, las proteínas de cebo humanos se cargaron en el dispositivo y unido a la superficie anticuerpos anti-his. Las proteínas virales y humanos se incubaron en el chip y se marcaron con anticuerpos anti-T7-Cy3 y anti-V5-FITC, respectivamente. Las interacciones quedaron atrapados, mecánicamente, por MITOMI (Maerkl *et al.*, *Science* 315, 233-237, 2007; Einav *et al.*, *Nature Biotechnology* 26, 1019-1027, 2008; Gerber *et al.*, *Nature Methods* 6, 71-74, 2009). Después de un breve lavado para eliminar el material no unido no interceptado, los complejos de proteína atrapada se detectaron mediante un escáner de matriz (Tecan). Se calculó el ratio de presa viral ligado a la proteína expresada cebo humano para cada punto de datos mediante la medición del ratio de señal mediana de Cy3 a la señal mediana de FITC. La concentración de proteína en los lisados fueron determinaron mediante el análisis occidental cuantitativo contra las curvas de calibración de proteínas T7-etiquetadas. Los experimentos se realizaron al menos tres veces, cada vez con > 20 repeticiones. Véase la FIG. 10 para un protocolo detallado.

Los cultivos de células. Las células Huh- 7.5 y las células 293T se mantuvieron en el medio esencial mínimo modificado de Dulbecco (Gibco) suplementado con 1% de L-glutamina (Gibco), 1% penicilina, 1% de estreptomicina (Gibco), aminoácidos no esenciales IX (Gibco), y 10 % de suero bovino fetal (Omega Scientific). Las líneas celulares se pasaron tres veces a la

semana después del tratamiento con 0,05 % de tripsina-0,02% EDTA y la siembra a una dilución de 1:04.

Ensayos de complementación de fragmentos de proteínas. Los ensayos de unión se realizaron esencialmente como se describieron (Cassonnet et al., *Nat Methods* 8, 990-992, 2011). Las combinaciones de plásmidos que codifican la presa (A) y proteínas de cebo (B), cada uno fusionado a un fragmento de la proteína luciferasa *Gaussia Princeps* (Gluc1 y Gluc2) o vectores de control se cotransfectaron en 293T o células Huh- 7.5 colocaron en placas en 96 - así placas en triplicados. A las 24 h después de la transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de gen indicador de luciferasa estándar usando el sistema de ensayos de luciferasa de Renilla (Promega) . Los resultados se expresaron ya sea como luminiscencia o la relación de luminiscencia . Este último representa la media de la señal de luminiscencia detectada en las células transfectadas con GluCl - A y B - Gluc2 dividido por el promedio de luminiscencia medida en los pocillos de control transfectadas con GluCl - A y un vector de Gluc2 vacío con las transfectadas con Gluc2 -B y un GluCl vacía vectorial. Los ensayos de competición y estudios diseñados para determinar el efecto inhibitor de los compuestos o siARNs se realizaron como anteriormente, excepto que la unión se midió en presencia de exceso de proteínas libres, los inhibidores, o siARNs , respectivamente . Los experimentos se realizaron al menos tres veces por triplicado.

Co-inmunoprecipitaciones. Las membranas fueron preparadas a partir de células $\sim 20 \times 10^6$ Huh-7.5 infectadas con VHC (J6/JFH) (Lindenbach, *et al.*, *Science* 309, 623-626, 2005), como se describió previamente (Einav *et al.*, *J Virol* 78, 11288 -11295, 2004). Brevemente, las células fueron recogidas mediante tripsinización, se lavaron una vez con PBS y se volvieron a suspender en tampón HME (HEPES 20 mM [pH 7,4], EDTA 1 mM, 2 mM MgCl₂), suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo a una concentración final de 1 mM e inhibidores de la proteasa cóctel (Sigma). Las células fueron lisadas por dos ciclos de congelación-descongelación en hielo seco-etanol y después pasaron 10 veces a través de una aguja de calibre 27.5. Se separaron los núcleos por centrifugación a 250 xg durante 10 minutos, y el sobrenadante postnuclear se sometió a ultracentrifugación a 100.000 xg durante 30 minutos para obtener la preparación de membrana. Todas las etapas se realizaron a 4°C. El total de las proteínas de membrana se diluyeron en un tampón de TDB 1 ml (2,5% de Triton X-100, 25 mM de trietanolamina-Cl [pH 8,6], 20 mM NaCl, EDTA 5 mM, 0,2% NaN₃) (Einav *et al.*, *J Virol* 78, 11288 hasta 11295, 2004) y se incubó durante 30 min a 37 ° C con 100 nM caliculina-A o DMSO. Debido a la naturaleza débil y transitoria de las interacciones, el 25 mM de ditiobis-succinimidil-propionato de etilo (DSP) reticulador (Pierce) fue añadido para permitir la unión covalente de las proteínas que interactúan ya unidos. Las muestras se incubaron en hielo durante 2 horas. Se añadió Tris 1 M para detener la actividad DSP. Los lisados se aclararon a continuación, por 10 min de centrifugación a 1000xg, seguido por 30 min de ultracentrifugación de los sobrenadantes a 100.000 xg. Los sedimentos de membrana se volvieron a suspender en (20 mM NaHEPES (pH 7,4), EDTA mM

(pH 8), 2 mM de MgCl₂, y el tampón de TDB se añadió para un volumen final de 1 ml de tampón HME 100. Las muestras se incubaron durante la noche, ya sea con anticuerpos anti-AP2M1, anticuerpos anti-núcleo o controles de IgG, y perlas magnéticas de proteína G (Millipore). Los inmunoprecipitados se analizaron por transferencia Western. Los experimentos se llevaron a cabo dos veces por duplicados.

Transcripción *in vitro* de ARN viral y la transfección. El ARN del VHC se generó y entregó en células Huh-7.5, como se describió previamente (Lindenbach *et al.*, *Science* 309, 623-626, 2005; Murray *et al.*, *J. Virol* 81, 10220-10.231, 2007). Brevemente, el ARN se sintetizó a partir de J6/JFH XbaI linealizado (p7-Rluc2A) utilizando plantilla el kit de guío T7 MEGA de acuerdo con el protocolo del fabricante (Ambion). Las mezclas de reacción se incubaron durante 3 horas a 37°C y después se sometieron al tratamiento con DNasa durante 15 minutos a 37°C. El ARN viral se purificó utilizando el kit RNeasy (Qiagen). El ARN se cuantificó por absorbancia a 260 nm, y su calidad se verificó por electroforesis en gel de agarosa. Las células subconfluentes Huh-7.5 se tripsinizaron y recogieron por centrifugación a 700 g durante 5 minutos. Luego, las células se lavaron tres veces en hielo frío ARNsa-libre de PBS (Bio Whittaker) y se volvieron a suspender a 1.5×10^7 células/ml en PBS. El 5 µg de tipo salvaje transcrito *in vitro* o mutante J6/JFH (p7-Rluc2A) ARN se mezcló con 400 µl de células lavadas Huh-7.5 en una cubeta de 2 mm de diferencia (BTX) e inmediatamente pulsada (0.82 kV, cinco pulsos 99 µs) con un electroporador BTX-830. Después de una recuperación de 15 min a 25

° C, las células se diluyeron en 30 ml de medio de crecimiento precalentado y se incubaron en placas de cultivo de tejidos 96, 24, pocillo 6 y P100.

Replicación del ARN del VHC mediante ensayos de luciferasa. La replicación del ARN del VHC se midió en 6-9 h, y 72 h post-electroporación, como se ha descrito (Murray *et al.*, *J. Virol* 81, 10.220-10.231, 2007). Las células electroporadas incubadas en placas en cuadruplicado en pocillos 96 se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con 30µl de tampón de lisis *Renilla* (Promega). Después de 15 minutos de agitación a TA, la actividad de luciferasa se cuantificó utilizando un sustrato de luciferasa de *Renilla* (Promega) y un luminómetro Tecan (Tecan) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

Ensayos de replicación de VIH. Las células TZM-bl derivados de células HeLa, que expresan CD4, CCR5 y CXCR4, así como β -galactosidasa y genes informadores de luciferasa de luciérnaga que responden a la transcripción del VIH (Wei *et al.*, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 1896-1905, 2002) fueron utilizados en estos ensayos. Las células fueron transfectadas con siARNs dirigidos AAK1, GAK o una secuencia de NT seguido de la infección con el clon infeccioso VIH-1 NL4-3 (Adachi *et al.*, *J Virol* 59, 284-291, 1986) como se describió (Zhou *et al.*, *Cell Host & Microbe* 4, 495-504, 2008). La actividad de luciferasa se midió a las 96 horas después de la infección. Para probar el efecto de los inhibidores farmacológicos de AAK1 y GAK contra el VIH, el VIH-1 las células infectadas TZM-bl-derivados de HeLa fueron tratados diariamente con diluciones en serie de sunitinib, erlotinib o PKC-412 durante 4 días, seguido de ensayos de luciferasa.

Infectividad extracelular. Los sobrenadantes de cultivo de células Huh-7.5 electroporadas con J6/JFH (p7-RLuc2A) ARN y sembradas en platos PI 00 se cosecharon a las 72 horas post-electroporación, aclarados (con un filtro de tamaño 0.22- μ m-pore) y se utilizaron para infectar células ingenuas Huh- 7,5 durante 72 horas por triplicado antes de la lisis de en tampón de lisis *Renilla* (Promega). La actividad de luciferasa en 20 μ l de lisados de células se cuantificó tal como se describe más arriba. Para determinar el efecto de erlotinib, sunitinib, y PKC-412 sobre la producción de virus infeccioso, las células sometidas a electroporación se cultivaron en presencia de los inhibidores con cambios de medio al día durante 72 horas antes de la recogida de los sobrenadantes o lisados celulares. Los resultados representan valores RLU log 10 por 10cm de tejido placa de cultivo. Los experimentos se repitieron tres veces, cada vez con cuadruplicado.

Ensayos de infectividad intracelular. Como se ha descrito por Murray *et al.* (*J Virol* 81, 10220-10231, 2007), 72 horas post-electroporación con J6/JFH las células de ARN (P7-RLuc2A) se tripsinizaron, se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en medio 500 μ l, se lisaron por ciclos de congelación-descongelación, y se sedimentaron dos veces en 3650 xg. Los sobrenadantes clarificados diluidos en medio completo se utilizaron para inocular células ingenuas Huh-7.5 por triplicado, seguidos por ensayos de lisis y de luciferasa a 72 horas. Los resultados representan valores RLU log 10 por 10cm de tejido de placa de cultivo. Los experimentos se repitieron tres veces, cada vez con cuadruplicado.

Virus de titulación. Los títulos extracelulares e intracelulares se determinaron mediante la limitación de ensayos de dilución sobre la base de la tinción inmunohistoquímica para el núcleo. Se calculó el 50% de dosis infecciosa de cultivo de tejidos (DICT50), tal como se describe (Lindenbach *et al.*, *Science* 309, 623-626, 2005). Los resultados se expresaron como DICT50/ml. Los títulos mínimos medidos con el mutante $\Delta E1-E2$ fueron utilizados para la sustracción del fondo.

Núcleo de ELISA. La concentración de proteína del núcleo liberado se midió en sobrenadantes de cultivo clarificados de células cosechadas a las 72 horas post-electroporación por ELISA (Cell Biolabs) en contra de curvas estándar de antígeno de núcleo recombinante, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayos de viabilidad. Después de 24, 48, y 72 horas de tratamiento con los compuestos inhibidores o silenciadores con siARNs, las células se incubaron durante 2-4 horas a 37 ° C en presencia de 10% de reactivo Azul alamar (TREK Diagnostic Systems), como se describe (Einav *et al.*, *Nature Biotechnology* 26, 1019-1027, 2008). Las placas fueron escaneadas y la fluorescencia se detectó mediante el uso de FlexStation II 384 (Molecular Devices, Inc.).

Estudios de infección. Las células sembradas 6×10^3 Huh-7.5 en placas de 96 pocillos fueron infectadas por triplicado con células de cultivo crecido-VHC J6/JFH (título: 1.2×10^5 TCID₅₀/ml). La infectividad extracelular e intracelular se

midieron mediante ensayos de formación de focos (Lindenbach *et al.*, *Science* 309, 623-626, 2005) en células ingenuas Huh-7.5 infectadas con sobrenadantes de lisados celulares clarificados o derivados de las células infectadas a las 72 horas después de la infección.

Para determinar el efecto antiviral de erlotinib, sunitinib, y PKC-412, las células 6x10 Huh-7.5 sembradas en placas de 96 pocillos fueron infectadas por triplicado con células de cultivo de cosecha propia del VHC (J6/JFH (p7-Rluc2A)) (título: 6.3×10^5 TCID₅₀/ml) con MOI (*multiplicidad de infección*) de 0,1. Así, seis horas después de la infección y diariamente, a partir de entonces, las células se lavaron y el medio se reemplazó con un medio que contiene diluciones en serie de los compuestos inhibidores. En 72 horas, las muestras se sometieron a ensayos de viabilidad, seguido de ensayos de luciferasa estándar (Promega).

Análisis de revertantes. Se propagaron las células Huh-7.5 electroporadas con J6/JFH (p7-Rluc2A) que alberga las mutaciones Y136A o V139A. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron cada pocos días y se utilizaron para inocular las células ingenuas Huh-7.5 para determinar la infectividad extracelular por ensayos de luciferasa 72 horas después de la inoculación. El ARN celular total se extrajo a partir de clones que demuestran la reversión de la infectividad del fenotipo (en el día 8 post-electroporación para los clones Y136A y día 14 para los clones mutantes V139A) utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). La reacción de la transcripción inversa y la amplificación por PCR se realizaron utilizando Superíndice One-Step PCR transcriptasa inversa (RT-PCR) kit (Invitrogen). Se

amplificó un segmento ~1-kb que alberga la secuencia de codificación de núcleo. Los productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa mediante el kit de purificación de ADN 15 ultra limpio (MoBio) y se sometieron a una secuenciación automática en un secuenciador de ADN ABI Prism 377 (Sequetech). La presencia de reversión de sitio primario fue confirmada por dos secuencias independientes utilizando oligos hacia adelante y atrás.

Extracción de ARN y qRT-PCR. El ARN total fue aislado de células o sobrenadantes de cultivo de células de 1 ml utilizando Trizol (Invitrogen) o un kit QiaAmp UltraSens (Qiagen), respectivamente. Las mezclas de qRT-PCR fueron ensamblados por triplicado utilizando 0.5µg o 4µl ARN y alta capacidad de ARN a ADNc (Applied Biosystems). Los reactivos TaqMan se enumeraron en la Tabla 4. La amplificación y el análisis se realizaron utilizando el sistema de tiempo real-PCR StepOnePlus (Applied Biosystems). El S18 se utilizó como control.

Western blot. Los lisados celulares fueron sometidos a análisis de Western usando anticuerpos primarios seguidos de anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Las bandas de intensidad fueron cuantificadas utilizando Image NIH.

Microscopía confocal de inmunofluorescencia cuantitativa. Las células Huh-7.5 fueron electroporadas con J6/JFH VHC ARN o infectadas con el virus de la cultura crecido J6/JFH, sembraron en cubreobjetos, y se incubaron durante 72 horas a 37 ° C. Las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído en PBS, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100 en PBS durante 5

min, y se bloquearon durante 1 h en PBS que contenía 1% de BSA. Fija las células fueron incubadas con anticuerpos primarios contra cualquiera de la proteína del núcleo, AP2M1, TGN46, calreticulina o E2 a temperatura ambiente durante 1 hora (ver Tabla 1). Los anticuerpos secundarios (de cabra anti-conejo Alexa Fluor 488, de cabra anti-ratón Alexa Fluor 594, de pollo cabra anti-IgG Alexa Fluor 647, y Alexa de cabra anti-humano Fluor 647) (Invitrogen) se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Tinción LD con Bodipy-488/503 (Invitrogen) se llevó a cabo como se describe (Kopp et al., J. Virol 84, 1666-1673, 2010). Los cubreobjetos se lavaron tres veces en PBS, y se montaron con antifade reactivo prolongar Oro (Invitrogen). Alternativamente, Huh-7.5 células fueron co-transfectadas con plásmidos que expresan AP2M1-YFP y / o Core-mCherry. El LD se tiñó con HCS LipidTOX (Invitrogen). Todas las diapositivas fueron analizados utilizando Zeiss LSM 510 microscopio confocal. La colocación se cuantificó en 10 a 15 células elegidas al azar de cada muestra utilizando ImageJ (JACOP) Software colocación y Manders Colocalización Coeficientes (MCC). Los valores umbral se determinaron utilizando auto_threshold (plugin, ImageJ). Sólo los píxeles con un color rojo y verde intensidad valores eran tanto por encima de sus respectivos umbrales se consideran píxeles con sondas colocados. Los MCCs se calculan entonces como las fracciones de fluorescencia total en la región de interés que se produce en estos píxeles "colocal" (con un valor más alto que representa a más colocación). Se muestran los valores del coeficiente M2 representados como porcentaje medio de colocación.

Análisis estadístico. IC50 y EC50 se midieron ajustando los datos a una curva logística de tres parámetros, como se describe (Einav et al., *Nature Biotechnology* 26, 1019-1027, 2008). Los valores P se calcularon utilizando la prueba t independiente de Student de una cola.

Ejemplo 3

Efecto de erlotinib, sunitinib, y PKC-412 en AP2M1 fosforilación.

Para determinar el efecto de los compuestos inhibidores de la fosforilación AP2M1, las células Huh-7.5 que albergan J6/JFH (P7-Rluc2A) de ARN se trataron diariamente con varias concentraciones de los compuestos o con DMSO. Ya que la fosforilación AP2M1 es transitoria (debido a la actividad de la fosfatasa PP2A (Ricotta et al., *J. Biol. Chem.* 283:5510-5517, 2008), para permitir la captura del estado AP2M1 fosforilada, los lisados se prepararon a 72 horas después de 30 minutos la incubación de las células con 100nM del inhibidor de la PP2A, caliculina A (Cal-A) o un control de DMSO. Las muestras se sometieron luego a SDS-PAGE y transferidos con anticuerpos dirigidos ya sea la forma fosforilada AP2M1 o actina. Así, los radios más bajos significativamente de fosforilada-AP2MI a la actina se midió en lisados preparados a partir de células tratadas con cualquiera de sunitinib, erlotinib o PKC-412, en comparación con el control de DMSO (Fig. 6H). El fosfo-AP2MI a radios de actina disminuyó progresivamente al aumentar las concentraciones de sunitinib y erlotinib de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados sugieren que AAK1 o GAK se potentemente inhibidas por estos compuestos en Huh-7.5 células que albergan el VHC infeccioso.

Efecto de los compuestos sobre la replicación del ARN del VHC, la infectividad intracelular, la infectividad extracelular, y la replicación del VHC.

Para determinar el efecto de erlotinib, sunitinib, y PKC-412 sobre la producción de virus infeccioso, las células Huh-7.5 se sometieron a electroporación con J6/JFH (P7-Rluc2A) del genoma del VHC (Murray et al, J. Virol 81: 10.220 a 10.231, 2007), se sembraron en placas de 6 pocillos, y se trataron diariamente con diluciones en serie de los compuestos o DMSO. En 72 horas post-electroporación, la viabilidad celular se midió por ensayos basados en Azul alamar seguido de ensayos de luciferasa para la determinación de la replicación del ARN del VHC. Los sobrenadantes de cultivo celular y lisado se recogieron a las 72 horas a partir de muestras paralelas y se utilizaron para inocular las células ingenuas Huh-7.5 para determinar la infectividad extracelular e intracelular, respectivamente. Los ensayos de luciferasa se realizaron en estas células a las 72 h después de la inoculación.

Para determinar el efecto de estos compuestos sobre la replicación del VHC, 6x10⁵ las células sembradas Huh-7.5 en placas de 96 pocillos fueron infectadas por triplicado con células de cultivo crecido-VHC (J6/JFH (P7-Rluc2A)) se tituló en 6.3x10⁵ TCID₅₀/ml con una MOI (*multiplicidad de infección*) de 0,1. A las 6 horas post- electroporación, las células se lavaron y el medio se reemplazó con diluciones en serie de los compuestos inhibidores. Las células se trataron diariamente durante 72 horas y después se sometieron a ensayos de viabilidad seguidos por ensayos de luciferasa de borrado estándar.

Alternativamente, las células 6x10 Huh-7.5 sembradas en placas de 96 pocillos fueron infectadas por triplicado con células de cultivo crecido-VHC J6/JFH (título: 1.2×10^5 TCID₅₀/ml con una MOI de 0,1, y se sometieron a ensayos de formación de centrarse, tal como se describe (Lindenbach et al., Ciencia 309:623-626, 2005). Después de 72 h de tratamiento diario con los compuestos, las células se fijaron en formaldehído al 4% y se permeabilizaron con saponina. La proteína del núcleo de HCV se detectó con anticuerpo monoclonal anti-núcleo primaria y secundaria de cabra anti-ratón de Alexa 594-anticuerpos conjugados. Los focos se contaron bajo un microscopio invertido.

Los experimentos se repitieron dos veces, cada una con 4 repeticiones. La señal se normalizó a las muestras cultivadas en presencia de la concentración correspondiente de DMSO. EC₅₀s se midieron ajustando los datos a una curva logística de tres parámetros utilizando la fórmula $Y = a + (b - a) / (1 + 10^{(X - c)})$ (a, b y c representan vinculante mínimo, máximo vinculante y logEC₅₀, respectivamente) (BioDataFit, Chang Bioscience, Inc).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en este estudio

Anticuerpos	Fuente
Biotinitilado anti-penta-his	Qiagen
FITC –conjugado anti-V5	Invitrogen
Phycoerythrin-conjugado anti-T7 tag	Abcam
Conejo Anti- A AK1	Abcam
Conejo anti-AP2MI	Santa Cruz Biotechnoloj iy
Cabra anti-AP2MI	Santa Cruz Biotechnoloj iy
Conejo anti-phospho-AP2MI (T156)	Cell signaling
Conejo anti-TGN46	Abcam
Conejo anti-calreticulin	Enzo Life Sciences
Raton anti-GAK	MBL international corporation
Raton anti-nucleo	Austral Biologicals
Human anti-E2 (CBH5)	Dr. Steven K Foung
Ratin anti-actin	Sigma
HRP-conjugado anti-mouse IgG	Cell signaling
HRP-conjugado anti-rabbit IgG	Cell signaling

Tabla 2. Compuestos en este estudio

Compuesto	Fuente
PKC-412	Sigma
Malato de Sunitinib	Sigma 15
Erlotinib	LC Laboratories
Caliculina A	Cell Signaling

Tabla 3. ARNi utilizado en este estudio

Tipo ARN	Objetivo	Catalogo #	Fuente	Secuencia
ON-TARGETplus SMARTpools siARNs MISSION shRNAs	AP2M1	LQ-008170-00-	Dharmacon	
	AP2M1	0002	Dharmacon	GUUAAGCGGUCCAACAUUU
	AP2M1	J-004233-05	Dharmacon	GCGAGAGGGUAUCAAGUAU
	AP2M1	J-004233-06	Dharmacon	AGUUUGAGCUUAUGAGGUA
	AP2M1	J-004233-07	Dharmacon	GAACCGAAGCUGAACUACA
	Sin objetivo	J-004233-08	Dharmacon	No disponible
	AAKI	D-001810-10-05	Ambion	GGUGUGCAAGAGAGAAAUCtt
	GAK	Ref #4	Dharmacon	ACGAAGGAACAGCUGAUUCA
	Sin objetivo	Ref #5	Dharmacon	No disponible
	AP2M1	D-001210-01-05	Sigma	CCGGGTGGCATCAAGTCCAAC TTTCTCGA
	AP2M1	TRCN0000060238	Sigma	GAAAGTTGGACTTGATGACCACTTTT TG
	AP2M1	("238")		CCGGCACCAGCTTCTTCCACGT TAACTCGA
		TRCN0000060239	Sigma	GTTAACGTGGAAGAAGCTGGTG TTTT TG
	AP2M1	("239")	Sigma	CCGGGCTGGATGAGATTCTAGACT TCTCGA
		TRCN0000060241		GAAGTCTAGATCTCATCCAGCT TTTT TG
	Sin objetivo	("241")	Sigma	CCGGCATTTATGAAACTCGCTACT CGAG
		TRCN0000060242		TAGCAGCGAGTTTCATAAATGT TTTT TG
		("242")		
		SHC002V		No disponible

Tabla 4. Pruebas de Taqman e iniciador utilizado en su estudio

Primer nombre	Secuencia o catálogo de ensayo #
HCV Forward	CTTCACGCAGAAAGCGTCTA
HCV Reverse	CAAGCACCCCTATCAGGCAGT
HCV Taqman MGB probe	[6FAM]-TATGAGTGTCTGTCAGCCTC-[MGB-NFQ]
AP2M1	HS01037584_ml
GAK	HS00178347_ml
AAK1	HS00208618_ml
S18	hs9999999_ml

Todos los reactivos indicados en esta tabla fueron adquiridos de Applied Biosystems, Inc (ABI).

REIVINDICACIONES:

1. Un método para tratar una co-infección VHC-VIH que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un agente que inhibe la unión de dichos virus VHC y VIH a una subunidad μ huésped de complejos de proteína adaptadora (AP) de clatrina.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha subunidad μ se selecciona del grupo que consiste de subunidades μ de complejos de clatrina AP1, AP2, AP3 y AP4.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha subunidad μ se selecciona del grupo que consiste de AP2M1, AP1M1, AP3M1 y AP4M1.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente inhibe AAK1 o GAK.
5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente se selecciona del grupo que consiste de erlotinib, sunitinib y PKC-412.
6. Un método para inhibir las infecciones mediante Lentiviridae, VIH, co-infección de VHC/VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC, comprendiendo el método administrar a un paciente que

lo necesita una cantidad efectiva de un agente que inhibe la unión de una proteína estructural de dicho virus que comprende un motivo YXXΦ o de dileucina con una subunidad μ huésped de los complejos de la proteína adaptadora (AP) de clatrina.

7. El método de la reivindicación 6, en donde dicha subunidad μ se selecciona del grupo que consiste de subunidades μ de los complejos de clatrina AP1, AP2, AP3 y AP4.
8. El método de la reivindicación 7, en donde dicha subunidad μ se selecciona del grupo que consiste de AP2M1, AP1M1, AP3M1 y AP4M1.
9. El método de la reivindicación 6, en donde dicho agente inhibe AAK1 o GAK.
10. El método de la reivindicación 6, en donde dicho agente se selecciona del grupo que consiste de erlotinib, sunitinib y PKC-412.
11. Un método para tamizar agentes antivirales, comprendiendo:
contactar un virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC o una proteína de los mismos con un agente candidato y una subunidad μ huésped de complejos de proteína adaptadora (AP) de clatrina, y

determinar un efecto de dicho agente candidato en la unión de dicho virus de unión de dicho virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC con dicha proteína.

12. Un método de tamizado para agentes antivirales, comprendiendo:
contactar un virus de unión de clatrina AP, Flaviviridae, Lentiviridae, VHC, VIH, Flaviviridae diferente de VHC, virus de unión de clatrina AP diferente de Flaviviridae, o virus de unión de clatrina AP diferente de VHC con un agente candidato y una célula que expresa una subunidad μ huésped de los complejos de proteína adaptadora (AP) de clatrina y determinar el efecto de dicho agente candidato en el montaje viral o brote.
13. El método de la reivindicación 11, en donde dicho agente candidato inhibe la actividad de AAK1 o GAK.
14. Un método para inhibir el montaje o brote de una Flaviviridae, un virus diferente de Flaviviridae, o un virus diferente de VHC en una célula huésped que comprende contactar dicha célula huésped con un agente que evita la unión de una proteína estructural viral que comprende un motivo YXX Φ o de dileucina con una subunidad μ huésped de los complejos de la proteína adaptadora (AP) de clatrina, mediante lo cual se inhibe dicho montaje o brote.

15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho agente bloquea la unión de dicha proteína estructural con dicha proteína huésped.
16. El método de la reivindicación 14, en donde dicho agente compite con dicha proteína estructural para unirse con dicha proteína huésped.
17. El método de la reivindicación 14, en donde dicho agente compite con dicha proteína huésped para unirse con dicha proteína estructural.

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR ENFERMEDADES VIRALES**RESUMEN TÉCNICO**

La invención proporciona un método para tratar infecciones virales y co-infecciones mediante el uso de agentes inhibidores que evitan que los motivos de proteína estructural viral únicos se unan con las proteínas huésped de la familia de proteínas adaptadoras de clatrina y evitar posteriormente la replicación viral.

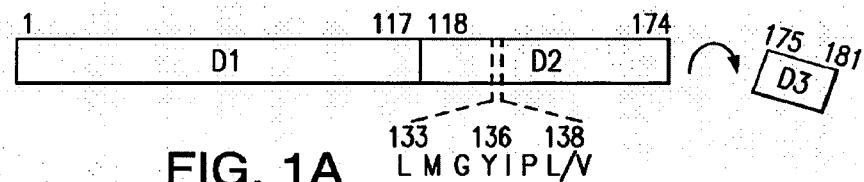


FIG. 1A

Proteína huésped	Motivo							Socio
Consenso	±/X	X ₁	X ₂	Y	X ₃	X ₄	±	
TFR	P	L	S	Y	T	R	F	AP2M1
P-selectina	L	G	T	Y	G	V	F	AP2M1
HLA-DM	H	S	S	Y	T	P	L	AP2M1

FIG. 1B

Virus/Proteína	Motivo				Socio(s) huésped(es)
Consenso	Y	X	X	±	
ELAV/Gag	Y	P	D	L	AP2M1
VIH-1/Gag	Y	P	I	V	AP2M1
VIH-1/Euv	Y	S	P	L	AP2M1,AP1M1,AP3M1

FIG. 1C

VHC/Núcleo	Motivo							
Consenso	Φ	X1	X2	Y	X3	X4	±	
VHC consenso	L	M	G	Y	I	P	L/V	
% conservación	99.3	98.9	99.4	98.9	98	99.6	86.71	
Genotipos 1,3,4,5	L	M	G	Y	I	P	L	
Genotipos 2,6,7,8	L	M	G	Y	I	P	V	
Y136A mutante	L	M	G	A	I	P	V	
Φ139A mutante	L	M	G	Y	I	P	A	
Φ139L mutante	L	M	G	Y	I	P	L	
YTPL mutante	L	M	G	Y	T	P	L	
YRRL mutante	L	M	G	Y	R	R	L	

FIG. 1D

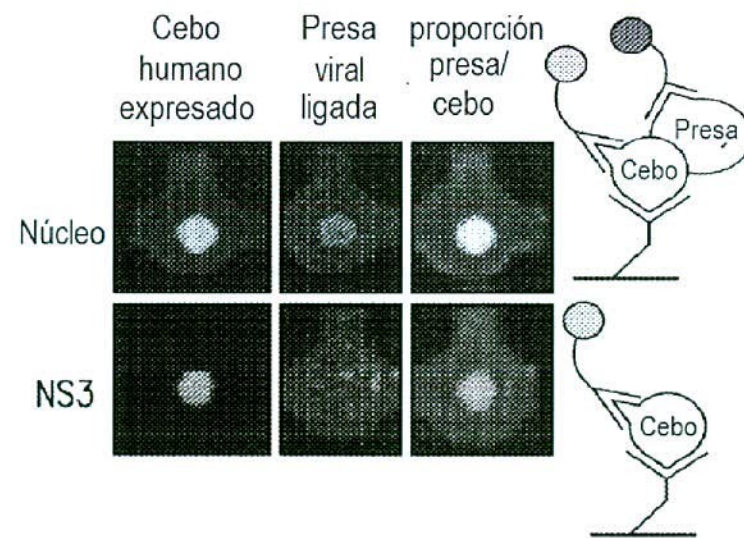


FIG. 1E

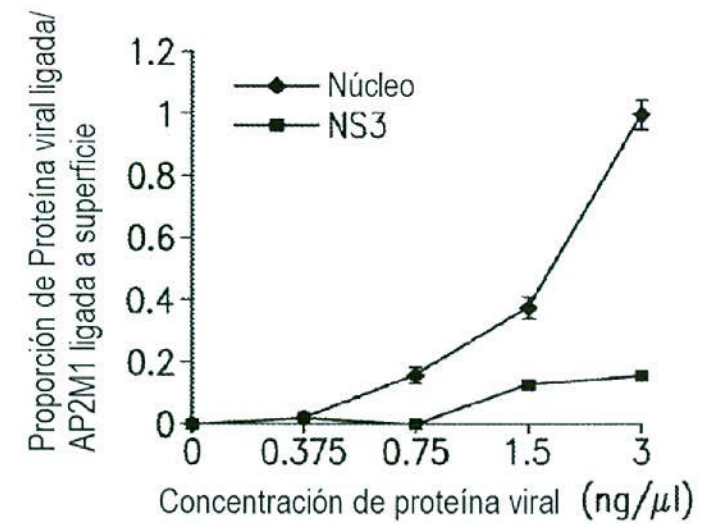


FIG. 1F

Interacción mediada
actividad de luciferasa

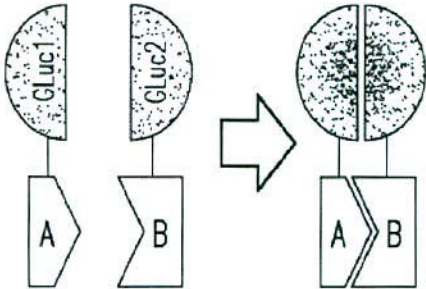


FIG. 2A

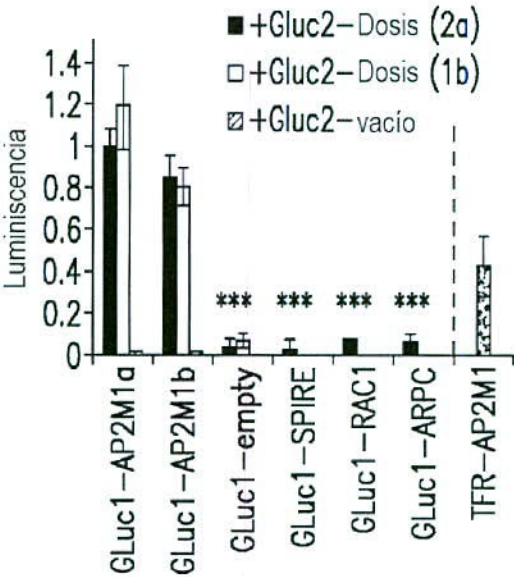


FIG. 2B

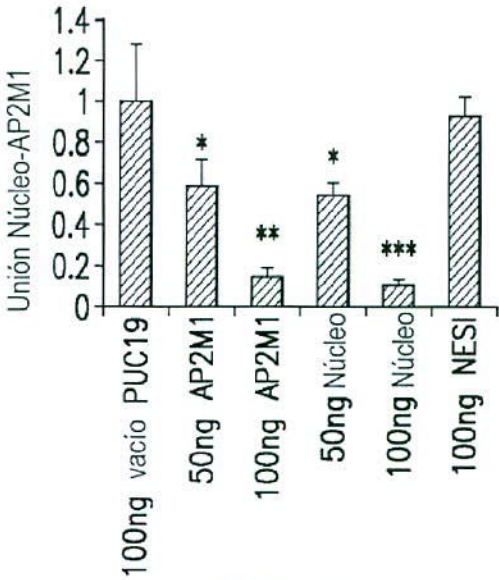


FIG. 2C

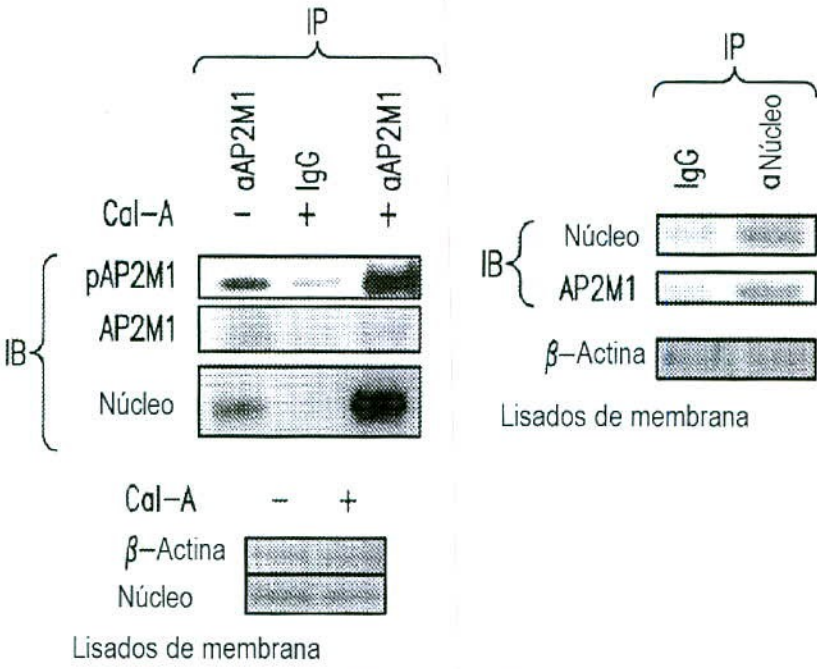


FIG. 2D

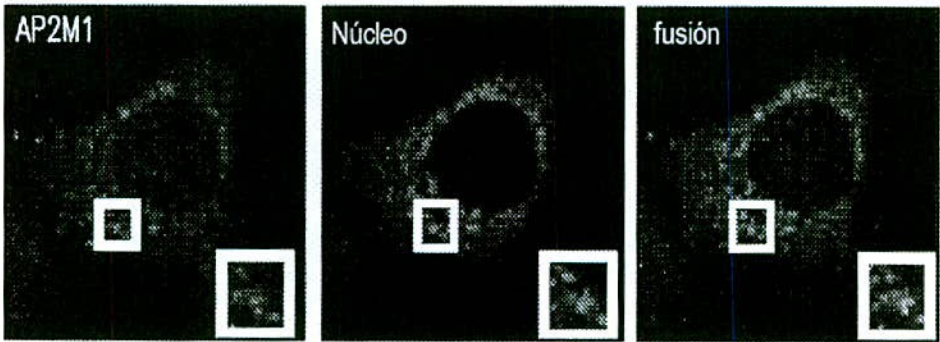


FIG. 2E

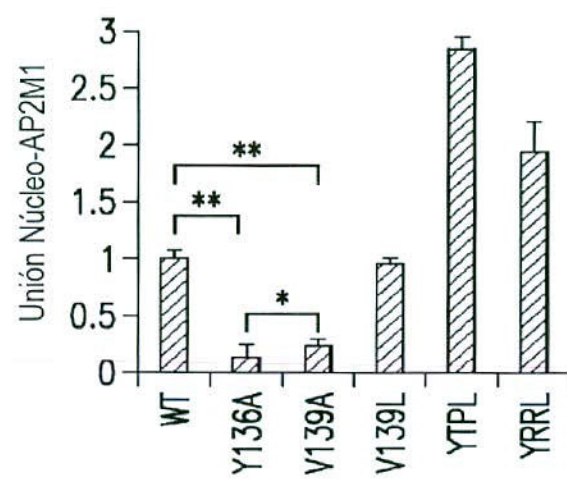


FIG. 3A

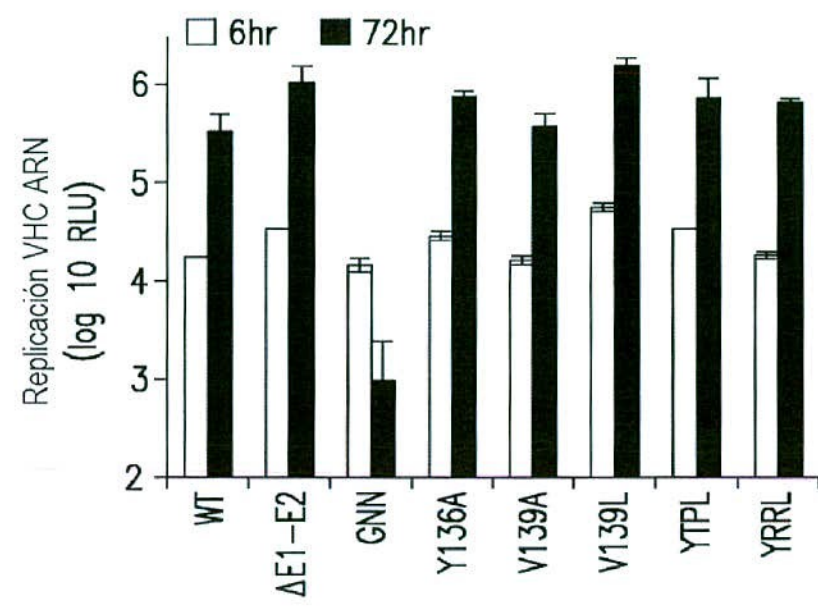


FIG. 3B

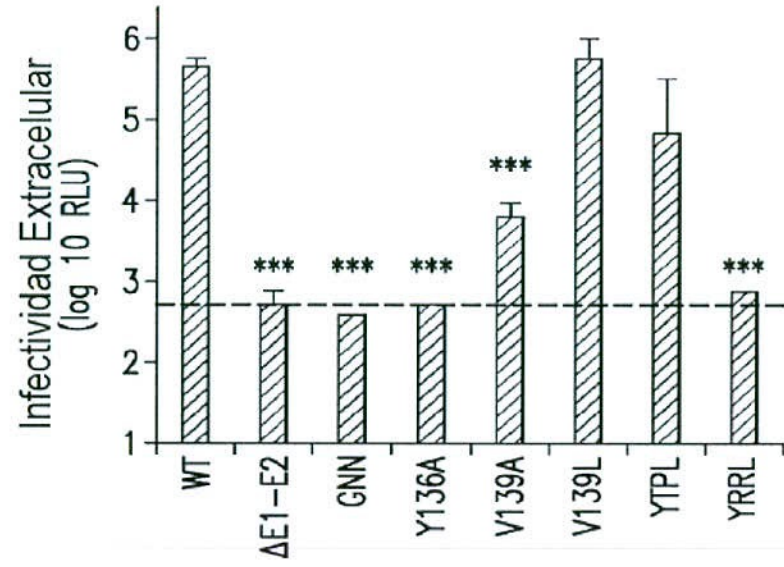


FIG. 3C

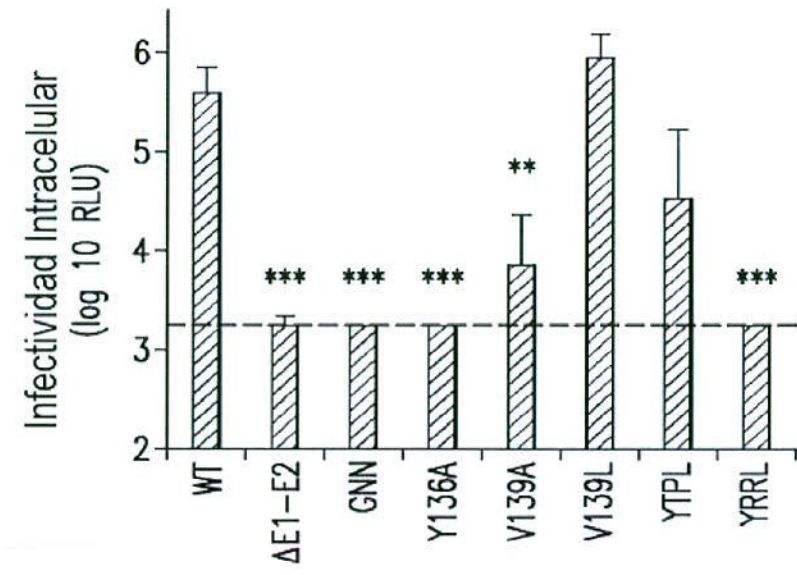


FIG. 3D

134

Mutante	TCID ₅₀ /ml	
	Extracelular	Intracelular
J6/JFH(p7-Rluc2A).....	6.32x10 ³	3.15x10 ⁴
J6/JFH(p7-Rluc2A)/ΔE1-E2.....	0	0
J6/JFH(p7-Rluc2A)/Y136A.....	0	0
J6/JFH(p7-Rluc2A)/V139A.....	1.19x10 ²	4.5x10 ³

FIG. 3E

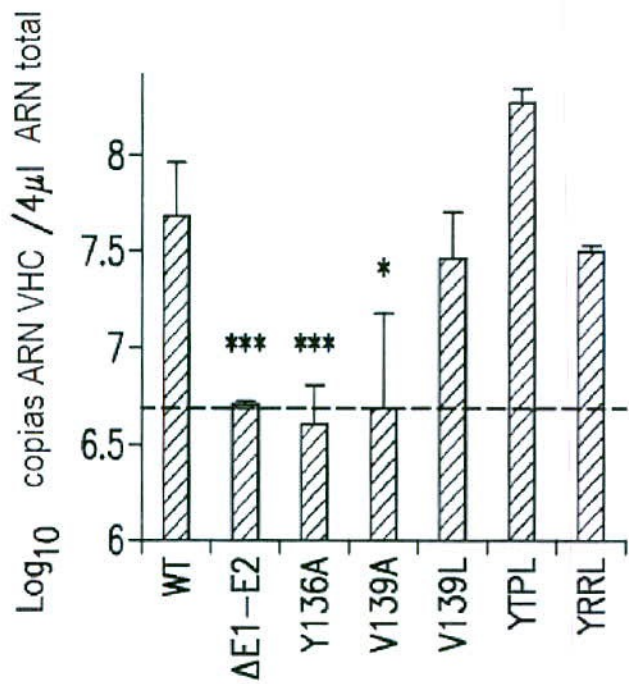


FIG. 3F

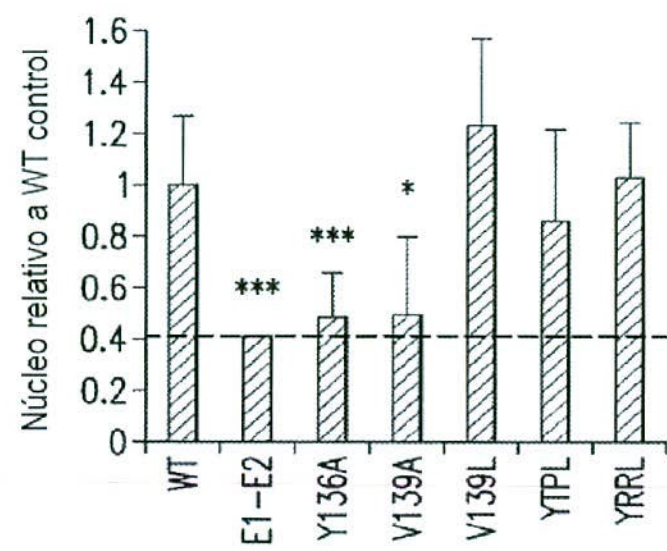


FIG. 3G

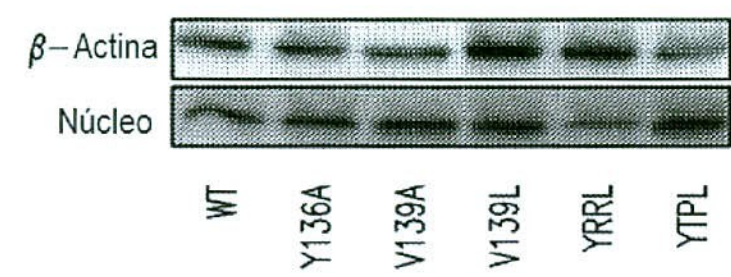
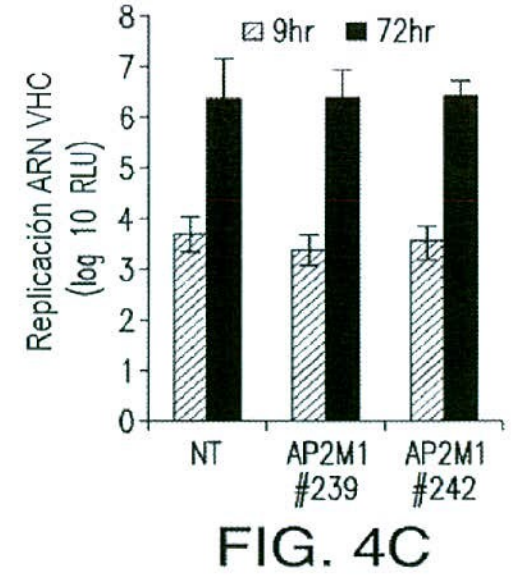
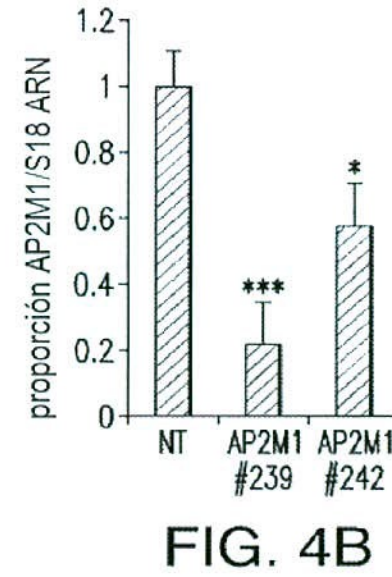
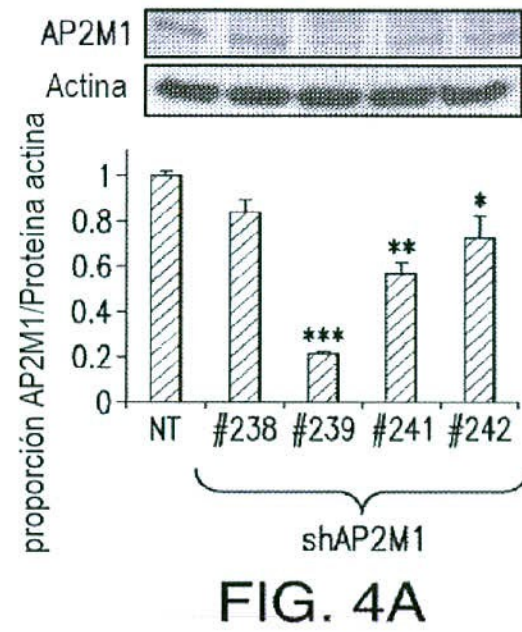


FIG. 3H



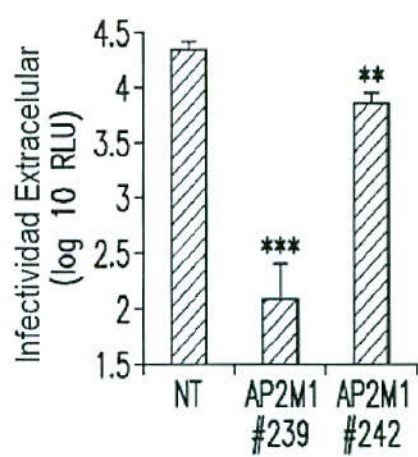


FIG. 4D

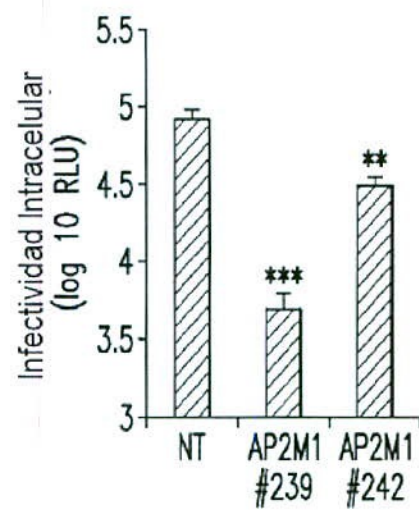


FIG. 4E

Clon	TCID ₅₀ /ml	
	Extracelular	Intracelular
NT.....	6.32x10 ³	2.14x10 ⁴
AP2M1 #239.....	1.58x10 ¹	7.01x10 ¹
AP2M1 #242.....	1.79x10 ²	2.05x10 ³

FIG. 4F

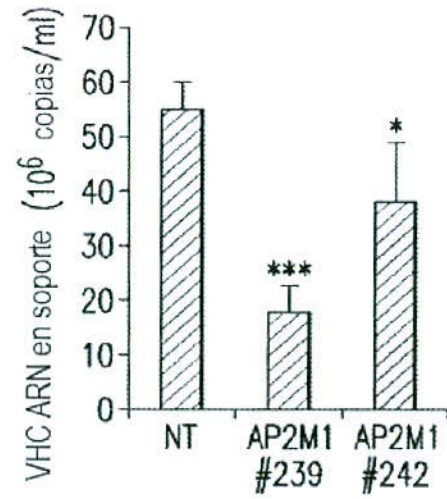


FIG. 4G

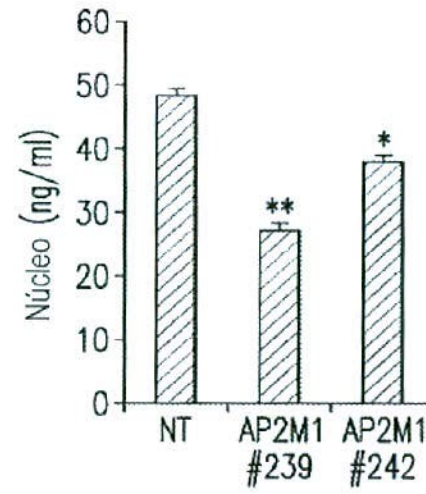


FIG. 4H

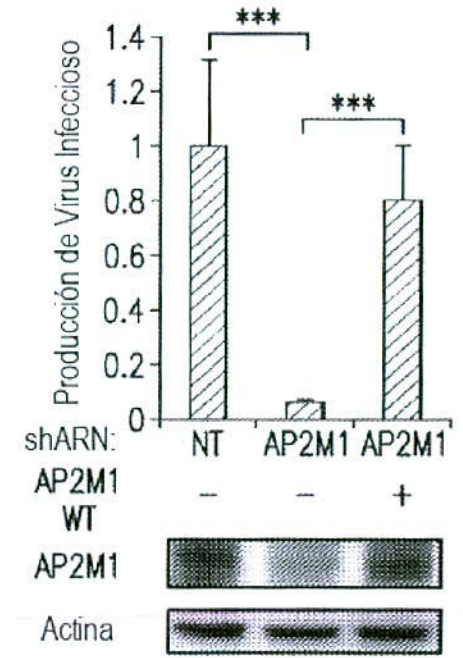


FIG. 4I

11/35

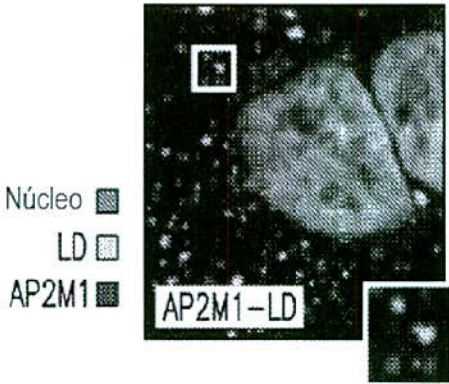


FIG. 5A

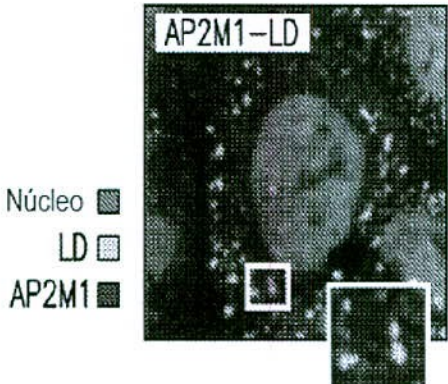


FIG. 5B

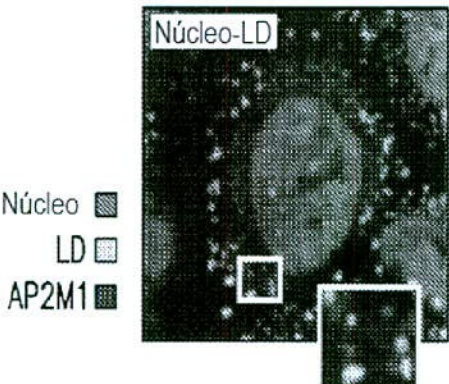


FIG. 5C

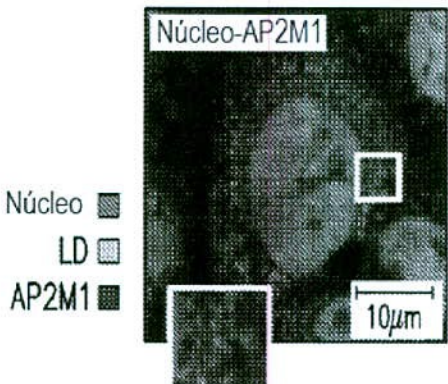


FIG. 5D

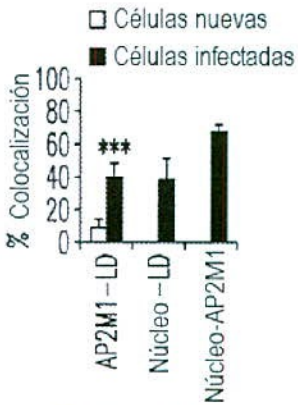


FIG. 5E

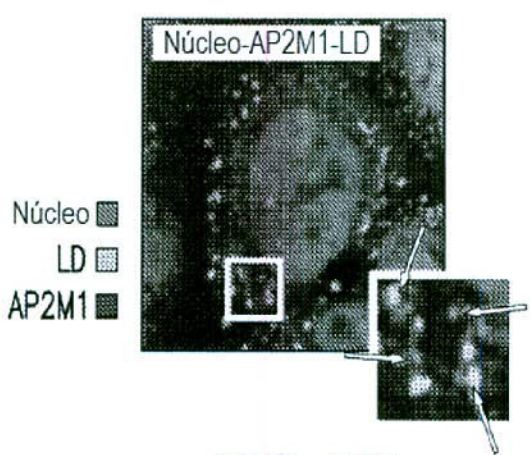


FIG. 5F

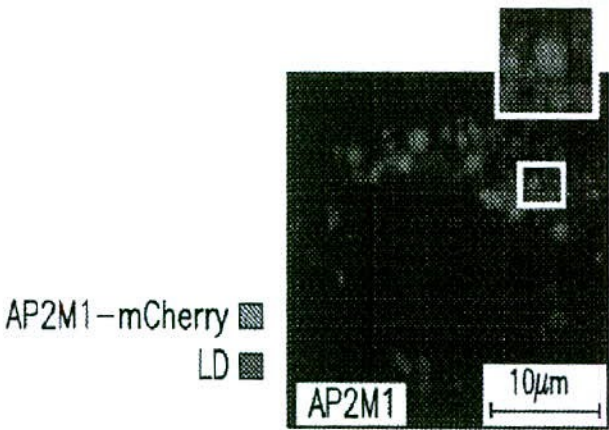


FIG. 5G

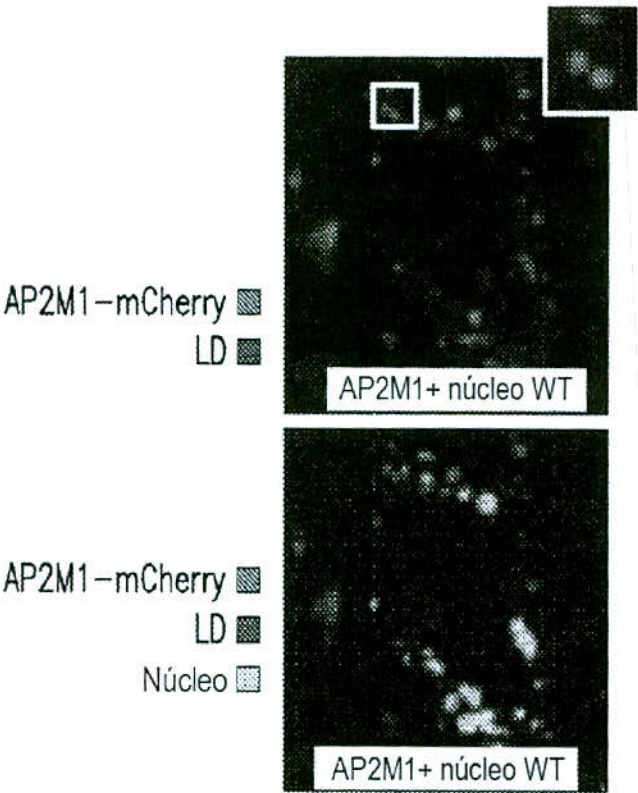


FIG. 5H

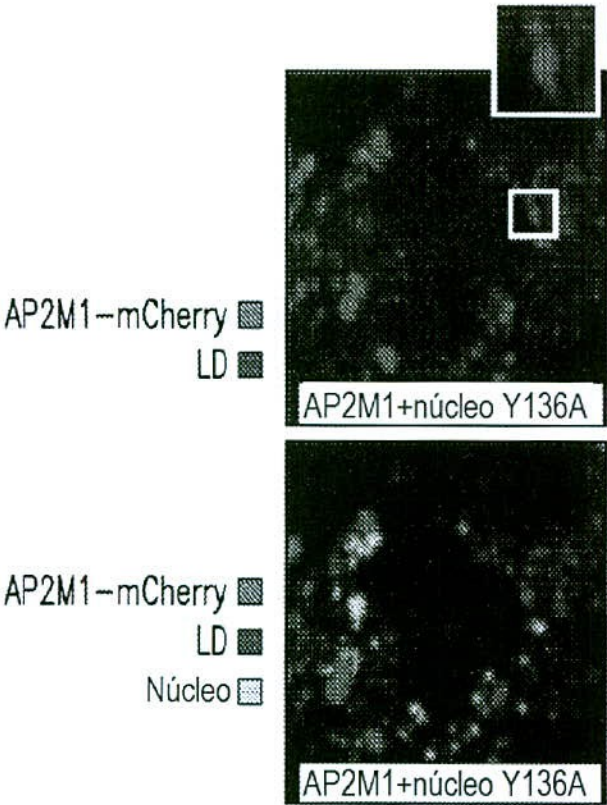


FIG. 5I

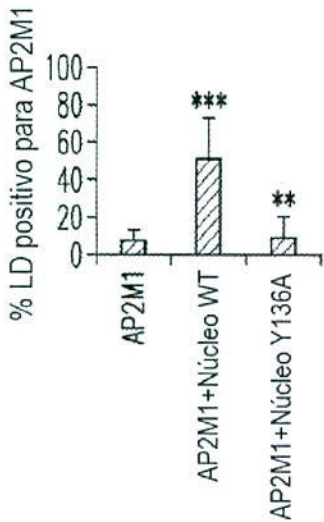


FIG. 5J

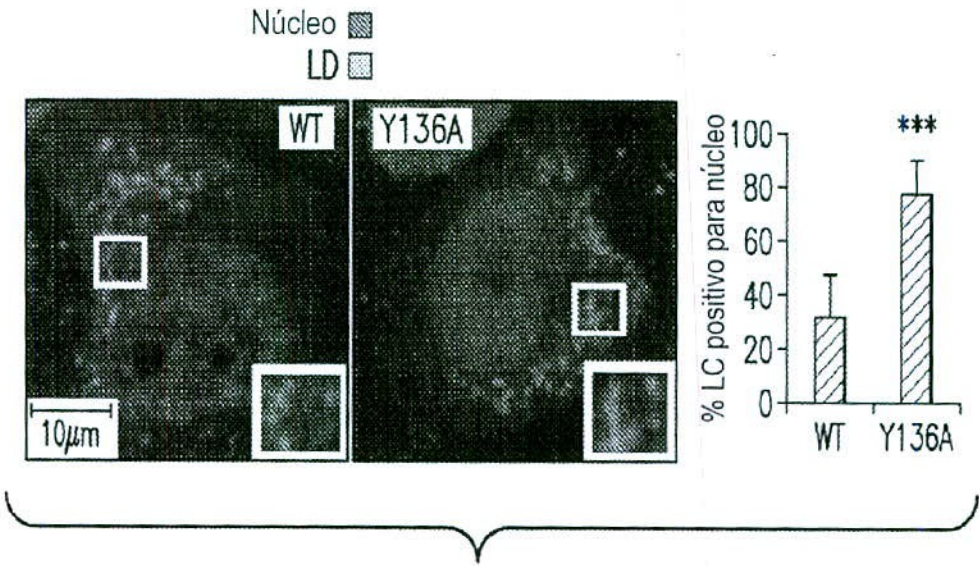


FIG. 5K

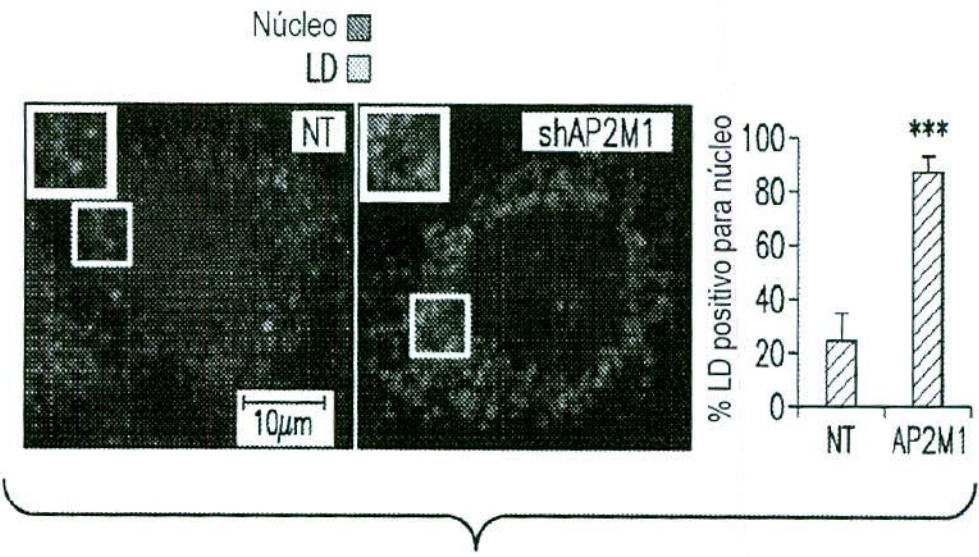


FIG. 5L

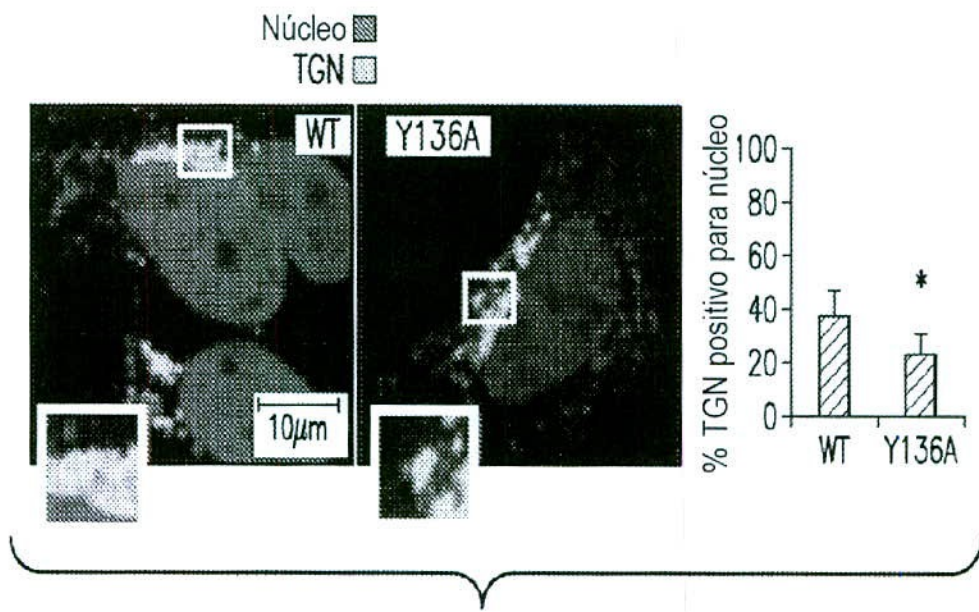


FIG. 5M

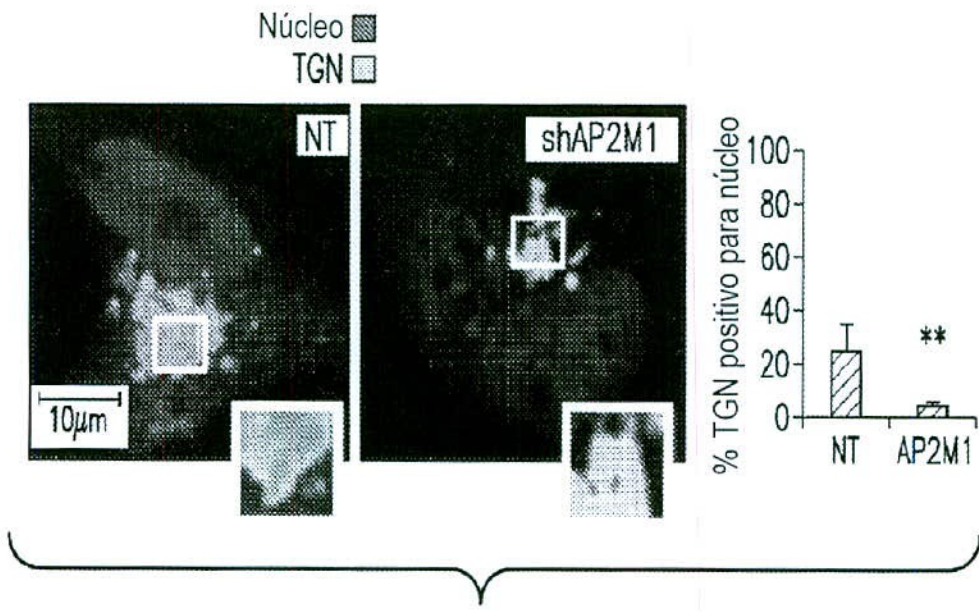


FIG. 5N

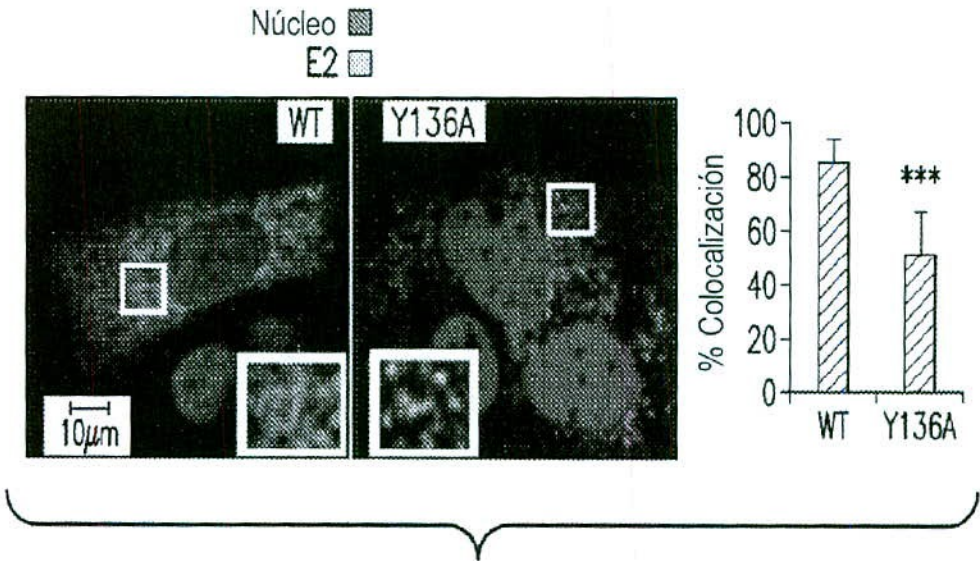


FIG. 5O

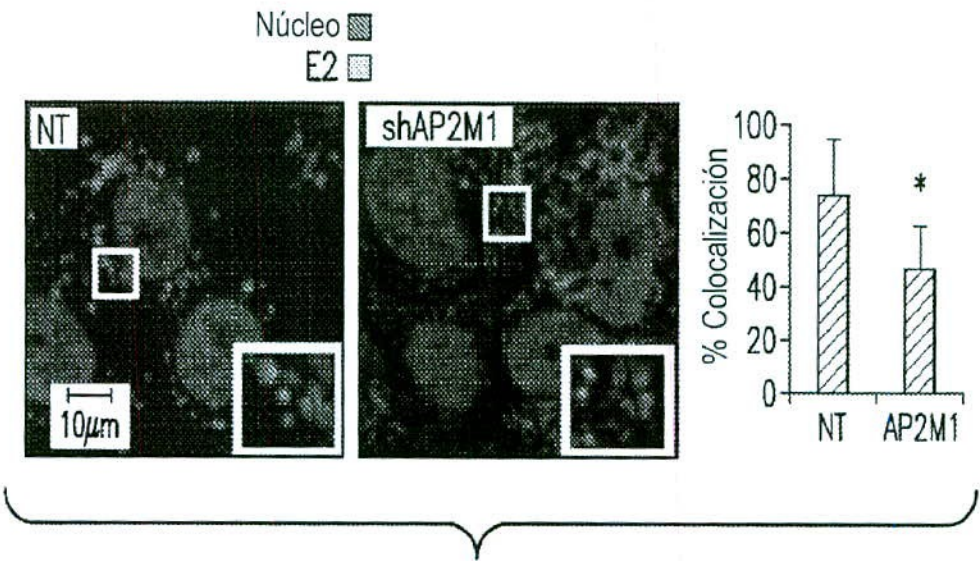


FIG. 5P

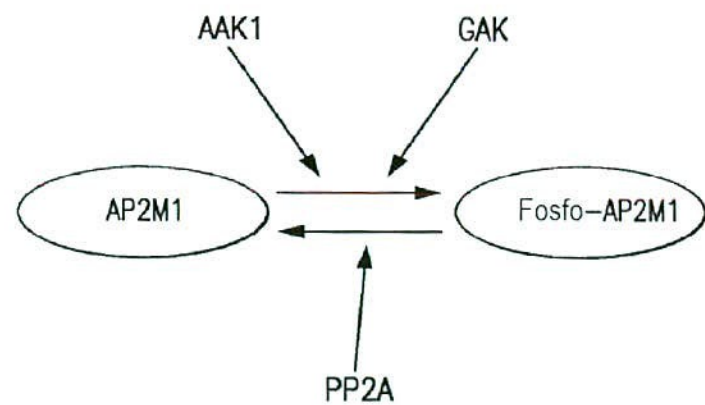


FIG. 6A

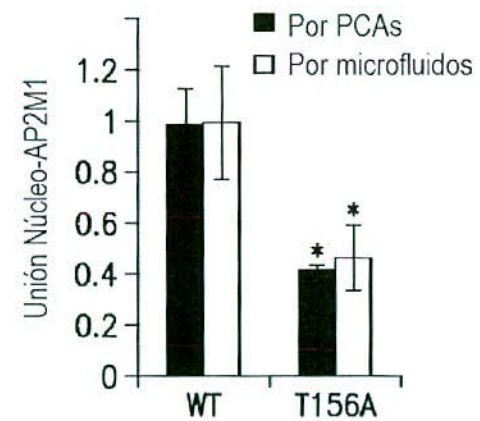


FIG. 6B

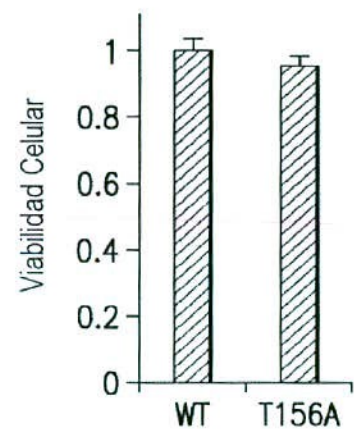


FIG. 6C

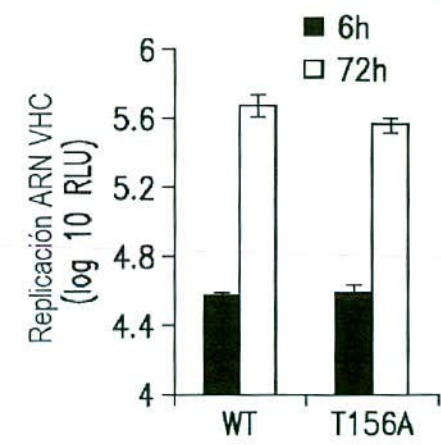


FIG. 6D

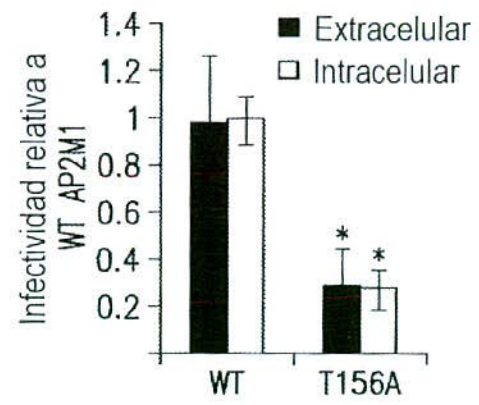


FIG. 6E

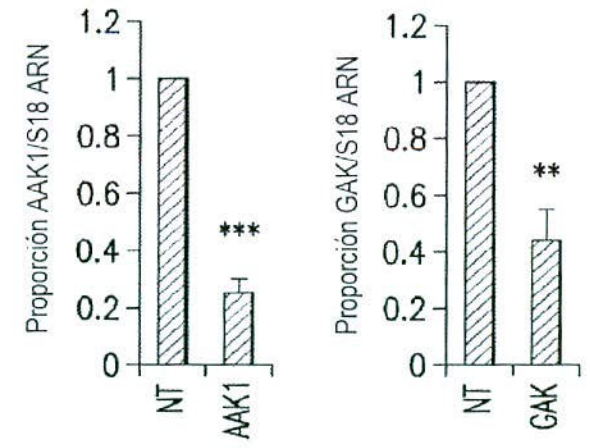


FIG. 6F

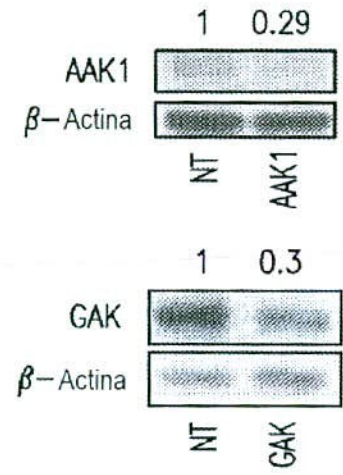
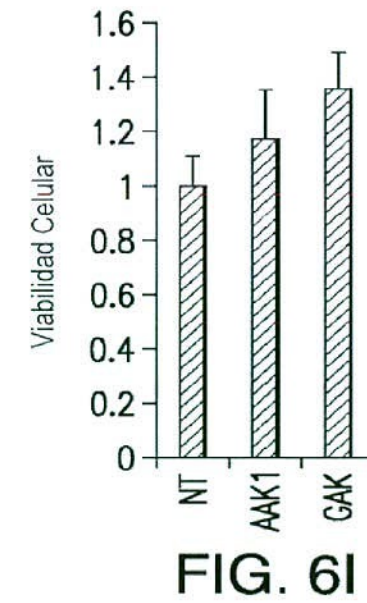
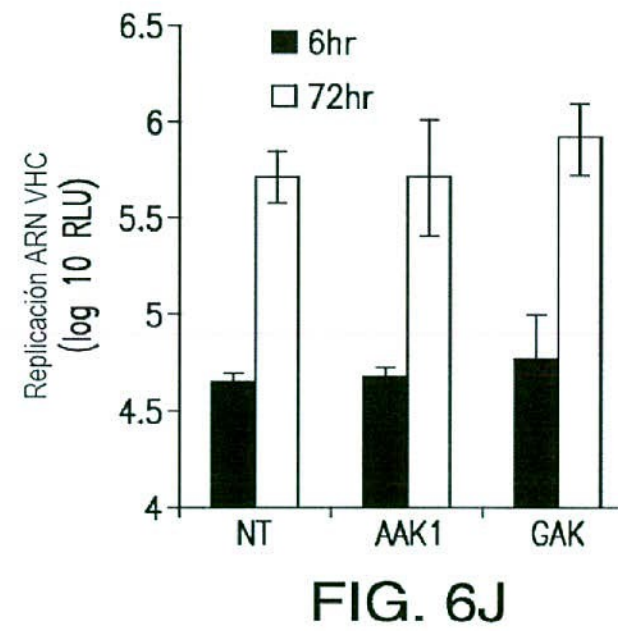
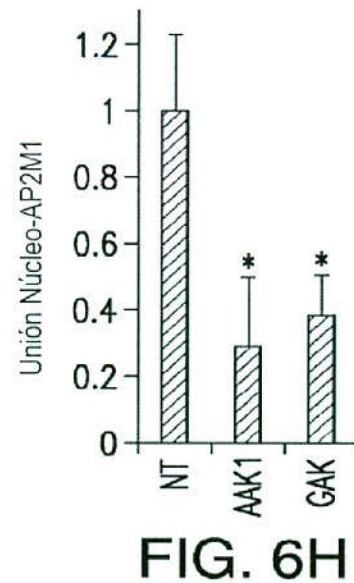


FIG. 6G



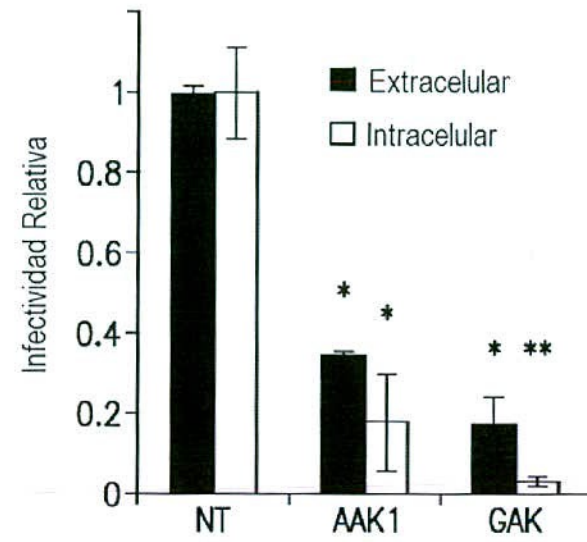


FIG. 6K

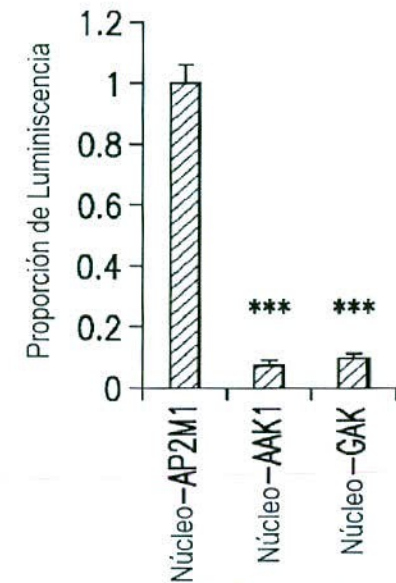


FIG. 6L

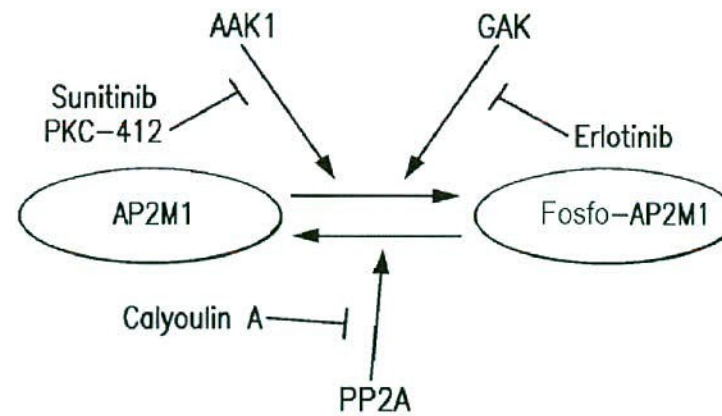


FIG. 7A

Compuesto	Objetivo	Kd de unión (nM)	IC50 (μM)	EC50 para Infectividad Extracelular (μM)	EC50 para Infectividad Intracelular (μM)	EC50 para infección VHCcc (μM)
Erlotinib	GAK	3.1	0.038±0.01	0.6±0.12	0.45±0.13	0.6±0.12
Malato de sunitinib	AAK1	11	0.045±0.02	0.2±0.03	0.155±0.06	1.2±0.3
PKC-412	AAK1	48	0.2±0.07	1.6±0.4	1.79±0.4	4.6±2

FIG. 7B

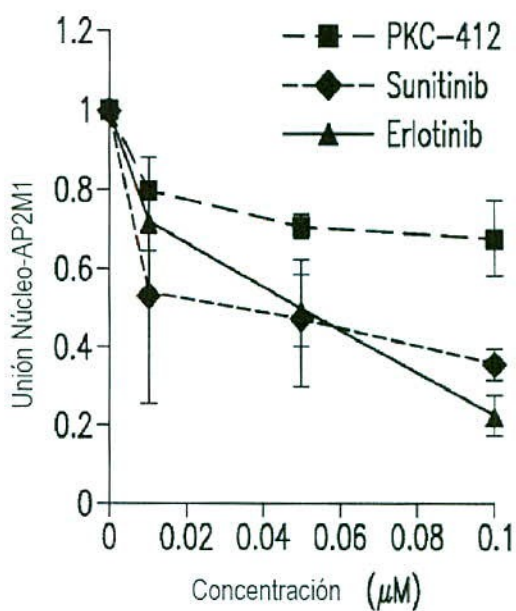


FIG. 7C

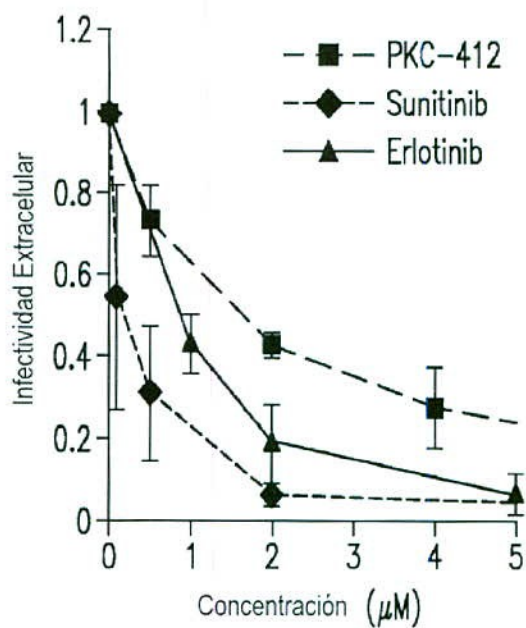


FIG. 7D

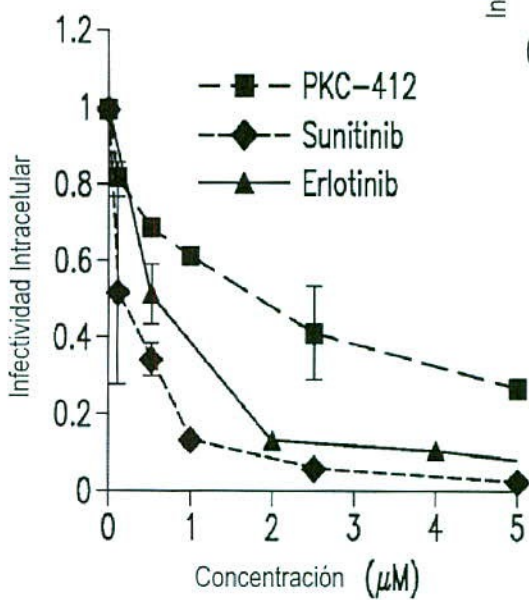


FIG. 7E

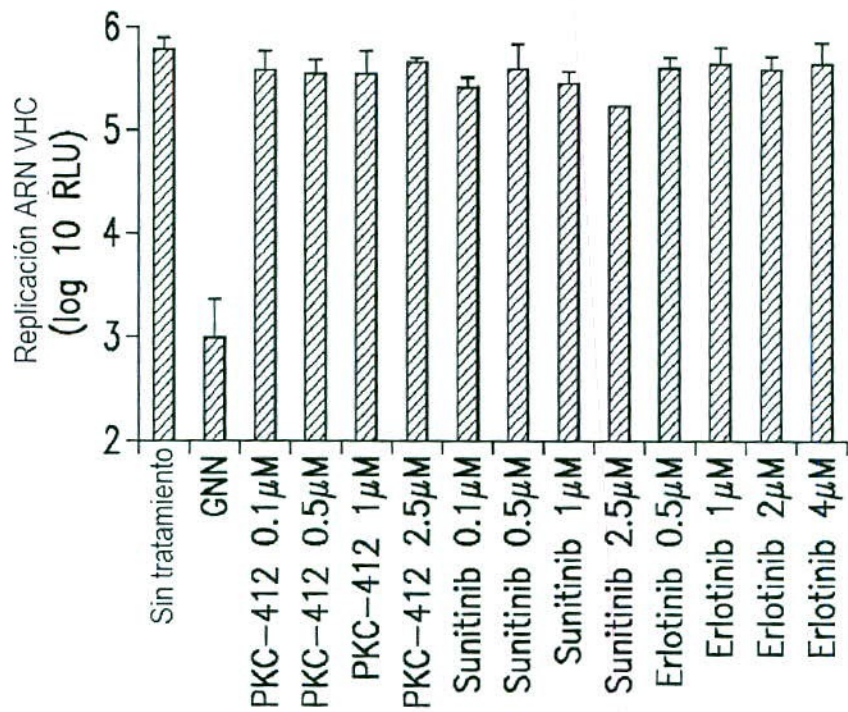


FIG. 7F

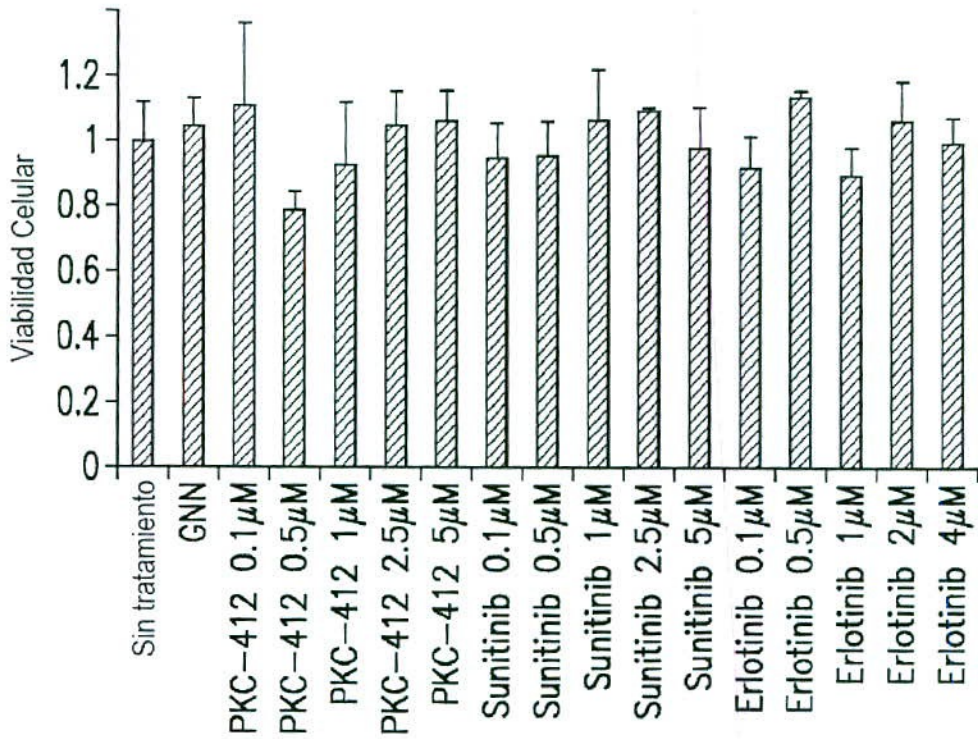


FIG. 7G

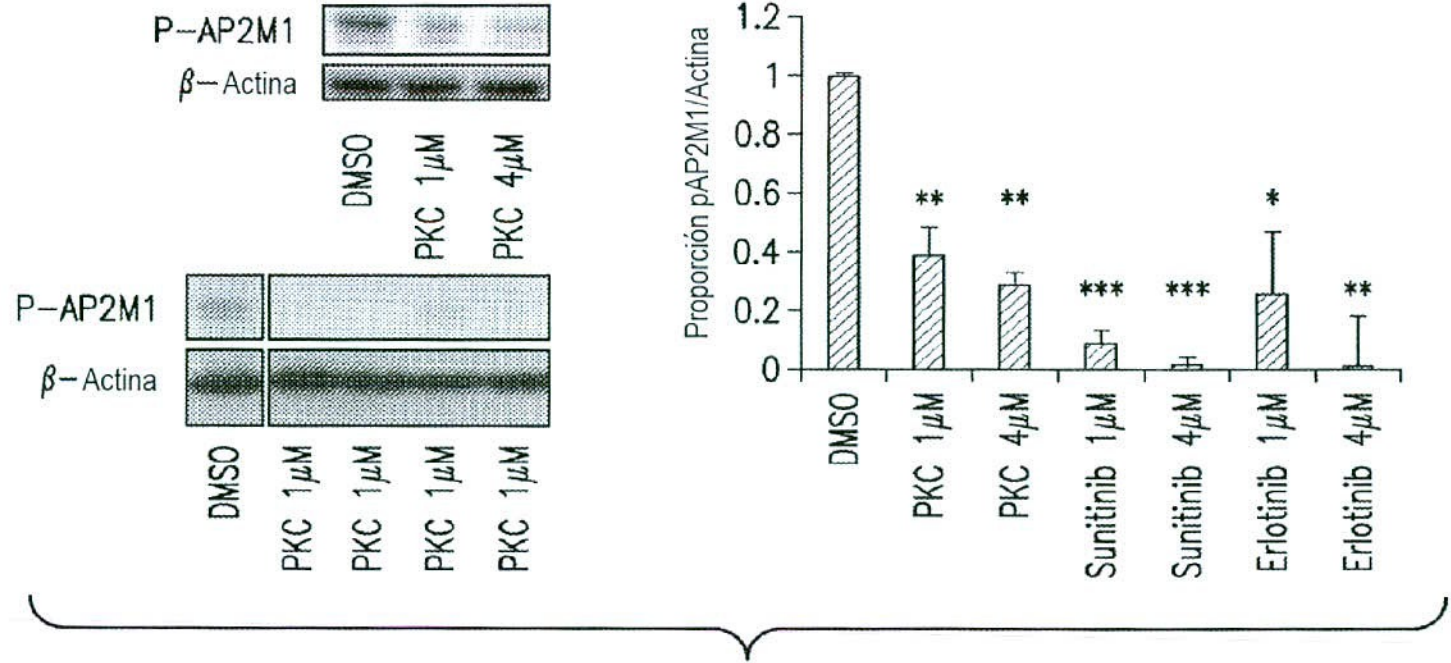


FIG. 7H

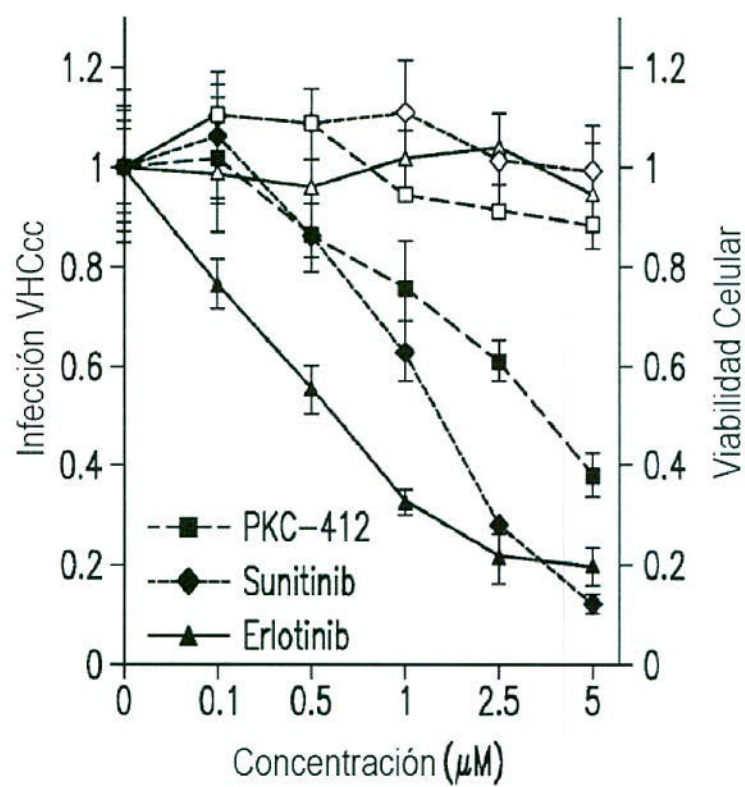


FIG. 71

154

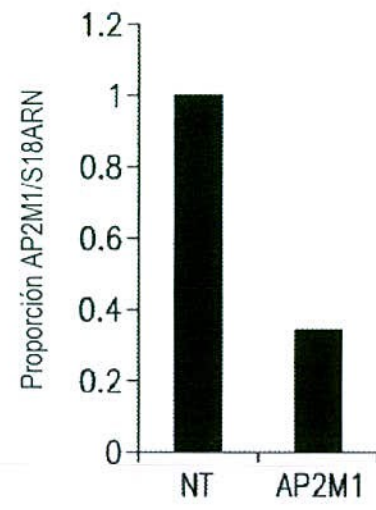


FIG. 8A

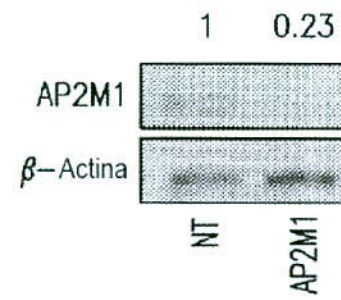


FIG. 8B

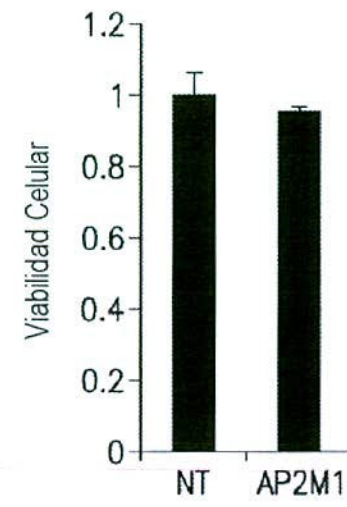


FIG. 8C

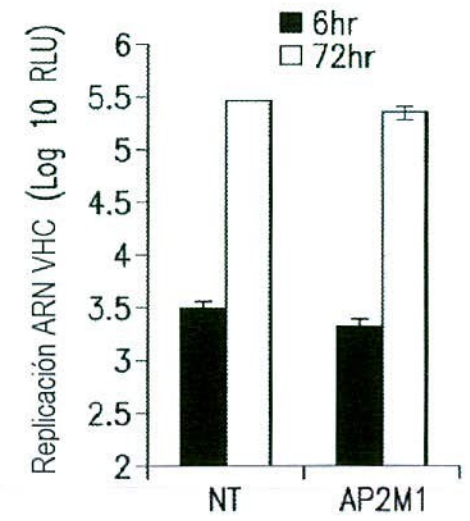


FIG. 8D

27/35

154

155

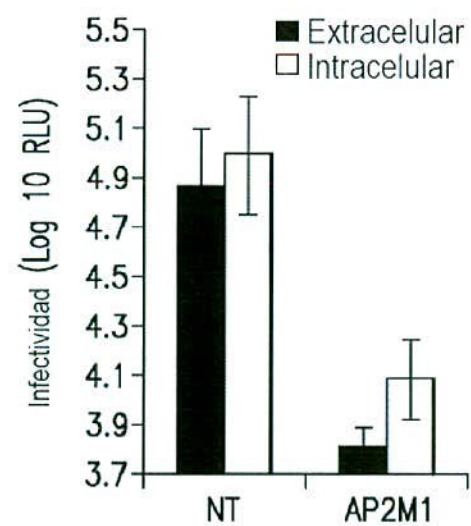


FIG. 8E

siARNs	TCID ₅₀ /ml
NT.....	6.32x10 ³
AP2M1.....	1.12x10 ²

FIG. 8F

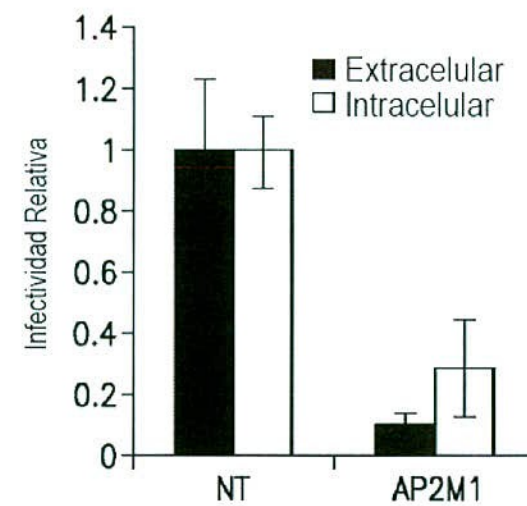


FIG. 8G

155

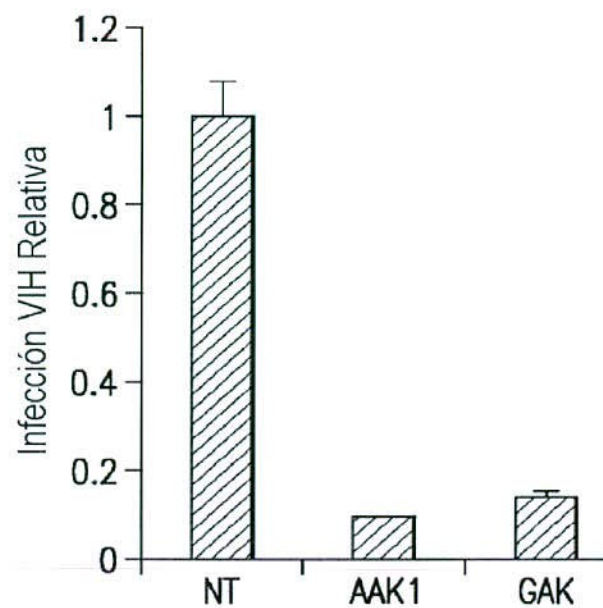


FIG. 9A

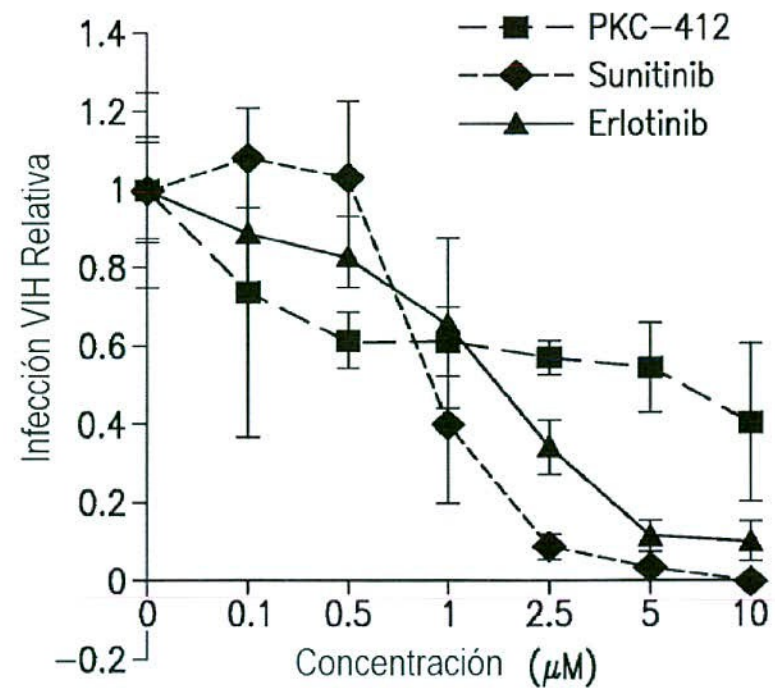


FIG. 9B

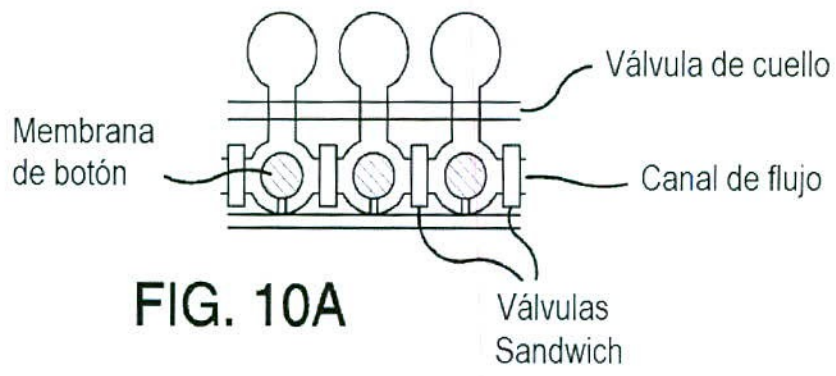


FIG. 10A

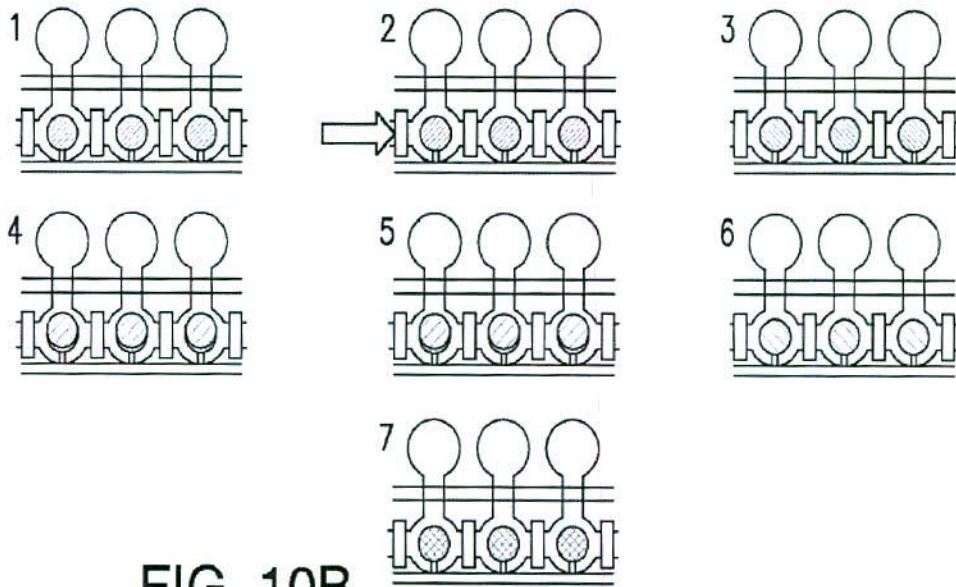


FIG. 10B

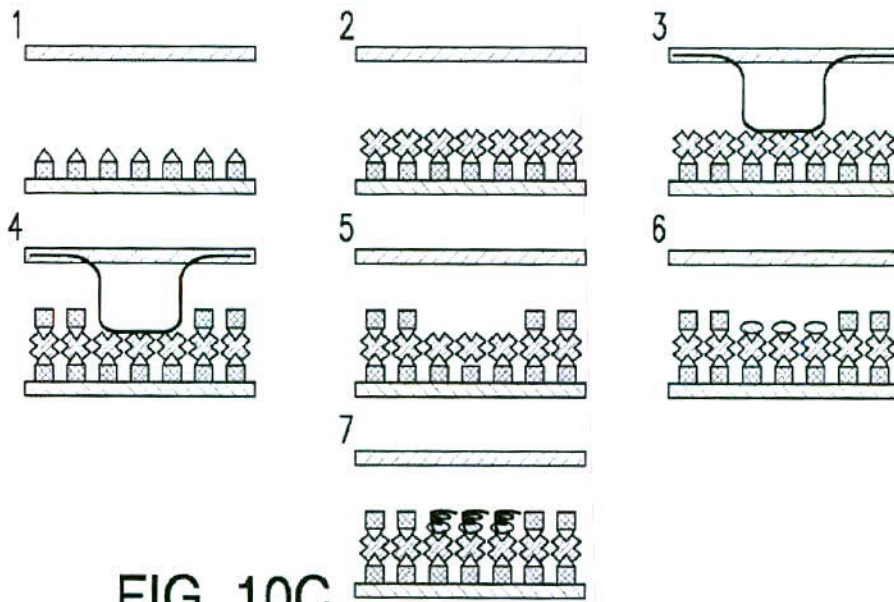


FIG. 10C

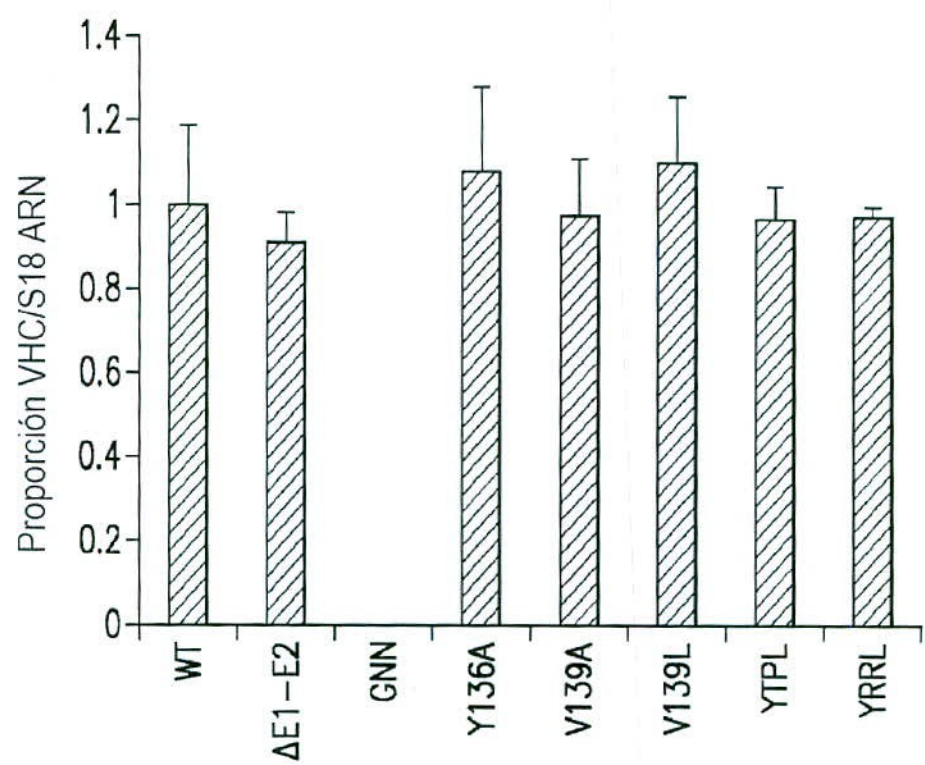


FIG. 11

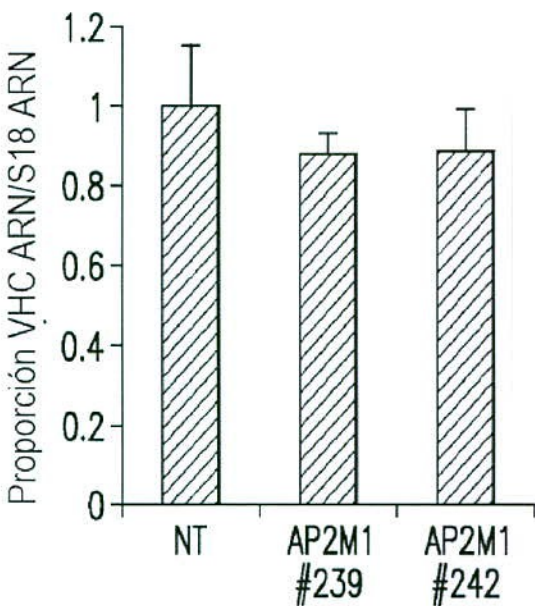


FIG. 12

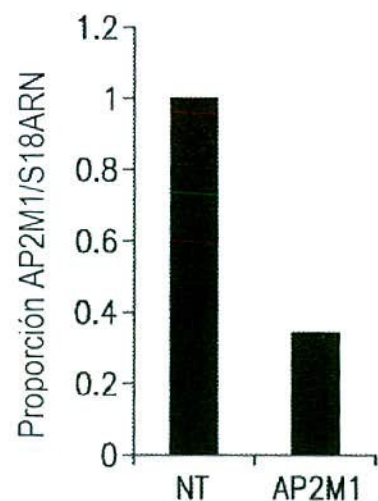


FIG. 13A

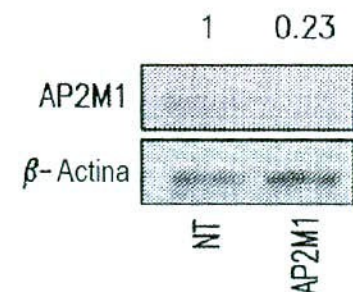


FIG. 13B

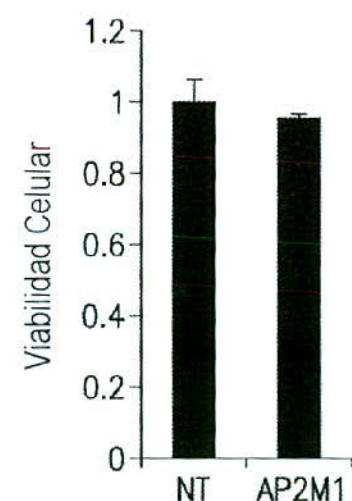


FIG. 13C

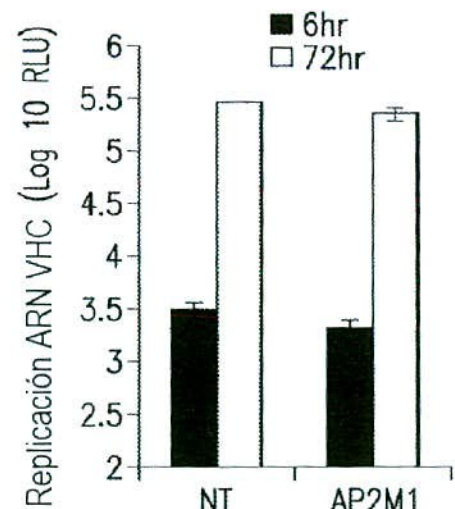


FIG. 13D

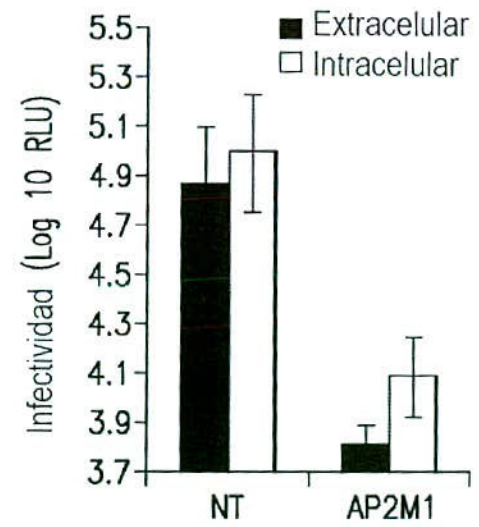


FIG. 13E

siARNs	TCID ₅₀ /ml
NT.....	6.32x10 ³
AP2M1.....	1.12x10 ²

FIG. 13F

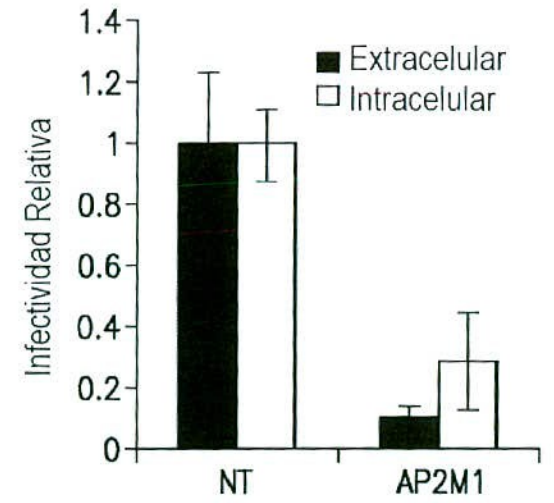


FIG. 13G

62

62

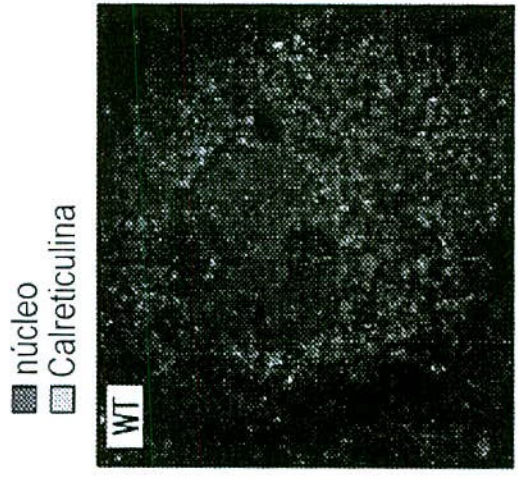


FIG. 14A

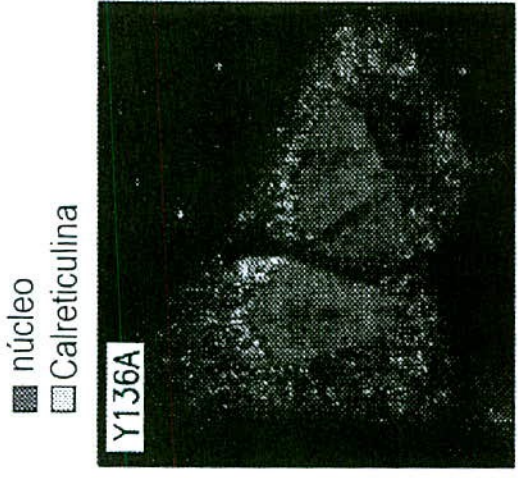


FIG. 14B

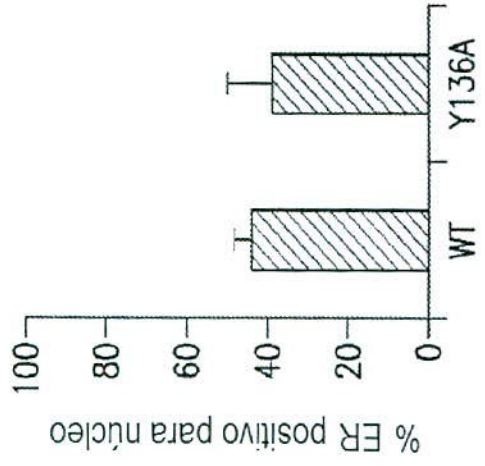


FIG. 14C

STAN003WO_ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING VIRAL DISEASES

<130> STAN:003WO

<140> Unknown

<141> 2012-12-06

<150> 61/567,491

<151> 2011-12-06

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> RNAi

<400> 1
guuaagcggg ccaacauuu 19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> RNAi

<400> 2
gcgagagggg aucaaguau 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> RNAi

<400> 3
aguugagcu uaugaggua 19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> RNAi

<400> 4
gaaccgaagc ugaacuaca 19

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> Two thymine residues at the end of an RNA sequence

<400> 5
ggugugcaag agagaaauct t 21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 6
aacgaaggaa cagcugauuc a 21

<210> 7
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> shRNA

<400> 7
ccgggtggtc atcaagtcca actttctcga gaaagttgga cttgatgacc actttttg 58

<210> 8
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> shRNA

<400> 8
ccggcaccag cttcttccac gttaactcga gttaacgtgg aagaagctgg tgtttttg 58

<210> 9
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> shRNA

<400> 9
ccgggctgga tgagattcta gacttctcga gaagtctaga atctcatcca gctttttg 58

<210> 10
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> shRNA

<400> 10
ccggcattta tgaaactcgc tgctactcga gtagcagcga gtttcataaa tgtttttg 58

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

STAN003WO_ST25.txt

<220>		
<223>	Primer	
<400>	11	
	cttcacgcag aaagcgtcta	20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	12	
	caagcacctt atcaggcagt	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	13	
	tatgagtgtc gtgcagcctc	20

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: 14 / 6 / 27 AAAA MM DD	
		Recorrido: 4	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-139622	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD X
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

El cd anexo contiene un total de Archivos:
 1 Archivo en formato Block de Notas, por lo cual no cumple con la circular y por lo tanto no fue procesado en el folio 166

ACAA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0066539

Bogotá D.C., Junio 24 de 2014 - 16:26:22

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	644039270	24/06/2014	10.660.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-139622- -00000-0000

Fecha: 2014-06-27 16:47:22 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 169

Ccto: 21226-841-001-7.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 24 de 2014 - 16:26:33

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0066818

Bogotá D.C., Junio 25 de 2014 - 11:50:52

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	61603	11/06/2014		116.000.00
RECIBO DE CA	999999999	61633	11/06/2014		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	64194	17/06/2014		106.000.00
RECIBO DE CA	999999999	64195	17/06/2014		106.000.00
RECIBO DE CA	999999999	65071	18/06/2014		11.000.00
RECIBO DE CA	999999999	66082	24/06/2014		116.000.00
RECIBO DE CA	999999999	66530	24/06/2014		180.000.00

RECIBO DE CA	999999999	66570	24/06/2014		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	66571	24/06/2014		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	66572	24/06/2014		5.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

CONCEPTO

Vr.UNDITARIO

Vr.CONCEPTO

7 50005-01-01 SOLICITUDES

1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA
ADICIONAL A LAS 10 INIC

31.000.00

217.000.00

\$217.000.00

SON: ~~**DOSCIENTOS DIECISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***~~

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-139622- -00000-0000

Fecha: 2014-06-27 16:47:22

Dep. 2020 DIR NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 169

Código: 21226-841-001-7

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 25 de 2014 - 11:50:53

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/567,491 2011/06/06 US	(51) Int Cl: A61K 031/517 (71) Solicitante(s) THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (72) Inventor(es) SHIRIT EINAV Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2014/07/06 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2012/12/06 No. de solicitud PCT/US2012/068167	(87) Publicación internacional Fecha: 2013/06/13 N° publicación: WO 2013/086133 A1
(54) Titulo: MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR ENFERMEDADES VIRALES	

Resumen:

La invención proporciona un método para tratar infecciones virales y co-infecciones mediante el uso de agentes inhibidores que evitan que los motivos de proteína estructural viral únicos se unan con las proteínas huésped de la familia de proteínas adaptadoras de clatrina y evitar posteriormente la replicación viral.