



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 296 985**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/29 (2006.01)
C12N 1/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02759107 .2**
(86) Fecha de presentación : **26.06.2002**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1411980**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

(54) Título: **Usos de DC-SIGN y DC-SIGNR para inhibir la infección por el virus de la hepatitis C.**

(30) Prioridad: **26.06.2001 US 891894**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(73) Titular/es: **PROGENICS PHARMACEUTICALS, Inc.**
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, New York 10591, US

(72) Inventor/es: **Olson, William, C. y**
Maddon, Paul, J.

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Usos de DC-SIGN y DC-SIGNR para inhibir la infección por el virus de la hepatitis C.

5 A lo largo de esta solicitud se ha hecho referencia a diversas publicaciones mediante numeración arábica. Las citas completas de estas publicaciones se pueden encontrar al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

10 El virus de la hepatitis C se reconoció por primera vez en 1989 y es responsable de la mayoría de los casos de hepatitis no A, no-B. [1] Las infecciones son típicamente crónicas y para toda la vida; muchos individuos infectados están sanos y permanecen sin afecciones durante décadas, mientras que otros desarrollan hepatitis crónica o cirrosis, conduciendo esta última a menudo a carcinoma hepatocelular. [16] Aunque la exploración del suministro de sangre ha disminuido de forma espectacular nuevas transmisiones del virus, existe una gran cohorte de individuos infectados que requerirán tratamiento en las siguientes décadas. Algunos informes estiman que aproximadamente el 3% de la población mundial (incluyendo aproximadamente 4 millones de personas en los Estados Unidos) está infectada con el VHC. [2] Se estima que 170 millones de personas en todo el mundo, incluyendo aproximadamente 4 millones de personas en los Estados Unidos, están infectadas con el VHC. Los individuos infectados tienen o desarrollarán enfermedad hepática con consecuencias clínicas que varían desde un estado de portador asintomático hasta hepatitis activa y cirrosis. La infección crónica también está fuertemente asociada con el desarrollo de carcinoma hepatocelular. La infección por VHC y sus secuelas clínicas son las causas principales de trasplante de hígado en los Estados Unidos. Actualmente no se dispone de vacunas. Actualmente se usan varias preparaciones de interferón alfa e interferón alfa-2b más ribavirina para el tratamiento de la hepatitis C crónica. [32] Los mejores porcentajes de respuesta a largo plazo se obtienen con una combinación de interferón alfa-2b y ribavirina. Sin embargo, solamente una minoría de los sujetos tratados con esta combinación consigue el resultado deseado de ausencia de ARN de VHC sérico detectable 6 meses después de interrumpir el tratamiento. [32] El tratamiento óptimo con estos fármacos para todos los individuos infectados, incluyendo los co-infectados con VIH-1, no se ha establecido debido a que los datos de la dinámica viral en respuesta al tratamiento son escasos. El interferón alfa y la ribavirina son agentes antivirales no específicos con mecanismos de acción que no se entienden completamente. También están asociados con toxicidades graves y peligrosas para la vida, incluyendo neutropenia, anemia hemolítica y depresión grave.

Hay una necesidad urgente de nuevos agentes terapéuticos para combatir la infección por VHC. Una diana particularmente atractiva para la terapia antiviral es la entrada de VHC en células diana, ya que estos inhibidores no necesitan atravesar la membrana plasmática ni modificarse intracelularmente. Además, la entrada viral es generalmente una etapa limitante de velocidad que está mediada por estructuras conservadas en el virus y la membrana celular. En consecuencia, los inhibidores de la entrada viral pueden proporcionar una supresión potente y permanente de la replicación viral.

40 El genoma del VHC es una molécula de ARN de 9,4 kilobases de sentido positivo, de una sola cadena, que codifica una única poliproteína de ~3000 aminoácidos. [42] Se han caracterizado varios aislados y se ha descubierto que muestran una diversidad de secuencia considerable. Las secuencias de los virus se pueden dividir en genotipos principales (que presentan una identidad de secuencia <70%), y adicionalmente en subtipos (que presentan una identidad de 80-90%). [53] El genotipo 1 (subtipos 1a y 1b) predomina en América del Norte, Europa y Japón. [46] No hay diferencias claras en la patología asociada a los diferentes genotipos.

A pesar de la diversidad de secuencia entre aislados, muchas características son comunes. El ARN genómico contiene una región no traducida (NTR) 5' larga de aproximadamente 340 nucleótidos, seguida de una única fase de lectura abierta (ORF) larga que codifica una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. [42] Una corta NTR 3' va seguida de una secuencia de poliA y 98 nucleótidos muy conservados (la región "X"). La traducción del ARN está mediada por un elemento IRES en la NTR 5'. El precursor de la poliproteína se procesa para generar al menos diez proteínas: desde el extremo amino al carboxi, éstas se denominan C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. [19] La proteína C constituye la nucleocápsida; la E1 y la E2 son glicoproteínas de la envuelta transmembrana; la p7 tiene función desconocida; las diversas proteínas NS son proteínas no estructurales con funciones de replicación. La escisión de la poliproteína en la región estructural (C-p7) se cataliza en el retículo endoplásmico (RE) por peptidasas señal celulares. La escisión de la poliproteína en la región no estructural (NS2-NS5B) está mediada por proteinasas codificadas por el VHC. La NS2 y la NS3 constituyen una proteasa que escinde la unión NS2-NS3. La NS3 es una proteína de función dual, que contiene en su extremo amino un dominio de proteasa de serina responsable de la escisión en los sitios restantes en el precursor, y un dominio de ARN helicasa/NTPasa en su extremo carboxilo. Se piensa que la NS4A potencia o dirige la actividad proteasa de NS3, mientras que las funciones de la NS4B y la NS5A no están claras. La NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y la subunidad catalítica de la replicasa para el virus. Esta enzima reconoce el extremo 3' del ARN y realiza la síntesis del ARN para crear un ARN de cadena negativa. El extremo 3' de la cadena negativa se reconoce después de forma similar por la RdRp para iniciar la síntesis de moléculas de ARN de cadena positiva. Según se obtienen estos ARN virales de la progenie, se empaquetan en viriones de ensamblaje. Las partículas de VHC se introducen en el RE y se transportan al exterior de la célula por vesículas microsomaes. [42]

Hay pocos modelos animales para la infección por VHC. Éstos incluyen el chimpancé [22] [27] [45], que es una especie en peligro. Otro modelo es el modelo SCID-BNX, en el cual se implanta a ratones inmunodeficientes tejido hepático humano que está infectado con VHC como se ha descrito. [54] Los estudios de la replicación viral *in vitro* han dependido en gran medida de la infección de líneas celulares o de cultivos hepáticos primarios con sueros de pacientes infectados por VHC. [4] [5] [23] [24] [26] [29] [44] [51] Sin embargo, los niveles de ARN viral en estos cultivos infectados son muy bajos y solamente se pueden detectar por PCR. [4] [5] [23] [24] [26] [29] [44] [51] En un importante avance reciente, Lohmann *et al.* [30] sustituyó los genes estructurales de un genoma completo de subtipo 1b con el gen de la neomicina fosfotransferasa seguido por el IRES del virus de la encefalomiocarditis. En la construcción resultante, el gen de la fosfotransferasa estaba cadena abajo de la NTR 5' del VHC (que contiene el IRES del VHC), mientras que los genes no estructurales del VHC estaban aguas abajo del IRES del virus de la encefalomiocarditis. Se transcribió el ARN de esta construcción y se introdujo por transfección en la línea celular de hepatoma humano, Huh-7. Después de la selección en neomicina, se obtuvieron líneas celulares que mostraron una fuerte replicación del mini-genoma introducido por transfección; el ARN viral se pudo detectar por análisis de Northern y las proteínas virales se pudieron detectar por inmunoprecipitación. Existe una necesidad urgente de modelos animales adicionales de infección por VHC.

La entrada del VHC en las células hospedadoras requiere la unión de la partícula viral a la superficie celular, seguida de la fusión de la envuelta viral con la membrana celular. Este proceso está mediado por las glicoproteínas de la envuelta viral E1 y E2. Se ha sugerido que dos proteínas, denominadas E1 y E2 (correspondientes a los aminoácidos 192-383 y 384-750 de la poliproteína de VHC respectivamente), son proteínas externas de la envuelta viral que son responsables de la unión del virus a las células diana. La E1 y la E2 del VHC se han expresado de forma recombinante en varias formas y usando una diversidad de sistemas de expresión. Dos informes recientes han descrito la fusión y la entrada mediada por ectodominios de E1 y E2 fusionados con el dominio TM de la glicoproteína de la envuelta G de VSV. [28] [49]

En sistemas de expresión basados en células de mamífero, el peso molecular de la E1 madura de longitud completa es ~35 kD y el de la E2 es ~72 kD. [19] [31] [48] Los restos amino-terminales de la E1 y E2 maduras se determinaron de forma experimental. [21] El procesamiento endoproteolítico de la poliproteína de VHC convierte la E1 y la E2 en proteínas ancladas a la membrana de tipo 1. [19] [48] Además, la E1 y la E2 forman heterodímeros asociados de forma no covalente, denominadas en este documento en lo sucesivo E1/E2. [8] [19] [37] [41] Los heterodímeros E1/E2 procesados completamente no se exportan a la superficie celular, pero se mantienen en el RE, donde sucede la gemación del VHC. [9] [10] [11] [12] [43] Los análisis de los patrones de glicosilación ligados a N de E1 y E2 demostraron adicionalmente que estas proteínas permanecen en el RE sin ciclación a través del Golgi. [12] [34] Las señales de retención en el RE se localizan en los dominios TM de E1 y E2. [6] [7] [14] La sustitución de los dominios TM de E1 y E2 por los dominios TM de proteínas asociadas a la membrana plasmática o la mutación de restos cargados en los dominios TM de E1 y E2, da como resultado la expresión en la superficie celular de las glicoproteínas de la envuelta. [6] [7] [8] [14] Sin embargo, tales modificaciones del dominio TM también anulan la heterodimerización de E1/E2. [7] [36] Por lo tanto, no se pueden separar la dimerización y las señales de retención en el RE de la E1 y la E2. La delección de todo el dominio TM de la E1 y la E2 da como resultado la secreción de ectodominios solubles monoméricos de las glicoproteínas de la envuelta. [12] [13] [35]

Hasta la fecha, se han implicado dos proteínas celulares humanas, CD81 y receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), como supuestos receptores que median la entrada del VHC [25], y se ha sugerido que los glicosaminoglicanos juegan un papel en la unión no específica del VHC a la célula. [52] Abrignani *et al.* describen usos de la proteína CD81 en el tratamiento y diagnóstico de la infección por VHC en la solicitud de patente internacional WO 99/18198. Ciertos estudios han demostrado que el ectodominio de E2 soluble recombinante se une específicamente y con elevada afinidad a CD81 humana y de chimpancé, pero no a la CD81 de otras especies. [15] [20] [38] [39] Sin embargo, estos resultados se han cuestionado a la luz de un estudio reciente, incluyendo uno que demuestra que la CD81 de tamarino, una especie que es refractaria a la infección por VHC, también se une a la E2 soluble con alta afinidad. [33] Aunque varios estudios han definido los determinantes estructurales de la interacción de CD81 humana/E2, todavía se carece de la prueba funcional directa de la fusión y entrada del VHC mediada por CD81. Además, la CD81 se expresa en numerosos tejidos en el exterior del hígado, y, por lo tanto, la distribución tisular de la CD81 no puede explicar el tropismo celular del VHC. De forma similar, los estudios realizados hasta la fecha no han podido demostrar una interacción directa entre los receptores de LDL y las glicoproteínas de la envuelta del VHC. [52] Además, los receptores de LDL se expresan abundantemente en tejidos diferentes del hígado y, por lo tanto, su expresión no explica el tropismo del VHC.

LA DC-SIGN (Molécula de Adhesión Intercelular Específica de Célula Dendrítica 3-no integrina de Captura, número de entrada del Genbank AF209479) y la DC-SIGNR (relacionada con la DC-SIGN, número de entrada del Genbank AF245219) son proteínas de membrana de tipo II con altas homología de secuencia (con una identidad de aminoácidos de 77%). La DC-SIGN se expresa a altos niveles en células dendríticas; la DC-SIGNR se expresa a altos niveles en el hígado y los ganglios linfáticos pero no en las células dendríticas; y ambas moléculas se expresan en el endometrio y en la placenta. [40] [47] [3] [17]

Las proteínas son lectinas de tipo C (dependientes de calcio) que poseen todos los restos que se consideran necesarios para la unión de manosa. La DC-SIGN y la DC-SIGNR se unen a la glicoproteína gp120 de la envuelta de la superficie del VIH-1, que posee azúcares de alto contenido de manosa, y esta unión se inhibe por manano. [47] [3] [17] Tanto la DC-SIGN como la DC-SIGNR se unen a partículas infecciosas de VIH-1 y promueven la infección de

células T susceptibles en trans. [40] [47] [3] Las solicitudes de patente europeas EP 1046651A1 y EP 1086137A1 describen el uso de DC-SIGN en composiciones y métodos para inhibir la infección por VIH-1. Todo el contenido de estas solicitudes se incorpora en el presente documento como referencia.

5 De forma similar a la DC-SIGN y la DC-SIGNR, la lectina de *Galanthus nivalis* (lectina GNA) de bulbos de campanilla de invierno se une con avidez a carbohidratos y glicoproteínas que poseen estructuras con alto contenido de manosa. En particular, la lectina GNA se une con avidez a glicoproteínas de la envuelta de VIH-1. [18] [50] Además, la GNA captura las glicoproteínas de la envuelta de VHC [13], que contienen carbohidratos de alto contenido de manosa. Basándose en estas observaciones, se ha apreciado que la DC-SIGN y la DC-SIGNR se unen con avidez a
10 glicoproteínas de la envuelta de VHC y, por lo tanto, sirven como receptores para el virus.

Hasta donde se sabe, no se ha realizado ninguna asociación entre la DC-SIGN, la DC-SIGNR y la infección por VHC. La DC-SIGN y la DC-SIGNR también pueden mediar la internalización, requerida para la entrada celular y la infección por VHC pero no por VIH-1. Además, la DC-SIGNR en particular se expresa a altos niveles en el hígado, el
15 órgano diana primario para la infección por VHC. Como la capacidad de la DC-SIGN y particularmente la DC-SIGNR para servir como receptores para el VHC no se ha apreciado previamente, este descubrimiento ofrece la oportunidad de tratar o prevenir la infección por VHC por medio de terapias o vacunas que bloquean la interacción específica entre VHC y estos receptores.

20 Compendio de la invención

Esta invención describe un método para inhibir la infección por VHC de una célula susceptible a la infección por VHC, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad de un compuesto eficaz para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN presente en la superficie de la célula, e inhibir de
25 esto modo la infección por VHC de la célula susceptible a la infección por VHC. En una realización, el compuesto no inhibe la unión del VHC a una proteína DC-SIGNR. En otra realización, el compuesto no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el compuesto no bloquea la adhesión de ICAM.

30 Esta invención proporciona un método para inhibir la infección por VHC de una célula susceptible a la infección por VHC, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad de un compuesto eficaz para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN presente en la superficie de la célula, e inhibir de este modo la infección por VHC de la célula susceptible a la infección por VHC. En una realización, el compuesto no inhibe la unión del VHC a una proteína DC-SIGN. En otra realización, el compuesto no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el compuesto no bloquea la adhesión de ICAM.
35

Esta invención describe un método para inhibir la infección por VHC de una sola diana cuya susceptibilidad a la infección por VHC aumenta cuando VHC se une a una célula que expresa la proteína DC-SIGN, comprendiendo dicho método poner en contacto la célula que expresa la proteína DC-SIGN con una cantidad de un compuesto eficaz
40 para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN, e inhibir de este modo la infección por VHC de la célula diana. En una realización, el compuesto no inhibe la unión de VHC a una proteína DC-SIGNR. En otra realización, el compuesto no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el compuesto no bloquea la adhesión de ICAM.

45 Esta invención proporciona un método para inhibir la infección por VHC de una célula diana cuya susceptibilidad a la infección por VHC aumenta cuando el VHC se une a una célula que expresa la proteína DC-SIGNR, comprendiendo dicho método poner en contacto la célula que expresa la proteína DC-SIGNR con una cantidad de un compuesto eficaz para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN, e inhibir de este modo la infección por VHC de la célula diana. En una realización, el compuesto no inhibe la unión de VHC a una proteína
50 DC-SIGN. En otra realización, el compuesto no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el compuesto no bloquea la adhesión de ICAM.

Una realización de la invención implica la aplicación de uno de los métodos descritos anteriormente, en el que el sujeto puede estar en periodo de gestación. El compuesto puede administrarse a este sujeto antes, durante o después del
55 parto. En una realización adicional de la invención, el compuesto bloquea la transmisión placentaria de VHC a un feto.

Esta invención proporciona un método para inhibir la infección por VHC de las células de un sujeto susceptible a la infección por VHC por medio de un método descrito en este documento.

60 Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

- a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;
- 65 b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con suficiente proteína DC-SIGN detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGN en la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada para formar un complejo;

c) retirar la proteína DC-SIGN no unida;

d) poner en contacto el complejo con el compuesto; y

5 e) determinar si se ha desplazado algo de proteína DC-SIGN del complejo, indicando el desplazamiento de la proteína DC-SIGN del complejo que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC, para determinar de este modo si el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

10 Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;

15 b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con suficiente proteína DC-SIGNR detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGNR en la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada para formar un complejo;

20 c) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

d) poner en contacto el complejo con el compuesto;

25 e) determinar si se ha desplazado algo de proteína DC-SIGNR del complejo, indicando el desplazamiento de la proteína DC-SIGNR del complejo que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC, para determinar de este modo si el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

30 a) inmovilizar una proteína DC-SIGN sobre un soporte sólido;

35 b) poner en contacto la proteína DC-SIGN inmovilizada con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC detectable para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC sobre la proteína DC-SIGN inmovilizada en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

40 d) poner en contacto el complejo con el compuesto;

e) determinar si se ha desplazado algo de glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo, indicando el desplazamiento de la glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo que el compuesto se une a la proteína DC-SIGN, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

45 Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

a) inmovilizar una proteína DC-SIGNR sobre un soporte sólido;

50 b) poner en contacto la proteína DC-SIGNR inmovilizada con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC detectable para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC sobre la proteína DC-SIGNR inmovilizada en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

55 c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

d) poner en contacto el complejo con el compuesto;

60 e) determinar si se ha desplazado algo de glicoproteína de la envuelta de VHC de complejo, indicando el desplazamiento de la glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo que el compuesto se une a la proteína DC-SIGNR, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

65 (a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con suficiente proteína DC-SIGN detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGN en la glicoproteína de la envuelta de VHC en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

(b) retirar la proteína DC-SIGN no unida;

(c) medir la cantidad de proteína DC-SIGN que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo;

5 (d) poner en contacto el complejo con el compuesto para desplazar la proteína DC-SIGN del complejo;

(e) medir la cantidad de proteína DC-SIGN que está unida al compuesto en presencia del compuesto; y

10 (f) comparar la cantidad de proteína DC-SIGN unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en la etapa (e) con la cantidad medida en la etapa (c), indicando una cantidad reducida medida en la etapa (e) que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

15 Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

(a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con suficiente proteína DC-SIGNR detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGNR en la glicoproteína de la envuelta de VHC en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

20 (b) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

(c) medir la cantidad de proteína DC-SIGNR que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo;

25 (d) poner en contacto el complejo con el compuesto para desplazar la proteína DC-SIGNR del complejo;

(e) medir la cantidad de proteína DC-SIGNR que está unida al compuesto en presencia del compuesto; y

30 (f) comparar la cantidad de proteína DC-SIGNR unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en la etapa (e) con la cantidad medida en la etapa (c), indicando una cantidad reducida medida en la etapa (e) que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC, para identificar de este modo el compuesto como un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

35 Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

(a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;

40 (b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con el compuesto y proteína DC-SIGN detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en ausencia del compuesto para formar un complejo;

45 (c) retirar la proteína DC-SIGN no unida;

(d) comparar la cantidad de proteína DC-SIGN detectable que esta unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGN detectable que se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en ausencia del compuesto;

50 (e) donde una cantidad reducida de proteína DC-SIGN medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGN, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

55 Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

(a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;

60 (b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con el compuesto y la proteína DC-SIGNR detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en ausencia del compuesto para formar un complejo;

(c) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

65 (d) comparar la cantidad de la proteína DC-SIGNR detectable que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en ausencia del compuesto;

ES 2 296 985 T3

(e) donde una cantidad reducida de proteína DC-SIGNR medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGNR, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

5 Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

(a) inmovilizar una proteína DC-SIGN sobre un soporte sólido;

10 (b) poner en contacto la proteína DC-SIGN inmovilizada con el compuesto y glicoproteína de la envuelta de VHC detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC en ausencia del compuesto para formar un complejo;

(c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

15 (d) comparar la cantidad de la proteína de la envuelta de VHC detectable que está unida a la proteína DC-SIGN inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína de la envuelta de VHC detectable que se une a la proteína DC-SIGN inmovilizada en ausencia del compuesto;

20 (e) donde una cantidad reducida de glicoproteína de la envuelta de VHC medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o la proteína DC-SIGN, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

25 Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

(a) inmovilizar una proteína DC-SIGNR sobre un soporte sólido;

30 (b) poner en contacto la proteína DC-SIGNR inmovilizada con el compuesto y la glicoproteína de la envuelta de VHC detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC en ausencia del compuesto para formar un complejo;

(c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

35 (d) comparar la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC detectable que está unida a la proteína DC-SIGNR inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC detectable que se une a la proteína DC-SIGNR inmovilizada en ausencia del compuesto;

40 (e) donde una cantidad reducida de glicoproteína de la envuelta de VHC medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGNR, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

45 Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

(a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con el compuesto y proteína DC-SIGN detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN a la glicoproteína de la envuelta de VHC en ausencia del compuesto para formar un complejo;

50 (b) retirar la proteína DC-SIGN no unida;

(c) comparar la cantidad de proteína DC-SIGN detectable que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGN detectable que se une al compuesto en ausencia del compuesto;

55 donde una cantidad reducida de proteína DC-SIGN medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGN, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

60 Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección de una célula por VHC, que comprende:

(a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con el compuesto y proteína DC-SIGNR detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC en ausencia del compuesto para formar un complejo;

65 (b) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

(c) comparar la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que se une al compuesto en ausencia del compuesto;

5 donde una cantidad reducida de proteína DC-SIGNR medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGNR, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección de la célula por VHC.

Esta invención proporciona un método para obtener una composición que comprende:

10 (a) identificar un compuesto que inhiba la infección de una célula por VHC de acuerdo con un método descrito en este documento;

(b) recuperar el compuesto; y

15 (c) mezclar el compuesto identificado de esta manera o un homólogo o derivado del mismo con un vehículo para obtener de este modo una composición.

20 Esta invención describe un uso de una cantidad eficaz de un compuesto capaz de inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN presente en la superficie de las células de un sujeto, para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir enfermedades hepáticas en un sujeto.

25 Esta invención proporciona un uso de una cantidad eficaz de un compuesto capaz de inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGNR presente en la superficie de las células de un sujeto, para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir enfermedades hepáticas en un sujeto.

Esta invención describe un uso de una cantidad eficaz de un compuesto capaz de inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN presente en la superficie de las células de un sujeto, para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir el carcinoma hepatocelular en un sujeto.

30 Esta invención proporciona un uso de una cantidad eficaz del compuesto capaz de inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGNR presente en la superficie de las células de un sujeto, para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir el carcinoma hepatocelular en un sujeto.

35 Esta invención describe un método para diagnosticar la infección por VHC de un sujeto, que comprende:

(a) inmovilizar una proteína DC-SIGN sobre un soporte sólido;

40 (b) poner en contacto la proteína DC-SIGN inmovilizada con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC para saturar todos o una parte de los sitios de unión de la glicoproteína de la envuelta de VHC en la proteína DC-SIGN inmovilizada para formar un complejo;

(c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

45 (d) poner en contacto el complejo con una muestra adecuada obtenida del sujeto;

(e) retirar la muestra no unida; y

50 (f) determinar si hay anticuerpo unido a la glicoproteína de la envuelta de VHC, donde la presencia de anticuerpos anti-VHC diagnostica de este modo la infección del sujeto por VHC.

Esta invención describe un método para diagnosticar la infección de un sujeto por VHC, que comprende:

55 (a) inmovilizar una proteína DC-SIGNR sobre un soporte sólido;

(b) poner en contacto la proteína DC-SIGNR inmovilizada con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC para saturar todos o una parte de los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC en la proteína DC-SIGNR inmovilizada para formar un complejo;

60 (c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

(d) poner en contacto el complejo con una muestra adecuada obtenida a partir del sujeto;

65 (e) retirar la muestra no unida; y

(f) determinar si hay anticuerpo unido a la glicoproteína de la envuelta de VHC, donde la presencia de anticuerpos anti-VHC diagnostica la infección del sujeto por VHC.

Esta invención describe un método para diagnosticar la infección de un sujeto por VHC, que comprende:

(a) poner en contacto la proteína DC-SIGN con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC para saturar todos o una parte de los sitios de unión de la glicoproteína de la envuelta de VHC en la proteína DC-SIGN para formar un complejo;

(b) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

(c) poner en contacto el complejo con una muestra adecuada obtenida a partir del sujeto;

(d) retirar la muestra no unida; y

(e) determinar si hay anticuerpo unido a la glicoproteína de la envuelta de VHC, donde la presencia de anticuerpos anti-VHC diagnostica de este modo la infección del sujeto por VHC.

Esta invención describe un método para diagnosticar la infección de un sujeto por VHC, que comprende:

(a) poner en contacto la proteína DC-SIGNR con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC para saturar todos o una parte de los sitios de unión de la glicoproteína de la envuelta de VHC en la proteína DC-SIGNR para formar un complejo;

(b) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

(c) poner en contacto el complejo con una muestra adecuada obtenida a partir del sujeto;

(d) retirar la muestra no unida; y

(e) determinar si hay anticuerpo unido a la glicoproteína de la envuelta de VHC, donde la presencia de anticuerpos anti-VHC diagnostica la infección del sujeto por VHC.

Esta invención describe un anticuerpo o una parte del mismo capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho anticuerpo a un epítipo localizado dentro de una región de la proteína DC-SIGN, uniéndose dicha región de la proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC. En una realización, el anticuerpo no inhibe la unión de VHC a una proteína DC-SIGNR. En otra realización, el anticuerpo no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el anticuerpo no bloquea la adhesión de ICAM.

Esta invención describe un anticuerpo o una parte del mismo capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho anticuerpo a un epítipo localizado dentro de una región de la proteína DC-SIGNR, uniéndose dicha región de la proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC. En una realización, el anticuerpo no inhibe la unión de VHC a una proteína DC-SIGN. En otra realización, el anticuerpo no inhibe la infección por VHC de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el anticuerpo no bloquea la adhesión de ICAM.

Esta invención describe un anticuerpo o una parte del mismo capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho anticuerpo a un epítipo localizado dentro de una región de la glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha región de la glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN. En una realización, el anticuerpo no inhibe la unión de VHC a una proteína DC-SIGNR. En otra realización, el anticuerpo no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el anticuerpo no bloquea la adhesión de ICAM.

Esta invención describe un anticuerpo o una parte del mismo capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho anticuerpo a un epítipo localizado dentro de una región de la glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha región de la glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGNR. En una realización, el anticuerpo no inhibe la unión de VHC a una proteína DC-SIGN. En otra realización, el anticuerpo no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el anticuerpo no bloquea la adhesión de ICAM.

Esta invención describe un polipéptido capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, comprendiendo dicho polipéptido aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una proteína DC-SIGN, uniéndose dicha parte a una glicoproteína de la envuelta de VHC. En una realización, el polipéptido no se une a una glicoproteína de la envuelta de VIH. En otra realización, el polipéptido no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el polipéptido no bloquea la adhesión de ICAM.

Esta invención describe un polipéptido capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, comprendiendo dicho polipéptido aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que se corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una proteína DC-SIGNR, uniéndose

dicha parte a una glicoproteína de la envuelta de VHC. En una realización, el polipéptido no se une a una glicoproteína de la envuelta de VIH. En otra realización, el polipéptido no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a una infección por VIH. En una realización adicional, el polipéptido no bloquea la adhesión de ICAM.

5 Esta invención describe un polipéptido capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, comprendiendo dicho polipéptido aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGN.

10 Esta invención describe un polipéptido capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, comprendiendo dicho polipéptido aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGNR.

15 Esta invención describe un agente no peptídico capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho agente no peptídico a un epítipo localizado dentro de una región de la proteína DC-SIGN, uniéndose dicha región de la proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC. En una realización, el agente no peptídico no inhibe la unión de VHC a una proteína DC-SIGNR. En otra realización, el agente no peptídico no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el agente no peptídico no bloquea la adhesión de ICAM.

20 Esta invención describe un agente no peptídico capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho agente no peptídico a un epítipo localizado dentro de una región de la proteína DC-SIGNR, uniéndose dicha región de la proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC. En una realización, el agente no peptídico no inhibe la unión de VHC a una proteína DC-SIGN. En otra realización, el agente no peptídico no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el agente no peptídico no bloquea la adhesión de ICAM.

25 Esta invención describe un agente no peptídico capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho agente no peptídico a al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGN. En una realización, el agente no peptídico no inhibe la unión de VHC a una proteína DC-SIGNR. En otra realización, el agente no peptídico no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el agente no peptídico no bloquea la adhesión de ICAM.

30 Esta invención describe un agente no peptídico capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho agente no peptídico a al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGNR. En una realización, el agente no peptídico no inhibe la unión de VHC a una proteína DC-SIGN. En otra realización, el agente no peptídico no inhibe la infección por VIH de una célula susceptible a la infección por VIH. En una realización adicional, el agente no peptídico no bloquea la adhesión de ICAM.

35 Esta invención describe una composición que comprende un anticuerpo o una parte del mismo, un polipéptido y/o un agente no peptídico descrito en este documento y un vehículo. En una realización, la composición comprende adicionalmente manano, un quelante de calcio o combinaciones de los mismos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

50 Secuencia de aminoácidos de DC-SIGN de *homo sapiens* como se expone en el Genbank N° AAK20997 (SEC ID N° 1).

Figura 2

55 Secuencia de aminoácidos de DC-SIGNR de *homo sapiens* como se expone en el Genbank N° AAG13848 (SEC ID N° 2).

Figura 3

60 Secuencia de aminoácidos de gen de la poliproteína del virus de la hepatitis C como se expone en el Genbank N° AF009606 (SEC ID N° 3).

Figura 4

65 Caracterización de las líneas celulares HeLa-DC-SIGN y HeLa-DC-SIGN-R usando anticuerpos específicos para DC-SIGN (507(D)), DC-SIGN-R (604(L)) o ambas moléculas (612(X)).

Figura 5

Los transfectantes de DC-SIGN y DC-SIGNR se unen a E2 de VHC. Se dejó que células (A) HeLa-DC-SIGN, (B) HeLa-DC-SIGNR y (C) células HeLa parentales se unieran a perlas recubiertas con E2 de VHC que se prepararon por conjugación por un panel de mAb anti-E2. La adhesión se cuantificó por análisis FACS y se bloqueó por manano (20 $\mu\text{g/ml}$), y se muestra un experimento representativo de tres.

Figura 6

Efecto de mAb sobre la adhesión de E2 de VHC a DC-SIGN o DC-SIGNR. Se incubaron células HeLa que expresaban DC-SIGN o DC-SIGNR con mAb o manano como se ha descrito, y se añadieron perlas de E2 conjugada con H53 con una proporción entre perla y célula de 20:1. La unión se cuantificó por fluorescencia usando una máquina FACSscan y los resultados se normalizaron con respecto a los niveles de control (IgG2a).

15 Descripción detallada de la invención

Esta invención describe un método para inhibir la infección por VHC de una célula susceptible a la infección por VHC que comprende poner en contacto la célula con una cantidad de un compuesto eficaz para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN presente en la superficie de la célula, para inhibir de este modo la infección por VHC de la célula susceptible a la infección por VHC. Esta invención proporciona un método para inhibir la infección por VHC de una célula susceptible a la infección por VHC que comprende poner en contacto la célula con una cantidad de un compuesto eficaz para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGNR presente en la superficie de la célula, para inhibir de este modo la infección por VHC de la célula susceptible a la infección por VHC.

Las células que son susceptibles a la infección por VHC pueden unirse al virus a través de moléculas DC-SIGN y/o DC-SIGNR. Además, las células que no son susceptibles a la infección por VHC pueden unirse al virus a través de moléculas DC-SIGN y/o DC-SIGNR. Después, el virus unido se transmite a una segunda célula diana susceptible en trans. En consecuencia, esta invención proporciona un método para inhibir la unión inicial de virus a una célula no susceptible que expresa DC-SIGN y/o DC-SIGNR y, después, esto tiene como resultado la prevención de la infección posterior de la célula diana susceptible. Esta invención describe un método para inhibir la infección por VHC de una célula diana cuya susceptibilidad a la infección por VHC aumenta cuando el VHC se une a una segunda célula que es una célula que expresa la proteína DC-SIGN, comprendiendo dicho método poner en contacto la célula que expresa la proteína DC-SIGN con una cantidad de un compuesto eficaz para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN, para inhibir de este modo la infección por VHC de la célula diana. Esta invención proporciona un método para inhibir la infección por VHC de una célula diana cuya susceptibilidad a la infección por VHC aumenta cuando el VHC se une a una segunda célula que es una célula que expresa la proteína DC-SIGNR, comprendiendo dicho método poner en contacto la célula que expresa la proteína DC-SIGNR con una cantidad de un compuesto eficaz para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN, para inhibir de este modo la infección por VHC de la célula diana.

Esta invención describe un método para inhibir la infección por VHC de una célula diana que no expresa un receptor DC-SIGN y/o DC-SIGNR sobre su superficie, que comprende poner en contacto una segunda célula que expresa un receptor de DC-SIGN y/o DC-SIGNR sobre su superficie con una cantidad de un compuesto descrito en ese documento eficaz para inhibir la unión de VHC al receptor de DC-SIGN y/o DC-SIGNR para inhibir de este modo la infección por VHC de la primera célula diana en trans. En una realización de este método, la célula diana está presente en un sujeto y la puesta en contacto se realiza administrando el compuesto al sujeto. En una realización, la célula diana que no expresa el receptor de DC-SIGN y/o DC-SIGNR y la segunda célula que expresa el receptor de DC-SIGN y/o DC-SIGNR están próximas. En una realización, la célula diana y la segunda célula están adyacentes. En otra realización, la célula diana y la segunda célula no están próximas. En una realización, la célula diana y la segunda célula están separadas por una distancia de menos de 1 Å, están separadas por una distancia de al menos 1 Å, de al menos 10 Å, de al menos 100 Å, de al menos 1 nm, de al menos 10 nm, de al menos 100 nm, de al menos 1 μm , de al menos 10 μm , de al menos 100 μm , de al menos 1 mm, de al menos 1 cm, de al menos 10 cm, de al menos 100 cm o de al menos 1 metro.

Como se usa en este documento, "VHC" significa el virus de la hepatitis C. El VHC incluye, pero sin limitación, partículas de virus extracelulares y las formas de VHC asociadas a y/o encontradas en células infectadas por VHC. Como se usa en este documento, una "célula que expresa una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre su superficie" también se puede denominar "célula de glicoproteína de la envuelta de VHC". Como se usa en este documento, la "infección por VHC" significa la introducción de información genética de VHC en una célula diana, tal como por fusión de la membrana de la célula diana con VHC o una célula de glicoproteína de la envuelta de VHC. La célula diana puede ser una célula corporal de un sujeto. En una realización, la célula diana es una célula corporal de un sujeto, tal como de un sujeto humano. Como se usa en este documento, la "inhibición de la infección por VHC" significa la disminución de la cantidad de información genética de VHC introducida en una población de células diana en comparación con la cantidad que se introduciría sin, por ejemplo, un agente inhibidor. Como se usa en este documento, "inhibir" significa que la cantidad disminuye en comparación con la cantidad que aparecería en una muestra de control. Por ejemplo, una muestra de control puede ser una que no contenga el agente inhibidor y, por lo tanto, en la que no habría inhibición de la infección por VHC. En una realización preferida, inhibir significa que

la cantidad disminuye un 100%. Como se usa en este documento, “fusión” significa la asociación o unión de las membranas de la bicapa lipídica que se encuentran en células de mamífero o en virus tales como el VHC. Este proceso se diferencia de la unión de VHC a una célula diana. La unión está medida por la unión de la glicoproteína exterior de VHC a un ligando presente en la superficie de una célula susceptible a la infección por VHC. Como se usa en este documento, tal ligando incluye DC-SIGN y/o DC-SIGNR. Como se usa en este documento, la fusión de la membrana celular de la célula susceptible a la infección por VHC con la membrana celular con glicoproteína de envuelta de VHC significa la asociación hidrofóbica y la integración de la membrana celular de la célula susceptible a la infección con la célula con glicoproteína de la envuelta de VHC para formar una membrana híbrida que comprende componentes de las dos membranas celulares. Como se usa en ese documento, “unión” significa el proceso que está mediado por la unión de la glicoproteína de la envuelta de VHC a un ligando presente en la superficie de una célula susceptible a la infección por VHC. Como se usa en este documento, la “inhibición de la fusión de una célula con glicoproteína de la envuelta de VHC con una célula susceptible a la infección por VHC, significa (a) la disminución de la proporción de fusión de la membrana celular de una célula susceptible a la infección por VHC con una membrana celular de una célula con glicoproteína de la envuelta de VHC en al menos un 5%, o (b) la disminución en al menos un 5% de la cantidad total de fusión de una membrana celular de una célula susceptible a la infección por VHC con una membrana celular con glicoproteína de la envuelta de VHC que tiene lugar en el punto final de la fusión. Como se usa en este documento, la proporción de fusión de la membrana celular significa la cantidad total de membrana celular fusionada por unidad de tiempo. Como se usa en este documento, el “punto final de la fusión” significa el punto en el tiempo en el que se ha producido toda la fusión que se podría producir de las membranas celulares de células susceptibles a la infección por VHC con membrana celular de glicoproteína de la envuelta de VHC. Como se usa en este documento, una “célula susceptible a la infección por VHC” también se puede denominar “célula diana” e incluye células que pueden infectarse por o fusionarse con VHC o con células infectadas por VHC. Como se usa en este documento, la palabra “célula” incluye una célula biológica, por ejemplo, una célula HeLa, y una célula no biológica, por ejemplo una vesícula lipídica (por ejemplo, una vesícula fosfolipídica) o virión.

En una realización de los métodos descritos en ese documento, el compuesto es un anticuerpo o una parte de un anticuerpo. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una parte Fab del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una parte F(ab')₂ del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una parte Fd del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una parte Fv del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende uno o más dominios de CDR del anticuerpo.

En una realización de los métodos descritos en este documento, el compuesto es un polipéptido. En una realización, el compuesto es un péptido. En una realización, el compuesto es un oligopéptido.

En una realización de los métodos descritos en este documento, el compuesto es un agente no peptídico. En una realización, el agente no peptídico es un carbohidrato. Tal carbohidrato puede ser cualquier carbohidrato conocido por los especialistas en la técnica incluyendo, pero sin limitación manosa, manano o metil- α -D-manopiranosido. En una realización de los métodos descritos en este documento, el compuesto es una molécula pequeña o molécula de bajo peso molecular. En una realización, el compuesto tiene un peso molecular menor de 500 daltons.

En una realización de los métodos descritos en este documento, la glicoproteína de la envuelta de VHC es una glicoproteína de la envuelta E1 de VHC. En una realización de los métodos descritos en este documento, la glicoproteína de la envuelta de VHC es una glicoproteína de la envuelta E2 de VHC.

En una realización de los métodos descritos en ese documento, la célula está presente en un sujeto y la puesta en contacto se realiza administrando el agente al sujeto. En consecuencia, la presente invención tiene diversas aplicaciones que incluyen el tratamiento de VHC, tal como el tratamiento de un sujeto afectado por VHC. Como se usa en ese documento, “afectado por VHC” significa que el sujeto tiene al menos una célula que se ha infectado por VHC. Como se usa en este documento, “tratamiento” significa la ralentización, detención o inversión de la progresión de un trastorno producido por VHC. En la realización preferida, “tratamiento” se refiere a la inversión de la progresión hasta el punto de eliminar el trastorno. Como se usa en este documento, “tratamiento” también significa la disminución del número de infecciones virales, la disminución del número de partículas virales infecciosas, la disminución del número de células infectadas por el virus o la disminución de los síntomas asociados a VHC. Otra aplicación de la presente invención es evitar que un sujeto contraiga el VHC. Como se usa en este documento, “contraer el VHC” significa infectarse por VHC, cuya información genética se replica en y/o se incorpora en las células hospedadoras. Otra aplicación de la presente invención es tratar a un sujeto que se ha infectado por VHC. Como se usa en este documento, “infección por VHC” significa la introducción de la información genética de VHC en una célula diana, tal como por fusión de la membrana de la célula diana con VHC o una célula con glicoproteína de la envuelta de VHC. La célula diana puede ser una célula corporal de un sujeto. En la realización preferida, la célula diana es una célula corporal de un sujeto humano. Otra aplicación de la presente invención es inhibir la infección por VHC. Como se usa en este documento, “inhibir la infección por VHC” significa reducir la cantidad de información genética de VHC introducida en una población de células diana en comparación con la cantidad que se introduciría sin dicha composición.

En cuanto a la cantidad del compuesto y/o agente para la administración al sujeto, un especialista en la técnica sabría cómo determinar la cantidad apropiada. Como se usa en este documento, una dosis o cantidad sería una en cantidades suficientes para inhibir la infección por VHC, tratar la infección por VHC, tratar al sujeto o evitar que el sujeto se infecte por VHC. Esta cantidad se puede considerar una cantidad eficaz. Un especialista en la técnica podría realizar experimentos de titulación sencillos para determinar la cantidad que se requiere para tratar al sujeto. La dosis de la composición de la invención variará dependiendo del sujeto y de la vía de administración particular usada. En una realización, la dosificación puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal del sujeto. Basándose en la composición, la dosis se puede suministrar de forma continua, tal como por medio de una bomba continua o a intervalos periódicos. Por ejemplo, en una o más ocasiones distintas. Un especialista en la técnica puede determinar los intervalos de tiempo deseados de dosis múltiples de una composición particular sin experimentación indebida.

En una realización de los métodos descritos en este documento, la cantidad eficaz del compuesto está comprendida entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal del sujeto. En una realización, la cantidad eficaz del compuesto está comprendida entre aproximadamente 2 mg y aproximadamente 40 mg por kg de peso corporal del sujeto. En una realización, la cantidad eficaz del compuesto está comprendida entre aproximadamente 3 mg y aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal del sujeto. En una realización, la cantidad eficaz del compuesto está comprendida entre aproximadamente 4 mg y aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal del sujeto. En una realización, la cantidad eficaz del compuesto está comprendida entre aproximadamente 5 mg y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal del sujeto. La cantidad eficaz del compuesto puede comprender de aproximadamente 0,000001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En una realización, la cantidad eficaz puede comprender de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En otra realización, la cantidad eficaz puede variar de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. La cantidad eficaz se puede basar, entre otras cosas, en el tamaño del compuesto, la biodegradabilidad del compuesto, la bioactividad del compuesto y la biodisponibilidad del compuesto. Si el compuesto no se degrada rápidamente, está biodisponible y es muy activo, se requerirá una menor cantidad para conseguir eficacia. El especialista en la técnica conocerá la cantidad eficaz; y esta cantidad también dependerá de la forma del compuesto, el tamaño del compuesto y la bioactividad del compuesto. Un especialista en la técnica podría realizar de forma rutinaria ensayos empíricos de actividad para un compuesto para determinar la bioactividad en bioensayos y determinar, de esta manera, la cantidad eficaz. En una realización de los anteriores métodos, la cantidad eficaz del compuesto comprende de aproximadamente 1,0 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. En otra realización de los anteriores métodos, la cantidad eficaz del compuesto comprende de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del sujeto. En otra realización de los anteriores métodos, la cantidad eficaz del compuesto comprende de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del sujeto. En otra realización de los anteriores métodos, la cantidad eficaz del compuesto comprende de aproximadamente 100 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del sujeto.

Por lo que respecta a cuando se tiene que administrar el compuesto y/o agente, un especialista en la técnica puede determinar cuando administrar dicho compuesto y/o agente. La administración puede ser constante durante un cierto periodo de tiempo o periódica y a intervalos específicos. El compuesto se puede suministrar cada hora, diariamente, semanalmente, cada mes, anualmente (por ejemplo, en una forma de liberación temporal) o como un solo suministro. El suministro puede ser un suministro continuo durante un periodo de tiempo, por ejemplo, suministro intravenoso. En una realización de los métodos que se describen en este documento, el agente se administra al menos una vez al día. En una realización de los métodos descritos en este documento, el agente se administra diariamente. En una realización de los métodos descritos en este documento, el agente se administra un día sí y otro no. En una realización de los métodos descritos en este documento, el agente se administra cada 6 a 8 días. En una realización de los métodos descritos en este documento, el agente se administra semanalmente.

Como se usa en este documento, “sujeto” significa cualquier animal o animal modificado artificialmente que puede infectarse por VHC. Los sujetos incluyen, pero sin limitación, un ser humano, un primate, un equino, un ovino, un ave, un bovino, un porcino, un canino, un felino o un ratón. Los animales modificados artificialmente incluyen, pero sin limitación, ratones SCID con sistemas inmunes humanos. Los animales incluyen, pero sin limitación, ratones, ratas, perros, cobayas, hurones, conejos y primates. En la realización preferida, el sujeto es un ser humano. El sujeto puede ser un “sujeto infectado por VHC” que es un sujeto que tiene al menos una de sus propias células invadidas por VHC. En la realización preferida, el sujeto infectado por VHC es un ser humano. El sujeto puede ser un “sujeto no infectado por VHC” que es un sujeto que no tiene ninguna de sus propias células invadida por VHC. En la realización preferida, el sujeto no infectado por VHC es un ser humano.

Como se usa en este documento, la “administración” se puede efectuar o realizar usando cualquiera de los métodos conocidos por los especialistas en la técnica. El compuesto se puede administrar por diversas vías incluyendo, pero sin limitación, por medio de un aerosol, por vía intravenosa, oral o tópica. La administración puede comprender la inyección intralesional, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intravenosa; infusión, suministro mediado por liposomas; suministro tópico, intratecal, en bolsa gingival, a través del recto, intrabronquial, nasal, a través de la mucosa, intestinal, oral, ocular u ótico. En una realización adicional, la administración incluye la administración intrabronquial, anal, administración intratecal o suministro transdérmico. Los compuestos y/o agentes de la presente invención se pueden suministrar localmente por medio de una cápsula que permite la liberación sostenida del agente o del péptido durante un periodo de tiempo. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en formulaciones lipófilas de liberación prolongada (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). La invención

también incluye composiciones en forma de partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el agente acoplado a anticuerpos dirigidos contra receptores con especificidad de tejido, ligandos o antígenos o acoplados a ligandos de receptores con especificidad de tejido. Otras realizaciones de las composiciones de la invención incorporan formulaciones en forma de partículas, recubrimientos protectores, inhibidores de proteasa o potenciadores de la infiltración para diversas vías de administración, incluyendo la vía parenteral, pulmonar, nasal y oral.

El vehículo puede ser un diluyente, un aerosol, un vehículo tópico, una solución acuosa, una solución no acuosa o un vehículo sólido.

Esta invención proporciona un método para inhibir la infección por VHC de células de un sujeto susceptibles a la infección por VHC mediante un método descrito en este documento. Esta invención proporciona un método para inhibir la infección por VHC de células de un sujeto susceptibles a la infección por VHC mediante un método descrito en este documento. Esta invención proporciona el uso de un compuesto para la preparación de un medicamento para evitar que una célula o células de un sujeto se infecten por VHC, estando dicho compuesto en una cantidad eficaz para inhibir la unión del VHC a los receptores de DC-SIGN y/o DC-SIGNR en la superficie de las células del sujeto para evitar de este modo que la célula o las células del sujeto se infecten por VHC. Esta invención proporciona el uso de un compuesto descrito en este documento para la preparación de un medicamento en una cantidad eficaz para inhibir la unión de VHC a receptores de DC-SIGN y/o DC-SIGNR en la superficie de las células del sujeto. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un ratón SCID-BNX (Galun *et al.*, J. Inf. Dis. 172: 25, 1995).

En una realización de los anteriores métodos, el sujeto se infecta por VHC antes de la administración del compuesto al sujeto. En una realización de los anteriores métodos, el sujeto no se infecta por VHC antes de la administración del compuesto al sujeto. En una realización de los anteriores métodos, el sujeto no se infecta con VHC, pero ha estado expuesto a dicho virus.

En una realización de los métodos descritos en este documento, la célula susceptible a la infección por VHC es una célula primaria. En una realización, la célula es una célula dendrítica, célula placentaria o célula endometrial. En una realización, la célula es una célula hepática, célula de ganglio linfático, célula endometrial en el hígado o célula placentaria. En una realización de los métodos descritos en este documento, la célula susceptible a la infección por VHC es una célula eucariota. En una realización de los métodos descritos en este documento, la célula susceptible a la infección por VHC es una célula humana. En una realización de los métodos descritos en este documento, la célula susceptible a la infección por VHC es una célula mononuclear de sangre periférica. En una realización de los métodos descritos en este documento, la célula susceptible a la infección por VHC es una célula HeLa. En una realización de los métodos descritos en este documento, la célula susceptible a la infección por VHC es una célula hepática. Una célula hepática puede incluir, pero sin limitación, una célula HepG2, una célula SK-HEP1, una célula C3A o una célula Huh-7. En una realización, la célula hepática es una célula hepática primaria.

Esta invención proporciona el uso de un compuesto que es un agente o composición descrito en ese documento. En una realización, el agente o la composición pueden ser suficientes para reducir la carga viral del sujeto. Como se usa en este documento, "tratamiento" significa la ralentización, detención o inversión de la progresión de un trastorno por VHC. En la realización preferida, "tratamiento" significa la inversión de la progresión hasta el punto de eliminar el trastorno. Como se usa en este documento, "tratamiento" también significa la reducción del número de infecciones virales, la reducción del número de partículas virales infecciosas, la reducción del número de células infectadas por el virus o la reducción de los síntomas asociados con VHC. Como se usa en este documento, "afectado por VHC" significa que el sujeto tiene al menos una célula que se ha infectado por VHC.

Esta invención proporciona el uso de un agente o una composición descrita en este documento para la preparación de un medicamento donde el agente o la composición están en una dosis eficaz para evitar que un sujeto contraiga VHC.

Esta invención proporciona el uso de un compuesto y/o agente descrito en este documento, tal como un anticuerpo o una parte del mismo, péptido, polipéptido u oligopéptido, o un agente no peptídico, para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la infección por VHC en una célula susceptible a la infección por VHC. Esta invención proporciona el uso de un compuesto y/o agente descrito en este documento, tal como un anticuerpo o una parte del mismo, péptido, polipéptido u oligopéptido, o un agente no peptídico, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar la infección por VHC en un sujeto. Esta invención proporciona el uso de un compuesto y/o agente descrito en este documento, tal como un anticuerpo o una parte del mismo, péptido, polipéptido u oligopéptido, o un agente no peptídico, para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir la infección por VHC en un sujeto.

Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido,

b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con suficiente proteína DC-SIGN detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGN en la glicoproteína de la envuelta de VHC

inmovilizada en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada para formar un complejo;

c) retirar la proteína DC-SIGN no unida;

d) poner en contacto el complejo con el compuesto; y

e) determinar si se ha desplazado alguna proteína DC-SIGN del complejo, donde el desplazamiento de la proteína DC-SIGN del complejo indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido,

b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con suficiente proteína DC-SIGNR detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGNR en la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada para formar un complejo;

c) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

d) poner en contacto el complejo con el compuesto; y

e) determinar si se ha desplazado alguna proteína DC-SIGNR del complejo, donde el desplazamiento de la proteína DC-SIGNR del complejo indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

a) inmovilizar una proteína DC-SIGN sobre un soporte sólido,

b) poner en contacto la proteína DC-SIGN inmovilizada con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC detectable para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC en la proteína DC-SIGN inmovilizada en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

d) poner en contacto el complejo con el compuesto;

e) determinar si se ha desplazado alguna glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo, donde el desplazamiento de la glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo indica que el compuesto se une a la proteína DC-SIGN, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

a) inmovilizar una proteína DC-SIGNR sobre un soporte sólido,

b) poner en contacto la proteína DC-SIGNR inmovilizada con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC detectable para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC en la proteína DC-SIGNR inmovilizada en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

d) poner en contacto el complejo con el compuesto;

e) determinar si se ha desplazado alguna glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo, donde el desplazamiento de la glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo indica que el compuesto se une a la proteína DC-SIGNR, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

ES 2 296 985 T3

Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

- 5 a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con suficiente proteína DC-SIGN detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGN en la glicoproteína de la envuelta de VHC en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;
- 10 b) retirar la proteína DC-SIGN no unida;
- c) medir la cantidad de proteína DC-SIGN que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo.
- d) poner en contacto el complejo con el compuesto para desplazar la proteína DC-SIGN del complejo;
- 15 (e) medir la cantidad de proteína DC-SIGN que está unida al compuesto en presencia del compuesto; y
- (f) comparar la cantidad de proteína DC-SIGN unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en la etapa (e) con la cantidad medida en la etapa (c), donde una cantidad reducida medida en la etapa (e) indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de
- 20 inhibir la infección por VHC de la célula.

Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

- 25 a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con suficiente proteína DC-SIGNR detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGNR en la glicoproteína de la envuelta de VHC en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;
- 30 b) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;
- c) medir la cantidad de proteína DC-SIGNR que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo.
- d) poner en contacto el complejo con el compuesto para desplazar la proteína DC-SIGNR del complejo;
- 35 (e) medir la cantidad de proteína DC-SIGNR que está unida al compuesto en presencia del compuesto;
- (f) comparar la cantidad de proteína DC-SIGNR unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en la etapa (e) con la cantidad medida en la etapa (c), donde una cantidad reducida medida en la etapa (e) indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC para identificar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de
- 40 inhibir la infección por VHC de la célula.

Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

- 45 (a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;
- (b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con el compuesto y la proteína DC-SIGN detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada para formar un complejo;
- 50 (c) retirar la proteína DC-SIGN no unida;
- (d) comparar la cantidad de proteína DC-SIGN detectable que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGN detectable que se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en ausencia del compuesto;
- 55 (e) donde una cantidad reducida de proteína DC-SIGN medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGN, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.
- 60

En una realización de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la DC-SIGN detectable es suficiente para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGN en la glicoproteína de la envuelta de VHC.

Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

- 65 (a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;

(b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con el compuesto y la proteína DC-SIGNR detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada para formar complejo;

5 (c) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

(d) comparar la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en ausencia del compuesto;

10 (e) donde una cantidad reducida de proteína DC-SIGNR medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o la proteína DC-SIGNR, para determinar de este modo si el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

15 En una realización de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la DC-SIGNR detectable es suficiente para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGNR en la glicoproteína de la envuelta de VHC.

Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

20 (a) inmovilizar una proteína DC-SIGN sobre un soporte sólido;

(b) poner en contacto la proteína DC-SIGN inmovilizada con el compuesto y la glicoproteína de la envuelta de VHC detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

25 (c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

(d) comparar la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC detectable que está unida a la proteína DC-SIGN inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC detectable que se une a la proteína DC-SIGN inmovilizada en ausencia del compuesto;

30 (e) donde una cantidad reducida de glicoproteína de la envuelta de VHC medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGN, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

35 En una realización de los métodos descritos en ese documento, la cantidad de la glicoproteína de la envuelta de VHC detectable es suficiente para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC o la proteína DC-SIGN.

40 Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

(a) inmovilizar una proteína DC-SIGNR sobre un soporte sólido;

45 (b) poner en contacto la proteína DC-SIGNR inmovilizada con el compuesto y la glicoproteína de la envuelta de VHC detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

(c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

50 (d) comparar la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC detectable que está unida a la proteína DC-SIGNR inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC detectable que se une a la proteína DC-SIGNR inmovilizada en ausencia del compuesto;

55 (e) donde una cantidad reducida de glicoproteína de la envuelta de VHC medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGNR, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

60 En una realización de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la glicoproteína de la envuelta de VHC detectable es suficiente para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC en la proteína DC-SIGNR.

Esta invención describe un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC en una célula, que comprende:

65 (a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con el compuesto y la proteína DC-SIGN detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

(b) retirar la proteína DC-SIGN no unida;

(c) comparar la cantidad de proteína DC-SIGN detectable que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGN detectable que se une al compuesto en ausencia del compuesto;

donde una cantidad reducida de proteína DC-SIGN medida en presencia del compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGN, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

En una realización de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la proteína DC-SIGN detectable es suficiente para saturar todos los sitios de unión para proteína DC-SIGN en la glicoproteína de la envuelta de VHC.

Esta invención proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

(a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con el compuesto y la proteína DC-SIGNR detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

(b) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

(c) comparar la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que se une al compuesto en ausencia del compuesto;

donde una cantidad reducida de proteína DC-SIGNR medida en presencia de un compuesto indica que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGNR, para determinar de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

En una realización de los métodos descritos en este documento, la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable es suficiente para saturar todos los sitios de unión de la proteína DC-SIGNR en la glicoproteína de la envuelta de VHC.

En los métodos descritos en este documento, una entidad puede volverse detectable marcándola con marcador detectable. Por ejemplo, en una realización de los métodos descritos en este documento, la proteína DC-SIGN detectable está marcada con un marcador detectable. En una realización de los métodos descritos en este documento, la proteína DC-SIGNR detectable está marcada con un marcador detectable. En una realización de los métodos descritos en este documento, la glicoproteína de la envuelta de VHC detectable está marcada con un marcador detectable. Un especialista en la técnica conocerá diversos tipos de marcadores detectables. Tales marcadores detectables incluyen, pero sin limitación, marcadores radiactivos, colorimétricos, luminiscentes y fluorescentes.

Esta invención describe un método para identificar a un agente que inhibe la unión de VHC a DC-SIGN, que comprende:

(a) inmovilizar una o las dos glicoproteínas de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;

(b) poner en contacto el resultado de la etapa (a) con el agente;

(c) poner en contacto el resultado de la etapa (c) con una forma detectable de proteína DC-SIGN en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGN detectable en ausencia del compuesto;

(d) detectar la cantidad de la proteína DC-SIGN detectable unida, donde una reducción de la cantidad de proteína DC-SIGN detectable unida en comparación con la cantidad unida en ausencia del agente identifica de este modo al agente como un agente que inhibe la unión de VHC a la proteína DC-SIGN.

Esta invención describe un método para identificar a un agente que inhibe la unión de VHC a DC-SIGNR, que comprende:

(a) inmovilizar una o las dos glicoproteínas de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;

(b) poner en contacto el resultado de la etapa (a) con el agente;

(c) poner en contacto el resultado de la etapa (c) con una forma detectable de proteína DC-SIGNR en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR detectable en ausencia del compuesto;

(d) detectar la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable unida, donde una reducción de la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable unida en comparación con la cantidad unida en ausencia del agente identifica de este modo al agente como un agente que inhibe la unión de VHC a la proteína DC-SIGNR.

Esta invención describe un método para identificar un agente que inhibe la unión de VHC a DC-SIGN, que comprende:

(a) inmovilizar la proteína DC-SIGN sobre un soporte sólido;

(b) poner en contacto el resultado de la etapa (a) con el agente;

(c) poner en contacto el resultado de la etapa (b) con una forma detectable de una o más de las glicoproteínas de la envuelta de VHC en condiciones que permitan la unión de la glicoproteína o las glicoproteínas de la envuelta de VHC detectables en ausencia del compuesto;

(d) detectar la cantidad de glicoproteína(s) de la envuelta de VHC detectable(s), donde una reducción de la cantidad de glicoproteínas(s) de la envuelta de VHC detectable(s) unida(s) en comparación con la cantidad unida en ausencia del agente identifica de este modo al agente como un agente que inhibe la unión de VHC a la proteína DC-SIGN.

Esta invención describe un método para identificar un agente que inhibe la unión de VHC a DC-SIGNR, que comprende:

(a) inmovilizar una proteína DC-SIGNR sobre un soporte sólido;

(b) poner en contacto el resultado de la etapa (a) con el agente;

(c) poner en contacto el resultado de la etapa (c) con una forma detectable de una o más de las glicoproteínas de la envuelta de VHC en condiciones que permitan la unión de la glicoproteína o las glicoproteínas de la envuelta de VHC detectables en ausencia del compuesto;

(d) detectar la cantidad de glicoproteína(s) de la envuelta de VHC detectable(s) unida(s), donde una reducción de la cantidad de glicoproteínas(s) de la envuelta de VHC detectable(s) unida(s) en comparación con una cantidad unida en ausencia del agente identifica de este modo al agente como un agente que inhibe la unión de VHC a la proteína DC-SIGN.

En una realización del método descrito en este documento, el soporte sólido es un pocillo de placa de microtitulación. En otra realización, el soporte sólido es una perla. En una realización adicional, el soporte sólido es un chip sensor de resonancia de plasmón superficial. El chip sensor de resonancia de plasmón superficial puede tener estreptavidina pre-inmovilizada. En una realización, el chip sensor de resonancia de plasmón superficial es un chip BIAcore™.

En una realización de los anteriores métodos, la molécula detectable está marcada con un marcador detectable. En otra realización de los anteriores métodos, la molécula detectable se detecta poniéndola en contacto con otro compuesto que es capaz de unirse a la molécula detectable y además es detectable. Los marcadores detectables incluyen los descritos anteriormente.

Como se usa en este documento, los términos “agente” y “compuesto” incluyen restos proteicos y no proteicos. En una realización, el agente/compuesto es una molécula pequeña. En otra realización, el agente/compuesto es una proteína. La proteína puede ser, a modo de ejemplo, un anticuerpo dirigido contra una parte de una glicoproteína de la envuelta de VHC. El agente/compuesto puede derivar de una biblioteca de compuestos de bajo peso molecular o de una biblioteca de extractos de plantas u otros organismos. En una realización, el agente es conocido. En una realización separada, el agente/compuesto no se conoce previamente. Los agentes/compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, compuestos o entidades moleculares tales como péptidos, polipéptidos y otras moléculas orgánicas o inorgánicas, y combinaciones de las mismas.

Los compuestos de la presente invención inhiben la infección por VHC de células susceptibles a la infección por VHC. Los compuestos de la presente invención preferiblemente tienen especificidad para prevenir o inhibir la infección por VHC y no inhiben la infección por otros virus, tales como VIH, que pueden utilizar DC-SIGN o DC-SIGNR para la infección. Además, los compuestos de la presente invención preferiblemente no interfieren o inhiben miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, en particular, los compuestos no interfieren con ICAM-2 o ICAM-3 o con moléculas similares a ICAM-2 o similares a ICAM-3.

Como se usa en este documento, los términos “agente” y “compuesto” se pueden usar de forma indistinta. En una realización de los métodos descritos en este documento, el agente es un anticuerpo o una parte de un anticuerpo. En una realización del anticuerpo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización del anticuerpo, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En una realización del anticuerpo, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización del anticuerpo, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. La parte del anticuerpo puede comprender una cadena ligera del anticuerpo. La parte del anticuerpo puede comprender una cadena pesada del anticuerpo. La parte del anticuerpo puede comprender una parte Fab del anticuerpo. La parte del anticuerpo puede comprender una parte F (ab')₂ del anticuerpo. La parte del anticuerpo puede comprender una parte Fd del anticuerpo. La parte del anticuerpo puede comprender una parte Fv del anticuerpo. La parte del anticuerpo puede comprender un dominio variable del anticuerpo. La parte del anticuerpo puede comprender uno o más dominios CDR del anticuerpo.

En una realización de los métodos descritos en este documento, el agente es un polipéptido. En una realización de los métodos descritos en este documento, el agente es un oligopéptido. En una realización de los métodos descritos en este documento, el agente es un agente no peptídico. En una realización, el agente no peptídico es un compuesto que tiene un peso molecular menor de 500 daltons.

Esta invención describe un método para obtener una composición que comprende:

(a) identificar un compuesto que inhibe la infección por VHC de una célula de acuerdo con un método descrito en este documento; y

(b) mezclar el compuesto identificado de este modo o un homólogo o un derivado del mismo con un vehículo para obtener de este modo una composición.

Esta invención describe un método para obtener una composición que comprende:

(a) identificar un compuesto que inhibe la unión de VHC a DC-SIGN de acuerdo con uno de los métodos descritos en este documento; y

(b) mezclar el compuesto identificado de este modo o un homólogo o un derivado del mismo con un vehículo.

Esta invención describe un método para obtener una composición que comprende:

(a) identificar un compuesto que inhibe la unión de VHC a DC-SIGNR de acuerdo con uno de los anteriores métodos; y

(b) mezclar el compuesto identificado de este modo o un homólogo o derivado del mismo con un vehículo.

En una realización de estos métodos para obtener una composición, este método comprende adicionalmente recuperar el compuesto identificado antes de que se mezcle con el vehículo.

Esta invención describe un método para tratar o prevenir una enfermedad hepática en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto capaz de inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN presente en la superficie de las células del sujeto, para tratar o prevenir de este modo la enfermedad hepática en el sujeto. Esta invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad hepática en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto capaz de inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGNR presente en la superficie de las células del sujeto, para tratar o prevenir de este modo la enfermedad hepática en el sujeto. En una realización de los métodos descritos en este documento, la enfermedad hepática es hepatitis. En una realización de los métodos descritos en este documento, la enfermedad hepática es cirrosis.

Esta invención describe un método para tratar o prevenir el carcinoma hepatocelular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto a una cantidad eficaz de un compuesto capaz de inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN presente en la superficie de las células del sujeto, para tratar o prevenir de este modo el carcinoma hepatocelular en el sujeto. Esta invención proporciona un método para tratar o prevenir el carcinoma hepatocelular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en una cantidad eficaz de un compuesto capaz de inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGNR presente en la superficie de las células del sujeto, para tratar o prevenir de este modo el carcinoma hepatocelular en el sujeto.

Esta invención describe un método para diagnosticar la infección por VHC en un sujeto, que comprende:

(a) inmovilizar una proteína DC-SIGN sobre un soporte sólido;

(b) poner en contacto la proteína DC-SIGN inmovilizada con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC detectable para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC sobre la proteína DC-SIGN inmovilizada para formar un complejo;

(c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

(d) poner en contacto el complejo con una muestra adecuada obtenida del sujeto; y

(e) detectar si se ha desplazado alguna glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo, indicando el desplazamiento de la glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo la presencia de anticuerpos anti-VHC presentes en la muestra, para diagnosticar de este modo la infección por VHC del sujeto.

Esta invención describe un método para diagnosticar la infección por VHC de un sujeto, que comprende:

(a) inmovilizar una proteína DC-SIGNR sobre un soporte sólido;

(b) poner en contacto la proteína DC-SIGNR inmovilizada con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC detectable para saturar todos los sitios de unión a la glicoproteína de la envuelta de VHC sobre la proteína DC-SIGNR inmovilizada para formar un complejo;

5 (c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

(d) poner en contacto el complejo con una muestra adecuada obtenida del sujeto; y

10 (e) detectar si se ha desplazado alguna glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo; indicando el desplazamiento de la glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo la presencia de anticuerpos anti-VHC presentes en la muestra, para diagnosticar de este modo la infección por VHC del sujeto.

Esta invención describe un método para diagnosticar la infección por VHC de un sujeto, que comprende:

15 (a) poner en contacto la proteína DC-SIGN con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC detectable para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC en la proteína DC-SIGN para formar un complejo;

20 (b) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

(c) poner en contacto el complejo con una muestra adecuada obtenida del sujeto; y

(d) detectar si se ha desplazado alguna glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo, donde el desplazamiento de la glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo indica la presencia de anticuerpos anti-VHC presentes en la muestra, para diagnosticar de este modo la infección por VHC del sujeto.

Esta invención describe un método para diagnosticar la infección por VHC de un sujeto, que comprende:

30 (a) poner en contacto la proteína DC-SIGNR con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC detectable para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC en la proteína DC-SIGNR para formar un complejo;

(b) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

35 (c) poner en contacto el complejo con una muestra adecuada obtenida del sujeto; y

(d) detectar si se ha desplazado alguna glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo, indicando el desplazamiento de la glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo la presencia de anticuerpos anti-VHC presentes en la muestra, para diagnosticar de este modo la infección por VHC del sujeto.

40 La capacidad de una proteína DC-SIGN, una proteína DC-SIGNR o un equivalente funcional de las mismas para unirse a VHC permite el uso de la proteína como un diagnóstico para la infección por VHC, por ejemplo, en un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). En una realización, se podría usar una forma soluble de una proteína DC-SIGN y/o una proteína DC-SIGNR para detectar anticuerpos séricos contra VHC. En una realización preferida, la proteína DC-SIGN y/o la proteína DC-SIGNR o un equivalente funcional de las mismas se inmovilizan en un soporte sólido y entran en contacto con las glicoproteína o glicoproteínas de la envuelta de VHC, que puede ser una glicoproteína de la envuelta E1 de VHC, una glicoproteína de la envuelta E2 de VHC o ambas. La puesta en contacto puede tener lugar en presencia o ausencia de suero o de anticuerpos séricos. En un ensayo de esa forma, la unión competitiva entre los anticuerpos y la glicoproteína o glicoproteínas de VHC para la unión a la proteína inmovilizada, por lo tanto, hace que la proteína de VHC unida sea, más particularmente, una medida de los anticuerpos presentes en la muestra sérica. Después se detecta la cantidad de glicoproteína(s) de VHC unida(s). La glicoproteínas o las glicoproteínas de VHC se pueden marcar con un marcador radiactivo, enzimático, de biotina, fluorescente u otro marcador detectable para facilitar la detección.

55 Esta invención describe métodos para diagnosticar la infección por VHC en un sujeto empleando un método conocido por el especialista en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, un ensayo de tipo sándwich y un ensayo competitivo.

Por ejemplo, una realización de un ensayo de tipo sándwich es del siguiente modo:

60 (1) obtener una muestra adecuada de la proteína DC-SIGN y/o DC-SIGNR;

(2) poner en contacto la proteína DC-SIGN y/o DC-SIGNR con una glicoproteína de la envuelta de VHC, para formar un complejo;

65 (3) obtener una muestra adecuada del sujeto y poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC con la muestra, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre la glicoproteína de la envuelta de VHC y cualquier anticuerpo anti-glicoproteína de la envuelta de VHC presente en la muestra del sujeto;

(4) poner en contacto los anticuerpos anti-proteína de la envuelta de VHC unidos con anticuerpos anti-IgG humana detectable que se unirían a cualquier anticuerpo anti-glicoproteína de la envuelta de VHC unido; y

5 (5) detectar los anticuerpos anti-IgG humana, indicando la presencia de tales anticuerpos que el sujeto está infectado por VHC.

Por ejemplo, una realización de un ensayo competitivo es del siguiente modo:

10 (1) obtener una muestra adecuada de proteína DC-SIGN y/o DC-SIGNR;

(2) poner en contacto la proteína DC-SIGN y/o DC-SIGNR con una glicoproteína de la envuelta de VHC, para formar un complejo;

15 (3) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC con una muestra del sujeto, en condiciones que permitan la unión entre cualquier anticuerpo anti-VHC presente en la muestra y la glicoproteína de la envuelta de VHC;

20 (4) poner contacto también la glicoproteína de la envuelta de VHC con anticuerpos anti-glicoproteína de la envuelta de VHC detectables en condiciones que permitan la unión entre los anticuerpos anti-glicoproteína de la envuelta de VHC detectables y la glicoproteína de la envuelta de VHC; y

25 (5) determinar la cantidad de anticuerpos anti-glicoproteína de la envuelta de VHC detectables unidos, en comparación con la cantidad unida en ausencia de ninguna muestra del sujeto, indicando una cantidad aumentada medida en ausencia de la muestra que el sujeto está infectado por VHC.

30 En una realización de los métodos y ensayos descritos en este documento, la muestra del sujeto es una muestra sérica. En una realización, la proteína DC-SIGN y/o DC-SIGNR está inmovilizada. Los anteriores métodos pueden incluir etapas de lavado para eliminar los compuestos no unidos incluyendo, pero sin limitación, glicoproteína de la envuelta de VHC no unida, muestra del sujeto no unida, anticuerpos anti-glicoproteína de la envuelta de VHC no unidos y anticuerpos anti-IgG humana detectables no unidos. En una realización, los anticuerpos anti-IgG humana detectables se marcan con un marcador detectable. En una realización, los anticuerpos anti-envuelta de VHC detectables se marcan con un marcador detectable. En una realización, la cantidad de anticuerpos anti-IgG humana detectada se compara con una cantidad medida en ausencia de glicoproteínas de la envuelta de VHC para determinar una medida basal.

35 Esta invención describe un artículo de fabricación que comprende un soporte sólido que tiene, fijado de forma funcional al mismo, un agente capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC.

40 El soporte sólido puede ser cualquier soporte sólido conocido en la técnica al cual se puede fijar de forma funcional el agente. Los soportes sólidos incluyen, a modo de ejemplo, polímeros naturales o sintéticos. Los polímeros sintéticos incluyen, a modo de ejemplo, poliestireno, polietileno y polipropileno. Los polímeros naturales incluyen, a modo de ejemplo, látex. El soporte sólido se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo compuesto por una perla, un receptáculo y un filtro. Los soportes sólidos en forma de perlas se usan ampliamente y se pueden adquirir fácilmente por los 45 especialistas en la técnica. Las perlas incluyen, por ejemplo, perlas de látex y de poliestireno.

50 El receptáculo puede ser cualquier receptáculo en el que se almacene un fluido corporal o con el que entre el contacto dicho fluido. Por ejemplo, el receptáculo puede estar en la forma de una bolsa o un tubo. En la realización preferida, el receptáculo es una bolsa destinada específicamente a la recogida y/o el almacenamiento de sangre o componentes sanguíneos.

55 Los soportes sólidos en forma de filtro se usan ampliamente y se pueden adquirir fácilmente por los especialistas en la técnica. Los filtros incluyen, por ejemplo, filtros de poliéster (por ejemplo, dispositivos de leucofiltración de poliéster) y filtros de acetato de celulosa.

El agente fijado al soporte sólido puede ser una proteína o un agente no proteico. En una realización, el agente es DC-SIGN y/o DC-SIGNR. En una realización, el agente es un anticuerpo o una parte. Este anticuerpo puede ser uno que sea capaz de unirse a una glicoproteína de la envuelta de VHC.

60 Como se usa en este documento, “fijado de forma funcional” significa fijado de una manera que permite la formación de un complejo entre el agente fijado y el dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC. Los métodos para fijar de forma funcional un agente a un soporte sólido se conocen bien por los especialistas en la técnica.

65 Como se usa en este documento, “capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC” significa capaz de formar un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, pero incapaz de formar un complejo con cualquier otro dominio.

En una realización, el dominio presente en la glicoproteína de la envuelta de VHC es un dominio conservado. Como se usa en este documento, un “dominio conservado” es un dominio de glicoproteína de la envuelta que está presente en, y cuya estructura es invariable entre, al menos 90% de todas las cepas de VHC. En la realización preferida, el dominio conservado presente en la glicoproteína de la envuelta de VHC es el dominio de unión a DC-SIGN y/o DC-SIGNR de la glicoproteína de la envuelta de VHC. En otra realización, el dominio presente en la glicoproteína de la envuelta de VHC es un dominio no conservado.

Esta invención describe adicionalmente un artículo de fabricación que comprende un soporte sólido que tiene fijado de forma funcional al mismo una pluralidad de agentes, siendo cada agente capaz de formar específicamente un conector con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC.

Como se usa en este documento, una “pluralidad de agentes” significa al menos dos agentes. En una realización, la pluralidad de agentes consiste en una pluralidad de moléculas basadas en DC-SIGN y/o DC-SIGNR. En otra realización, la pluralidad de agentes consiste en una pluralidad de anticuerpos. En una realización adicional, la pluralidad de agentes comprende un anticuerpo y una molécula basada en DC-SIGN y/o DC-SIGNR.

Esta invención proporciona adicionalmente un agente soluble en agua que (a) es capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, y (b) comprende un resto capaz de formar específicamente un complejo con un ligando conocido, permitiendo dicho resto la retirada del agente de una muestra por el contacto con una forma inmovilizada del ligando conocido. Como se usa en este documento, “soluble en agua” significa capaz de existir en forma soluble en agua a 4°C a una concentración de al menos 1 pM.

El uso de un resto capaz de formar específicamente un complejo con un ligando conocido se denomina comúnmente en la técnica “marcaje molecular”. El resto se puede seleccionar, por ejemplo, entre el grupo compuesto por una molécula pequeña y una proteína. El ligando incluye, pero sin limitación, por ejemplo, un ión metálico, una molécula pequeña, un péptido o una proteína. Los ejemplos específicos de combinaciones de resto/ligando incluyen, pero sin limitación, (a) oligohistidina/ion níquel, (b) glutatión S-transferasa/glutatión, (c) biotina/estreptavidina, y (d) el péptido HA YPYDVPDYA/anticuerpo anti-péptido HA. El resto se puede unir por cualquier método conocido por el especialista en la técnica, tal como por ejemplo químicamente o genéticamente.

Esta invención describe adicionalmente un método para tratar una muestra de fluido corporal para retirar de la misma VHC o glicoproteína de la envuelta de VHC si está presente en la muestra, que comprende poner en contacto la muestra en condiciones adecuadas con un artículo de fabricación que comprende un soporte sólido que tiene fijado de forma funcional al mismo un agente capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, retirando de este modo VHC o glicoproteína de la envuelta de VHC si está presente en la muestra.

Como se usa en este documento, “tratar una muestra de fluido corporal para retirar de la misma VHC” significa (a) convertir el VHC presente en la muestra de fluido corporal en incapaz de invadir células diana, tales como las que expresan DC-SIGN y/o DC-SIGNR, (b) separar físicamente VHC de la muestra de fluido corporal o (c) una combinación de (a) y (b), con la salvedad de que el VHC presente en la muestra resultante y capaz de invadir células diana no supere 50% de la cantidad de dicho VHC presente en la muestra antes de retirar el VHC. Como se usa en este documento, una célula diana incluye una célula que tiene DC-SIGN y/o DC-SIGNR presente en su superficie, donde la célula que expresa DC-SIGN y/o DC-SIGNR es capaz de unirse específicamente y fusionarse con el VHC que ha entrado en contacto con ella.

Son condiciones adecuadas para poner en contacto la muestra con el artículo de fabricación de la presente invención condiciones que permitan la formación de un complejo entre el agente y VHC. Estas condiciones se conocen por los especialistas en la técnica.

Esta invención describe adicionalmente un método para tratar una muestra de fluido corporal para reducir sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte por VHC como un resultado del contacto con la muestra, que comprende poner en contacto la muestra con una cantidad adecuada de un agente soluble en agua capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, para formar un complejo entre el agente y el VHC si está presente en la muestra y reducir de esta manera la probabilidad de que un sujeto se infecte por VHC como resultado del contacto con la muestra.

Esta invención describe un método para reducir sustancialmente la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC en una muestra de fluido corporal, que comprende poner en contacto la muestra con una cantidad adecuada de un agente soluble en agua capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, para formar un complejo entre el agente y el VHC si está presente en la muestra y reducir de esta manera la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC en la muestra.

En una realización, la sangre de individuos infectados por VHC se pasará a través de filtros en los que se han inmovilizado proteínas o anticuerpos basados en DC-SIGN y/o DC-SIGNR. Esto permitirá la retirada de viriones de VHC o de glicoproteína de la envuelta de VHC de la sangre. La presencia de glicoproteína de la envuelta de VHC de la sangre puede patógena, por ejemplo, por la unión a células que expresan DC-SIGN y/o DC-SIGNR e inhibiendo la respuesta inmune o iniciando la apoptosis de estas células.

En la realización preferida, el sujeto es un ser humano. Como se usa en este documento, la reducción sustancial de la probabilidad de que el sujeto se infecte por VHC significa la reducción de la probabilidad de que el sujeto se infecte por VHC al menos a la mitad. Por ejemplo, si un sujeto tiene una probabilidad de 1% de infectarse por VHC, una disminución a la mitad en la probabilidad de que el sujeto se infecte con VHC daría como resultado una probabilidad de infectarse por VHC de 0,5%. En una realización, reducir sustancialmente la probabilidad de que el sujeto se infecte con VHC significa reducir la probabilidad al menos diez veces. En la realización preferida, reducir sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC significa reducir la probabilidad al menos 100 veces.

Como se usa en este documento “que el sujeto se infecte con VHC” significa la invasión de las propias células del sujeto por VHC.

Como se usa en este documento, un contacto con una muestra de fluido corporal es cualquier contacto suficiente para provocar que el VHC presente en la muestra se transmita al cuerpo del sujeto e infecte de este modo al sujeto con VHC.

La cantidad de agente soluble en agua adecuada para reducir sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC se puede determinar de acuerdo con métodos conocidos por los especialistas en la técnica. En una realización, la cantidad adecuada de agente soluble en agua es una cantidad comprendida entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 10 mM. En la realización preferida, la cantidad adecuada de agente soluble en agua es una cantidad comprendida entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 10 μ M.

En una realización, el agente es un anticuerpo. En otra realización, el agente es una molécula basada en DC-SIGN y/o DC-SIGNR.

Esta invención describe adicionalmente un método para tratar una muestra de fluido corporal para reducir de este modo sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VIH-1 como resultado de un contacto con la muestra, que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una cantidad adecuada de un agente soluble en agua capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, formando de este modo un complejo entre el agente y el VHC si está presente en la muestra; y (b) retirar cualquier complejo formado de este modo de la muestra resultante, para reducir de este modo la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC como un resultado del contacto con la muestra.

La retirada del complejo de la muestra resultante se puede conseguir de acuerdo con métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

El presente método puede comprender adicionalmente la etapa de retirar de la muestra el agente que no ha formado un complejo si dicha retirada es deseable (por ejemplo, cuando el agente provocaría efectos indeseables en el sujeto al que se administra).

Esta invención describe adicionalmente un método para tratar una muestra de fluido corporal para reducir de este modo sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC como un resultado del contacto con la muestra, que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una cantidad adecuada de un agente soluble en agua que (i) es capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC y (ii) comprende un resto capaz de formar específicamente un complejo con un ligando conocido, permitiendo dicho resto la retirada del agente de una muestra por contacto con una forma inmovilizada del ligando conocido, formando de este modo un complejo entre el agente y el VHC si está presente en la muestra; y (b) retirar cualquier complejo formado de este modo de la muestra resultante poniendo en contacto la muestra resultante con una forma inmovilizada del ligando conocido, para reducir de este modo la probabilidad de que un sujeto se infecte por VHC como resultado del contacto con la muestra.

Los métodos para inmovilizar ligandos son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Como se usa en este documento, un ligando en su “forma inmovilizada” es capaz de formar un complejo con el resto reconocido específicamente por el ligando en su forma libre.

Esta invención describe adicionalmente un método para tratar una muestra de fluido corporal para reducir sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC como resultado del contacto con la muestra, que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra en condiciones adecuadas con un artículo de fabricación que comprende un soporte sólido que tiene fijado de forma funcional al mismo un agente capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC; y (b) poner en contacto la muestra con una cantidad adecuada de un agente soluble en agua capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, para formar un complejo entre el agente y el VHC si está presente en la muestra, con la salvedad de que la etapa (a) puede preceder o seguir a la etapa (b).

Esta invención describe adicionalmente un método para tratar una muestra de fluido corporal para reducir sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC como resultado del contacto con la muestra, que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra en condiciones adecuadas con un artículo de fabricación que comprende un soporte sólido que tiene fijado de forma funcional al mismo un agente capaz de formar específicamente

un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC; y (b) (i) poner en contacto la muestra con una cantidad adecuada de un agente soluble en agua capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, formando de este modo un complejo entre el agente y el VIH-1 si está presente en la muestra, y (ii) retirar cualquier complejo formado de este modo de la muestra resultante, con la salvedad de que la etapa (a) puede preceder o seguir a la etapa (b).

Esta invención describe adicionalmente un método para tratar una muestra de fluido corporal para reducir de este modo sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC como resultado del contacto con la muestra, que comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra en condiciones adecuadas con un artículo de fabricación que comprende un soporte sólido que tiene fijado de forma funcional al mismo un agente capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC; y (b) (I) poner en contacto la muestra con una cantidad adecuada de un agente soluble en agua que (1) es capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VIH-1, y (2) comprende un resto capaz de formar específicamente un complejo con un ligando conocido, formando de este modo un complejo entre el agente y el VHC si está presente en la muestra, y (II) retirar cualquier complejo formado de este modo de la muestra resultante poniendo en contacto la muestra resultante con una forma inmovilizada del ligando conocido, con la salvedad de que la etapa (a) puede preceder o seguir a la etapa (b).

Los métodos de la presente invención pueden comprender adicionalmente la etapa de retirar células diana de la muestra de fluido corporal. En una realización, las células diana son leucocitos. Los métodos para retirar leucocitos de una muestra de fluido corporal son bien conocidos por los especialistas en la técnica e incluyen, por ejemplo, leucofiltración.

Como se usa en este documento, un fluido corporal es cualquier fluido que está presente en el cuerpo de un sujeto y es capaz de contener VHC en un sujeto infectado por VHC. Los fluidos corporales incluyen, pero sin limitación, sangre entera o derivados de la misma (por ejemplo, preparaciones de glóbulos rojos y plaquetas), saliva, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, secreciones vaginales, orina, fluido alveolar, fluido sinovial, semen, fluido pleural y médula ósea. En la realización preferida, el fluido corporal es un fluido que se tiene que administrar a un sujeto. Además, en la realización preferida, la muestra de fluido corporal se selecciona entre el grupo compuesto por sangre entera, una preparación de glóbulos rojos, una preparación de plaquetas y semen.

Las muestras de fluido corporal tales como sangre entera pueden comprender adicionalmente sustancias exógenas añadidas a las mismas con propósitos clínicos y de almacenamiento. Estas sustancias exógenas incluyen, a modo de ejemplo, anticoagulantes (por ejemplo, citrato) y conservantes (por ejemplo, dextrosa).

En una realización, las etapas de puesta en contacto de los métodos de la presente invención se realizan a aproximadamente 4°C. En otra realización, las etapas de puesta en contacto de los métodos de la presente invención se realizan a aproximadamente 20°C. En otra realización más, las etapas de puesta en contacto de los métodos de la presente invención se realizan a aproximadamente 37°C.

La invención también describe un kit para tratar una muestra de fluido corporal para reducir sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC como resultado del contacto con la muestra, que comprende el artículo de fabricación que se ha descrito anteriormente.

Esta invención describe adicionalmente un kit para tratar una muestra de fluido corporal para reducir sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC como resultado del contacto con la muestra, que comprende, en compartimentos separados: (a) un artículo de fabricación que comprende un soporte sólido que tiene fijado de forma funcional al mismo un agente capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC; y (b) un agente soluble en agua capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC.

Esta invención describe adicionalmente un kit para tratar una muestra de fluido corporal para reducir de este modo sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC como resultado del contacto con la muestra, que comprende, en compartimentos separados: (a) un artículo de fabricación que comprende un soporte sólido que tiene fijado de forma funcional al mismo un agente capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC; y (b) un agente soluble en agua que (1) es capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, y (2) comprende un resto capaz de formar específicamente un complejo con un ligando conocido, permitiendo dicho resto la retirada del agente de la muestra por contacto con una forma inmovilizada del ligando conocido; y (c) un artículo de fabricación que comprende un soporte sólido que tiene fijado de forma funcional al mismo el ligando conocido capaz de formar específicamente un complejo con el resto del agente soluble en agua de la etapa (b).

Esta invención describe un kit para tratar una muestra de fluido corporal para reducir de este modo sustancialmente la probabilidad de que un sujeto se infecte con VHC con un resultado del contacto con la muestra, que comprende, en compartimentos separados: (a) un agente soluble en agua que (i) es capaz de formar específicamente un complejo con un dominio presente en una glicoproteína de la envuelta de VHC, y (ii) comprende un resto capaz de formar específicamente un complejo con un ligando conocido, permitiendo dicho resto la retirada del agente de una muestra por el contacto con una forma inmovilizada del ligando conocido; y (b) un artículo de fabricación que comprende un

soporte sólido que tiene fijado de forma funcional al mismo un ligando conocido capaz de formar específicamente un complejo con el resto de dicho agente soluble en agua.

Esta invención también describe un kit para reducir la cantidad de VHC o glicoproteína de la envuelta de VHC presente en una muestra de fluido corporal, que comprende el artículo de fabricación que se ha descrito anteriormente. En una realización, el fluido corporal es sangre.

Los kits de la presente invención pueden comprender adicionalmente tampones adecuados.

Para facilitar la comprensión de los siguientes ejemplos, se describen mejor determinados métodos y/o términos que aparecen con frecuencia en Sambrook, *et al.*

Los métodos descritos en este documento para capturar los viriones de VHC se pueden usar para cualquier propósito conocido por un especialista en la técnica. En una realización, el método se emplea para reducir la infectividad de la muestra de un sujeto. En una realización, el método se emplea para concentrar los viriones de VHC para proporcionar una mayor probabilidad de detección de VHC, tal como en un ensayo de PCR para ácido nucleico de VHC, tal como ARN de VHC.

La obtención de una muestra de células con glicoproteína de la envuelta de VHC se puede realizar de acuerdo con métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Las células con glicoproteína de la envuelta de VHC se pueden obtener a partir de sangre o de cualquier otro fluido corporal que se sepa que contiene células con glicoproteína de la envuelta de VHC en sujetos infectados por VHC.

Esta invención describe un compuesto o agente capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, inhibiendo de este modo la infección por VHC de una célula. Esta invención proporciona un compuesto o agente capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, inhibiendo de este modo la infección por VHC de una célula.

Esta invención describe un anticuerpo o una parte del mismo capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho anticuerpo a un epítipo localizado dentro de una región de la proteína DC-SIGN, uniéndose dicha región de la proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC. Esta invención proporciona un anticuerpo o una parte del mismo capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho anticuerpo a un epítipo localizado dentro de una región de la proteína DC-SIGNR, uniéndose dicha región de la proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC.

Esta invención describe un anticuerpo o una parte del mismo capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho anticuerpo a un epítipo localizado dentro de una región de la glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha región de la glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGN. Esta invención proporciona un anticuerpo o una parte del mismo capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho anticuerpo a un epítipo localizado dentro de una región de la glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha región de la glicoproteína de la envuelta de VHC a una proteína DC-SIGNR.

En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, la parte de los anticuerpos comprende una cadena ligera del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, la parte del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, la parte del anticuerpo comprende una parte Fab del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, la parte del anticuerpo comprende una parte F(ab')₂ del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, la parte del anticuerpo comprende una parte Fd del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, la parte del anticuerpo comprende una parte Fv del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, la parte del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, la parte del anticuerpo comprende uno o más dominios de CDR del anticuerpo.

En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, el anticuerpo se une a un epítipo localizado dentro de una región de una glicoproteína de la envuelta E1 de VHC. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descrita en este documento, el anticuerpo se une a un epítipo localizado dentro de una región de una glicoproteína de la envuelta E2 de VHC.

La invención incluye anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tienen la capacidad de bloquear la interacción entre VHC y DC-SIGN y/o la interacción entre VHC y DC-SIGNR. Los anticuerpos pueden tener especificidad por

VHC, DC-SIGN o DC-SIGNR. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo con la anterior especificidad para usar en el tratamiento de todas las infecciones por VHC y en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por VHC. El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Dicho anticuerpo se puede usar para bloquear de forma temporal el receptor de DC-SIGNR previniendo la infección por VHC, por ejemplo, inmediatamente después de una infección accidental con sangre infectada por VHC.

Como se usa en este documento, “anticuerpo” incluye tanto anticuerpos de origen natural como anticuerpos de origen no natural. Específicamente, “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos monovalentes y divalentes de los mismos. Además, “anticuerpo” incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente sintéticos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano se puede humanizar mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el ser humano. Los anticuerpos se preparan de acuerdo con la metodología convencional. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar usando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la invención, un ratón u otro animal hospedador apropiado se inmuniza a intervalos adecuados (por ejemplo, dos veces por semana, semanalmente, tres veces al mes o mensualmente) con formas antigénicas de VHC, glicoproteínas de la envuelta de VHC, DC-SIGN o DC-SIGNR. Al animal se le puede administrar un “refuerzo” final de antígeno en la semana previa al sacrificio. A menudo es deseable usar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Los adyuvantes inmunológicos adecuados incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante de Ribi, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina tales como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos inmunostimuladores que contienen CpG. En este campo se conocen bien otros adyuvantes adecuados. Los animales se pueden inmunizar por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal o por otras vías. Un animal dado se puede inmunizar con múltiples formas del antígeno por múltiples vías.

En una realización, el VHC se purifica a partir del plasma de individuos infectados por VHC usando el método de centrifugación en gradiente de sacarosa. Como alternativa, se usan glicoproteínas de la envuelta E1 y/o E2 de VHC recombinantes, que están disponibles en el mercado procedentes de una diversidad de fuentes, tales como Austral Biologicals (San Ramon, CA, N° Cat HCA-090-2), Immunodiagnostics (Woburn, MA N° Cat 4001) y Accurate Chemical (Westbury, MA, N° Cat YVS8921). Las glicoproteínas de la envuelta de VHC recombinantes se pueden proporcionar por expresión en la superficie en líneas celulares recombinantes. La proteína DC-SIGN se puede proporcionar en forma de células dendríticas humanas, mientras que la proteína DC-SIGNR se puede proporcionar como células sinusoidales del hígado. Se pueden proporcionar formas recombinantes de DC-SIGN y DC-SIGNR usando métodos que se han descrito previamente {Pohlmann, Soilleux, *et al.*, 2001 ID: 1081}. Como alternativa, el antígeno se puede proporcionar como péptidos sintéticos correspondientes a regiones antigénicas de interés.

Después del régimen de inmunización, se aíslan linfocitos del bazo, ganglios linfáticos u otro órgano del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando un agente tal como polietilenglicol para formar un hibridoma. Después de la fusión, las células se ponen en medio permisivo para el crecimiento de hibridomas pero no de los compañeros de fusión usando métodos convencionales, como se describe (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3ª edición, Academic Press, New York, 1996).

Después del cultivo de los hibridomas, los sobrenadantes celulares se analizan con respecto a la presencia de anticuerpos con la especificidad deseada, es decir, que se unen selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación y transferencia de Western. En este campo se conocen bien otras técnicas de exploración. Son técnicas preferidas las que confirman la unión de los anticuerpos al antígeno conformacionalmente intacto, plegado de forma nativa, tales como el ELISA no desnaturalizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

De forma significativa, como se conoce bien en la técnica, solamente una pequeña parte de una molécula de anticuerpo, el paratopo, esta implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, en general, Clark, W.R. (1986) *The Experimental Foundation of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7ª Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región pFc' o que se ha producido sin la región pFc', denominado fragmento F(ab')₂, conserva los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De forma similar, un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región Fc o que se ha producido sin la región Fc, denominado fragmento Fab, conserva uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Continuando, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unida de forma covalente y una parte de la cadena pesada de anticuerpo denominada Fd. Los fragmentos Fd son el determinante principal de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd se puede asociar con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión al epítipo cuando están aislados.

En la parte de unión a antígeno de un anticuerpo, como se conoce bien en la técnica, hay regiones determinantes de complementariedad (CDR), que interaccionan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones flanqueantes (FR), que conservan la estructura terciaria del paratopo (véase, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de cadena pesada como en la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG, hay cuatro regiones flanqueantes (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en

particular las regiones de CDR3, y más particularmente la CDR3 de cadena pesada, son en gran medida responsables de la especificidad del anticuerpo.

En la técnica actualmente está bien establecido que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero se pueden sustituir por regiones similares de anticuerpos conespecíficos o heteroespecíficos siempre que conserven la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos “humanizados” en los que CDR no humanas se unen de forma covalente a regiones FR y/o Fc/pFc’ humanas para producir un anticuerpo funcional.

Esta invención proporciona, en determinadas realizaciones, composiciones y métodos que incluyen formas humanizadas de anticuerpos. Como se usa en este documento, “humanizados” describe anticuerpos en los que algunos, la mayoría o todos de los aminoácidos en el exterior de las regiones CDR se sustituyen por aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulinas humanas. Los métodos de humanización incluyen, pero sin limitación, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205. Un especialista habitual en la técnica estará familiarizado con otros métodos para la humanización de anticuerpos.

En una realización de las formas humanizadas de los anticuerpos, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos en el exterior de las regiones CDR se han sustituido por aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana, pero algunos, la mayoría o todos los aminoácidos de una o más regiones CDR están sin modificar. Son permisibles pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluirían las moléculas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM. Un anticuerpo “humanizado” conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original. Sin embargo, al usar ciertos métodos de humanización, la afinidad y/o la especificidad de unión del anticuerpo se puede aumentar usando métodos de “evolución dirigida”, como se describe por Wu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 294:151, 1999.

También se pueden preparar anticuerpos monoclonales completamente humanos inmunizando ratones transgénicos para grandes partes de loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y las referencias citadas en estos documentos. Estos animales se han modificado genéticamente de tal forma que hay una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, murinos). Los animales se modifican adicionalmente para contener todo o una parte del locus del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana de tal forma que la inmunización de estos animales dará como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos contra el antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (por ejemplo, XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), pueden prepararse anticuerpos monoclonales de acuerdo con la tecnología de hibridoma convencional. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por lo tanto, no provocarán respuestas de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) cuando se administren a seres humanos.

También existen métodos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Éstos incluyen la tecnología de presentación en fagos (patentes de Estados Unidos 5.565.332 y 5.573.905) y la estimulación *in vitro* de células B humanas (patentes de Estados Unidos N° 5.229.275 y 5.567.610).

Por tanto, como será evidente para un especialista habitual en la técnica, la presente invención también proporciona fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos de fragmentos F(ab')₂ quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos de fragmentos Fab quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas; y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas. La presente invención también incluye los denominados anticuerpos monocatenarios.

Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpo pueden derivar de cualquiera de las clases de inmunoglobulina conocidas comúnmente, incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgA secretora, IgE, IgG e IgM. Los especialistas en la técnica también conocen subclases de IgG e incluyen, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

Los anticuerpos monoclonales se pueden producir por cultivo de células de mamífero en líneas celulares de hibridoma o recombinantes tales como líneas celulares de células de ovario de hámster chino o de mieloma murino. Estos métodos son bien conocidos para los especialistas en la técnica. También se pueden usar líneas celulares bacterianas, de levadura y de insecto para producir anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos. Además, existen métodos para producir anticuerpos monoclonales en animales o plantas transgénicos (Pollock *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 231:147, 1999; Russell, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:119, 1999).

En una realización de los agentes descritos en este documento, el agente es un anticuerpo o una parte de un anticuerpo. Como se usa en este documento, “anticuerpo” significa una molécula de inmunoglobulina que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras y que reconoce a un antígeno. La molécula de inmunoglobulina puede proceder de cualquiera de las clases conocidas comúnmente incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgA secretora, IgG e IgM.

Las subclases de IgG también son bien conocidas para los especialistas en la técnica e incluyen, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. Esto incluye, a modo de ejemplo, anticuerpos de origen natural y de origen no natural. Específicamente, “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos monovalentes y divalentes de los mismos. Además, “anticuerpo” incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente sintéticos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. Opcionalmente, un anticuerpo se puede marcar con un marcador detectable. Los marcadores detectables incluyen, por ejemplo, marcadores radiactivos o fluorescentes. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. El anticuerpo no humano se puede humanizar mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el ser humano. Los métodos para humanizar anticuerpos son conocidos por los especialistas en la técnica. Como se usa en este documento, “anticuerpo monoclonal”, también denominado mAb se usa para describir moléculas de anticuerpo cuyas secuencias primarias son esencialmente idénticas y que muestran la misma especificidad antigénica. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante técnicas de hibridoma, recombinantes o transgénicas u otras técnicas conocidas por el especialista en la técnica. El término “anticuerpo” incluye, pero sin limitación, anticuerpos tanto de origen natural como de origen no natural. Específicamente, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Además, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente sintéticos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En consecuencia, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Estos anticuerpos quiméricos pueden comprender una parte de un anticuerpo de una fuente y una parte de un anticuerpo de otra fuente.

En una realización, la parte del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo. Como se usa en este documento, “cadena ligera” significa el polipéptido menor de una molécula de anticuerpo compuesta por un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL), o fragmentos de los mismos. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo. Como se usa en este documento, “cadena pesada” significa el polipéptido mayor de una molécula de anticuerpo compuesta por un dominio variable (VH) y tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4), o fragmentos de los mismos. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una parte Fab del anticuerpo. Como se usa en este documento, “Fab” significa un fragmento de unión a antígeno monovalente de una inmunoglobulina que consiste en una cadena ligera y parte de una cadena pesada. Se puede obtener por una breve digestión con papaína o por métodos recombinantes. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una parte F(ab')₂ del anticuerpo. Como se usa en este documento, “fragmento F(ab')₂” significa un fragmento de unión a antígeno bivalente de una inmunoglobulina que consiste en las dos cadenas ligeras y parte de las dos cadenas pesadas. Se puede obtener por una breve digestión con pepsina o por métodos recombinantes. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una parte Fd del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende una parte Fv del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende un dominio constante del anticuerpo. En una realización, la parte del anticuerpo comprende uno o más dominios de CDR del anticuerpo. Como se usa en este documento, “CDR” o “región determinante de complementariedad” significa una secuencia altamente variable de aminoácidos en el dominio variable de un anticuerpo.

Esta invención describe formas humanizadas de los anticuerpos descritos en este documento. Como se usa en este documento, “humanizado” describe anticuerpos en los que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos en el exterior de las regiones CDR se sustituyen por aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. En una realización de las formas humanizadas de los anticuerpos, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos en el exterior de las regiones CDR se han sustituido por aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana, pero algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR están sin modificar. Son permisibles pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluirían moléculas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM. Un anticuerpo “humanizado” conservaría una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.

Un especialista en la técnica sabrá como producir los anticuerpos humanizados de la presente invención. Diversas publicaciones, varias de las cuales se incorporan en esta solicitud como referencia, también describen cómo fabricar anticuerpos humanizados. Por ejemplo, los métodos descritos en la patente de Estados Unidos N° 4.816.567 comprenden la producción de anticuerpos quiméricos que tienen una región variable de un anticuerpo y una región constante de otro anticuerpo.

La patente de Estados Unidos 5.225.539 describe otro enfoque para la producción de un anticuerpo humanizado. Esta patente describe el uso de tecnología de ADN recombinante para producir un anticuerpo humanizado en el que las CDR de una región variable de una inmunoglobulina se sustituyen por las CDR de una inmunoglobulina con una especificidad diferente de tal forma que el anticuerpo humanizado reconozca la diana deseada pero no se reconozca de una manera significativa por el sistema inmune del sujeto humano. Específicamente, se usa mutagénesis dirigida para injertar las CDR sobre la región flanqueante.

Se describen otros enfoques para humanizar un anticuerpo en las patentes de Estados Unidos N° 5.585.089 y 5.693.761 y en el documento WO 90/07869 que describe métodos para producir inmunoglobulinas humanizadas. Éstas tienen una o más CDR y posibles aminoácidos adicionales procedentes de una inmunoglobulina donadora y una región flanqueante de una inmunoglobulina humana aceptora. Estas patentes describen un método para aumentar la afinidad de un anticuerpo por el antígeno deseado. Algunos aminoácidos de la región flanqueante se eligen de manera

que sean los mismos que los aminoácidos en esas posiciones en el donante en lugar de en el aceptor. Específicamente, estas patentes describen la preparación de un anticuerpo humanizado que se une a un receptor combinando las CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón con regiones flanqueantes y constantes de inmunoglobulina humana. Las regiones flanqueantes humanas se pueden seleccionar para maximizar la homología con la secuencia de ratón. Se puede usar un modelo informático para identificar aminoácidos en la región flanqueante que probablemente interactúen con las CDR o el antígeno específico y después se pueden usar aminoácidos de ratón en estas posiciones para crear el anticuerpo humanizado.

Las anteriores patentes 5.585.089 y 5.693.761, y el documento WO 90/07861, también proponen cuatro criterios posibles que se pueden usar para diseñar los anticuerpos humanizados. La primera propuesta fue que, para un aceptor, se usara una región flanqueante de una inmunoglobulina humana particular que habitualmente es homóloga a la inmunoglobulina donadora a humanizar, o que se usara una región flanqueante consenso de muchos anticuerpos humanos. La segunda propuesta fue que si un aminoácido en la región flanqueante de la inmunoglobulina humana no es habitual y el aminoácido donador en esta posición es típico para secuencias humanas, entonces se puede seleccionar el aminoácido donador en vez del aceptor. La tercera propuesta fue que en las posiciones inmediatamente adyacentes a las tres CDR en la cadena de inmunoglobulina humanizada, se puede seleccionar el aminoácido donador en vez del aminoácido aceptor. La cuarta propuesta fue usar el resto aminoácido donador en las posiciones de la región marco en las que se predice que el aminoácido tiene un átomo de cadena lateral a una distancia menor de 3 Å de las CDR en un modelo tridimensional del anticuerpo y se predice que es capaz de interactuar con las CDR. Los anteriores métodos son meramente ilustrativos de algunos de los métodos que podría emplear un especialista en la técnica para obtener anticuerpos humanizados.

Esta invención describe ácidos nucleicos aislados que codifican los agentes y/o compuestos descritos en este documento. En una realización, el ácido nucleico codifica los anticuerpos descritos en este documento o sus versiones humanizadas. El ácido nucleico puede ser ARN, ADN o ADNc. En una realización, el ácido nucleico codifica la cadena ligera. En una realización, el ácido nucleico codifica la cadena pesada. En una realización, el ácido nucleico codifica tanto la cadena pesada como la cadena ligera. En una realización, uno o más ácidos nucleicos codifican la parte Fab. En una realización, uno o más ácidos nucleicos codifican partes de CDR. En una realización, el ácido nucleico codifica el dominio variable.

Esta invención describe los ácidos nucleicos descritos en este documento, donde los ácidos nucleicos se pueden alterar por la inserción, delección y/o sustitución de uno o más nucleótidos, que podría dar como resultado una alteración de la secuencia de los ácidos nucleicos. En una realización, los cambios de nucleótidos no tienen como resultado una mutación a nivel de los aminoácidos. En una realización, el cambio de nucleótido puede dar como resultado un cambio de aminoácido. Tal cambio de aminoácido podría ser uno que no afecte a la función de la proteína.

Esta invención describe un vector que comprende un ácido nucleico descrito en ese documento. En una realización, el vector es un plásmido. Esta invención proporciona un sistema de vector hospedador que comprende el vector descrito en este documento y una célula hospedadora adecuada. Esta invención proporciona un método para producir un polipéptido que comprende hacer crecer el sistema de vector hospedador descrito en este documento en condiciones adecuadas para producir el polipéptido y recuperar el polipéptido producido de esta forma.

En una realización de los agentes descritos en este documento, el agente es un polipéptido. En una realización de los agentes descritos en este documento, el agente es un oligopéptido. Como se usa en este documento, "polipéptido" significa dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

Esta invención describe un polipéptido capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, comprendiendo dicho polipéptido aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una proteína DC-SIGN, uniéndose dicha parte a una glicoproteína de la envuelta de VHC.

En una realización, el polipéptido corresponde a un dominio extracelular de DC-SIGN. En una realización del polipéptido, el dominio extracelular comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comienza con la lisina en la posición 62 y termina con el aminoácido carboxi-terminal como se expone en la SEC ID N°: 1.

En una realización del polipéptido, el dominio extracelular es un dominio de unión a lectina de tipo C o una parte del mismo.

En una realización del polipéptido, el dominio de lectina de tipo C comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comienza con la leucina en la posición 229 y termina con el aminoácido carboxi-terminal como se expone en la SEC ID N°: 1.

Esta invención describe un polipéptido capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, comprendiendo dicho polipéptido aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una proteína DC-SIGNR, uniéndose dicha parte a una glicoproteína de la envuelta de VHC. En una realización del polipéptido, el dominio extracelular comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comienza con la lisina en la posición 74 y termina con el aminoácido carboxi-terminal como se expone en la SEC ID N°: 2.

En una realización del polipéptido, el dominio de lectina de tipo C comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que comienza con la leucina en la posición 241 y termina con el aminoácido carboxi-terminal como se expone en la SEC ID N°:2.

5 Esta invención describe un polipéptido capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, comprendiendo dicho polipéptido aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGN.

10 En una realización, el polipéptido comprende aminoácidos consecutivos teniendo una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta E1 de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGN. En una realización, el polipéptido comprende aminoácidos consecutivos teniendo la secuencia expuesta en la SEC ID N°: 3 desde la posición 192 a la posición 346, o una parte de la misma.

15 En una realización, el polipéptido comprende aminoácidos consecutivos teniendo una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta E2 de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGN. En una realización, el polipéptido comprende aminoácidos consecutivos teniendo la secuencia expuesta en la SEC ID N°: 3 desde la posición 383 a la posición 717, o una parte de la misma.

20 Esta invención describe un polipéptido capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, comprendiendo dicho polipéptido aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGNR.

25 En una realización, el polipéptido comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta E1 de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGNR. En una realización, el polipéptido comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en la SEC ID N°: 3 desde la posición 192 a la posición 346, o una parte de la misma.

30 En una realización, el polipéptido comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta E2 de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGNR. En una realización, el polipéptido comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en la SEC ID N°: 3 desde la posición 383 a la posición 717, o una parte de la misma.

35 Los compuestos y/o agentes descritos en este documento se pueden preparar por cualquier medio conocido por un especialista en la técnica. Por ejemplo, una proteína se puede preparar mediante expresión recombinante a partir de un ácido nucleico, tal como un plásmido o vector que comprende el ácido nucleico codificante, donde el plásmido o vector está en una célula hospedadora adecuada, es decir, un sistema de vector hospedador para la producción del polipéptido de interés. Puede prepararse un vector adecuado que comprende secuencias reguladoras adecuadas tales como potenciadores y promotores. La célula hospedadora puede ser de cualquier tipo incluyendo, pero sin limitación, células de mamífero, de bacterias y de levadura. Las células bacterianas adecuadas incluyen células *E. coli*. Las células de mamífero adecuadas incluyen, pero sin limitación, células 293T de riñón embrionario humano (HEK), células HeLa, células NIH 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO) y células Cos.

45 Si la proteína se produce de manera recombinante, se puede expresar a partir de un plásmido que contiene un inserto de ácido nucleico sintético. Tal sitio de inserción en el plásmido puede permitir unir la proteína a una señal, tal como una señal de poli-histidina. Tal señal facilita la posterior purificación de la proteína.

50 Un ácido nucleico que codifica el polipéptido, la proteína o el equivalente funcional de los mismos se puede clonar bajo el control de un promotor inducible, permitiendo de este modo la regulación de la expresión de la proteína. Los especialistas en la técnica conocerán sistemas inducibles adecuados.

Los vectores para expresar la proteína o los equivalentes funcionales descritos en este documento se pueden seleccionar entre fuentes comerciales o pueden construirse para un sistema de expresión particular. Estos vectores pueden 55 contener secuencias reguladoras apropiadas tales como secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras y genes marcadores. Los vectores pueden ser plásmidos o pueden basarse en virus. El especialista en la técnica puede consultar Molecular Cloning: a laboratory manual (Sambrook *et al.*, 1989). En "Short protocols in molecular biology", segunda edición, Ausubel *et al.*, (John Wiley & Sons 1992), se describen detalladamente muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos y análisis de proteínas.

60 Los especialistas en la técnica conocen métodos para el aislamiento y la purificación de proteínas recombinantes y se describen en diversas fuentes tales como en Sambrook *et al.* (1989). En bacterias tales como *E. coli*, la proteína recombinante puede formar cuerpos de inclusión en la célula bacteriana, facilitando de este modo su preparación. Si se produce en cuerpos de inclusión, la proteína de soporte puede requerir plegamiento hasta una conformación natural.

Adicionalmente, para adaptar las propiedades de la proteína o del equivalente funcional de la misma, un especialista entenderá que se pueden realizar alteraciones a nivel del ácido nucleico a partir de secuencias de proteína conocidas, tal

como añadiendo, sustituyendo, delecionando o insertando uno o más nucleótidos. La mutagénesis dirigida es el método de preferencia que se puede emplear para obtener proteínas mutadas. Hay muchas técnicas de mutagénesis dirigida conocidas por los especialistas en la técnica incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos usando PCR, tal como se describe en Sambrook, o usando kit disponibles en el mercado.

Se pueden seleccionar o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Los vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos tales como plásmidos virales, por ejemplo fagos o fagémidos, y como se describe en Sambrook. En *Short Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel *et al.*, Eds, John Wiley & Sons, 1992, se describen con detalle técnicas y protocolos para manipular ácidos nucleicos, tales como en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ácidos nucleicos en células y expresión génica, y análisis de proteínas.

Esta invención también describe formas solubles de los polipéptidos descritos en este documento. En consecuencia, por ejemplo, se puede retirar un dominio transmembrana de un polipéptido expresado en una superficie celular de tal forma que el polipéptido se vuelva soluble.

Esta invención describe un agente no peptídico capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho agente no peptídico a un epítipo localizado dentro de una región de la proteína DC-SIGN, uniéndose dicha región de la proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC. Esta invención proporciona un agente no peptídico capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho agente no peptídico a un epítipo localizado dentro de una región de la proteína DC-SIGNR, uniéndose dicha región de la proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC.

Esta invención describe un agente no peptídico capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGN a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho agente no peptídico al menos a una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGN. Esta invención proporciona un agente no peptídico capaz de inhibir la unión de una proteína DC-SIGNR a una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicho agente no peptídico a al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta de VHC, uniéndose dicha parte a una proteína DC-SIGNR.

En una realización de los agentes no peptídicos descritos en este documento, el agente no peptídico se une a al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta E1 de VHC. En una realización de los agentes no peptídicos descritos en este documento, el agente no peptídico se une a al menos una parte de un dominio extracelular de una glicoproteína de la envuelta E2 de VHC.

En una realización de los agentes no peptídicos descritos en este documento, el agente no peptídico es un carbohidrato. El carbohidrato puede ser uno conocido por los especialistas en la técnica incluyendo, pero sin limitación, manosa, manano y metil- α -D-nanopiranosido.

Como se usa en este documento, “agente no peptídico” significa un agente que no consiste en su totalidad en una secuencia lineal de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Una molécula no peptídica, sin embargo, puede contener uno o más enlaces peptídicos. En una realización, el agente no peptídico es un compuesto que tiene un peso molecular menor de 500 daltons. Como se usa en este documento, una “molécula pequeña” o una molécula de bajo peso molecular es una que tiene un peso molecular menor de 500 daltons.

Esta invención describe una composición que comprende un vehículo y un compuesto que inhibe la unión de VHC a DC-SIGN y/o DC-SIGNR en la superficie de una célula. En una realización, la composición comprende una cantidad del compuesto eficaz para inhibir la unión de VHC a DC-SIGN y/o DC-SIGNR en la superficie de una célula.

Esta invención describe una composición que comprende un anticuerpo o una parte del mismo descrito en este documento y un vehículo. Esta invención proporciona una composición que comprende un polipéptido descrito en este documento y un vehículo. Esta invención proporciona una composición que comprende un agente no peptídico descrito en este documento y un vehículo. Los vehículos incluyen, pero sin limitación, un aerosol, vehículos intravenosos, orales y tópicos. En consecuencia, la invención proporciona la anterior composición adaptada para aplicaciones en aerosol, intravenosa, oral o tópica, u otras aplicaciones conocidas por el especialista en la técnica.

Esta invención describe los agentes, los compuestos y/o las composiciones descritas en este documento y un vehículo. Este vehículo puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir, pero sin limitación, soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, medios salinos y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer lactada o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen fluidos y reponedores de nutrientes, reponedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

Como se usa en este documento “composición” significa una mezcla. Las composiciones incluyen, pero sin limitación, las adecuadas para administración oral, rectal, intravaginal, tópica, nasal, oftálmica o parenteral a un sujeto. Como se usa en este documento, “parenteral” incluye, pero sin limitación, técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraesternal. Como se usa en este documento, la “administración” se puede efectuar o

5 realizar usando cualquiera de los métodos conocidos por el especialista en la técnica. Los métodos para administración al sujeto incluyen, pero sin limitación, técnicas de inyección o infusión oral, rectal, intravaginal, tópica, nasal, oftálmica, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraesternal.

Esta invención describe proteínas DC-SIGN y DC-SIGNR o equivalentes funcionales de las mismas, para usar en

10 la terapia o diagnóstico de VHC. La invención proporciona un compuesto que se une específicamente a proteínas DC-SIGN y/o DC-SIGNR par usar en la terapia o diagnóstico de VHC.

Como se usa en este documento, un equivalente funcional de DC-SIGN o DC-SIGNR es un compuesto que es capaz de unirse a VHC, evitando de este modo su interacción con DC-SIGN y/o DC-SIGNR. Preferiblemente, el equivalente

15 funcional es un péptido o una proteína. La expresión “equivalente funcional” incluye fragmentos, mutantes y muteínas de DC-SIGN y DC-SIGNR. Los equivalentes funcionales incluyen moléculas que se unen a VHC, preferiblemente a las glicoproteínas de la envuelta de VHC, y comprenden todos o una parte de los dominios extracelulares de DC-SIGN y DC-SIGNR.

Los equivalentes funcionales incluyen formas solubles de las proteínas DC-SIGN o DC-SIGNR. Una forma soluble adecuada de estas proteínas, o equivalentes funcionales de las mismas, podría comprender, por ejemplo, una forma

20 truncada de la proteína de la que se ha retirado el dominio transmembrana por métodos químicos, proteolíticos o recombinantes. El dominio transmembrana de DC-SIGN comienza aproximadamente en la glicina 49 y termina aproximadamente en la serina 61, mientras que el dominio transmembrana de DC-SIGNR comienza aproximadamente en la glicina 49 y termina aproximadamente en la serina 73.

En una realización, el equivalente funcional comprende todo o una parte del dominio extracelular de DC-SIGN o DC-SIGNR. La región extracelular de DC-SIGN comienza aproximadamente en la lisina 62 e incluye los aminoácidos

30 carboxi-terminales, mientras que la región extracelular de DC-SIGNR comienza aproximadamente en la lisina 74 e incluye los aminoácidos carboxi-terminales. Preferiblemente, el equivalente funcional tiene una homología de al menos 80% con la proteína correspondiente. En una realización preferida, el equivalente funcional tiene una homología de al menos 90% como se evalúa por cualquier algoritmo de análisis convencional tal como, por ejemplo, el software de análisis de secuencia Pileup (Program Manual for the Wisconsin Package, 1996). La numeración de los aminoácidos es como se proporciona en el número de depósito de proteína del GenBank AAK20997 para DC-SIGN y AAG13848

35 para DC-SIGNR.

La expresión “un fragmento funcionalmente equivalente”, como se usa en este documento, también puede significar cualquier fragmento o conjunto de fragmentos de DC-SIGN y/o DC-SIGNR que se une a VHC, preferiblemente

40 que se une a las glicoproteínas de la envuelta de VHC. El dominio de unión a lectina de tipo C de DC-SIGN comienza aproximadamente en la leucina 229 e incluye los aminoácidos carboxi-terminales, mientras que el dominio de unión a lectina de tipo C de DC-SIGNR comienza aproximadamente en la leucina 241 e incluye los aminoácidos carboxi-terminales. Toda la proteína, el dominio extracelular o el dominio de lectina de tipo C se pueden truncar en uno o en ambos extremos o se pueden retirar partes internamente siempre que la proteína conserve la función definida.

Los fragmentos proteicos funcionalmente equivalentes o análogos pueden pertenecer a la misma familia de proteínas que las proteínas DC-SIGN y DC-SIGNR humanas identificadas en este documento. Por “familia de proteínas” se entiende un grupo de proteínas que comparten una función común y muestran homología de secuencia común. Las proteínas homólogas pueden proceder de especies no humanas. Preferiblemente, la homología entre secuencias

50 de proteínas funcionalmente equivalentes es de al menos 25% a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos de la proteína completa o del fragmento EC2 completo (aminoácidos 11,3-201). Más preferiblemente, la homología es de al menos 50%, incluso más preferiblemente de 75% a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos de la proteína o del fragmento de proteína. Más preferiblemente, la homología es mayor de 80% a lo largo de toda la secuencia. Más preferiblemente, la homología es mayor de 90% a lo largo de toda la secuencia. Más preferiblemente, la homología es mayor de 95% a lo largo de toda la secuencia.

55

La expresión “un análogo funcionalmente equivalente” se usa para describir los compuestos que poseen una función análoga a la actividad de las proteínas DC-SIGN y DC-SIGNR y pueden comprender, por ejemplo, un péptido, un

60 péptido cíclico, polipéptido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Estos compuestos pueden ser proteínas o pueden ser agentes sintéticos diseñados para imitar determinadas estructuras o epítomos en la proteína inhibidora. Preferiblemente, el compuesto es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

La expresión “análogo funcionalmente equivalente” también incluye cualquier análogo de DC-SIGN o DC-SIGNR obtenido alterando la secuencia de aminoácidos, por ejemplo mediante una o más delecciones, sustituciones o adiciones

65 de aminoácidos, de tal forma que el análogo de proteína conserve la capacidad de unirse a VHC, preferiblemente a las glicoproteínas de la envuelta de VHC. Las sustituciones de aminoácidos se pueden conseguir, por ejemplo, por mutación puntual del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos. En una realización, el análogo conserva la capacidad de unirse a VHC, pero no se une a ICAM-3.

El equivalente funcional de DC-SIGN o DC-SIGNR puede ser un análogo de un fragmento de la proteína DC-SIGN o DC-SIGNR. La proteína DC-SIGN o DC-SIGNR o el equivalente funcional se puede modificar químicamente, siempre que conserve su capacidad para unirse a VHC, preferiblemente a las glicoproteínas de la envuelta de VHC.

Esta invención también describe equivalentes funcionales de tales polipéptidos y fragmentos de los mismos. Estos equivalentes funcionales pueden tener una homología de al menos 75% con la secuencia nativa. Estos equivalentes funcionales también pueden tener una homología de al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% con la secuencia nativa. Un fragmento funcionalmente equivalente puede ser un fragmento del polipéptido que todavía se une a su ligando diana. Por ejemplo, un fragmento equivalente funcionalmente del ectodominio E1 sería un fragmento que tiene una delección de al menos un aminoácido en su extremo amino-terminal, en su extremo carboxi-terminal, internamente, o una combinación de los mismos, que todavía se une a su ligando en la célula susceptible a la infección por VHC.

Esta invención también describe análogos funcionalmente equivalentes de estos polipéptidos y fragmentos de polipéptido. Estos análogos tendrían una actividad análoga al polipéptido o al fragmento. Estos análogos se pueden obtener cambiando la secuencia de aminoácidos, tal como por una inserción, delección o sustitución de al menos un aminoácido. Este análogo se seguiría uniendo a su ligando. Por ejemplo, un análogo E1 se seguiría uniendo a su ligando en la célula susceptible a la infección por VHC. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas. Estas sustituciones conservativas pueden estar dentro de los siguientes grupos: (1) glicina y alanina; (2) valina, isoleucina y leucina; (3) ácido aspártico y ácido glutámico; (4) asparagina y glutamina; (5) serina y treonina; (6) lisina y arginina; (7) fenilalanina y tirosina. Estas sustituciones también pueden ser sustituciones homólogas tales como dentro de los siguientes grupos; (a) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (b) fenilalanina, tirosina y triptófano; (c) lisina, arginina e histidina; (d) ácido aspártico y ácido glutámico; (e) asparagina y glutamina; (f) serina y treonina; (g) cisteína y metionina.

El equivalente funcional también se puede modificar, tal como por una modificación química, siempre que se siga uniendo a su ligando respectivo.

Es previsible que estas moléculas sean útiles en la terapia preventiva de la infección por VHC, debido a que esas moléculas se unirán específicamente al virus y, de esta manera, evitarán la entrada del virus en las células. Como se usa en este documento, "unión específica" significa que el análogo funcionalmente equivalente tiene alta afinidad por VHC o por las glicoproteínas de la envuelta de VHC, pero no por las proteínas control. La unión específica se puede medir por varias técnicas tales como ELISA, citometría de flujo, transferencia de Western o inmunoprecipitación. Preferiblemente, el análogo funcionalmente equivalente se une específicamente a VHC o a las glicoproteínas de la envuelta de VHC, a concentraciones nanomolares o picomolares.

Esta solicitud también describe un compuesto que se une a DC-SIGN y/o DC-SIGNR para usar en el diagnóstico o la terapia de VHC. Preferiblemente, el compuesto se une específicamente a DC-SIGN y/o DC-SIGNR a concentraciones nanomolares o picomolares. Estos compuestos se pueden usar para prevenir que el virus se una e infecte las células diana. El compuesto incluye, pero sin limitación, un anticuerpo, un carbohidrato, una molécula pequeña, un péptido, un polipéptido y un oligopéptido.

La proteína DC-SIGN, la proteína DC-SIGNR o un equivalente funcional de las mismas se puede producir mediante cualquier medio adecuado, como será evidente para los especialistas en la técnica. Para producir cantidades suficientes de la proteína DC-SIGN, de la proteína DC-SIGNR o de equivalentes funcionales de las mismas para usar de acuerdo con la presente invención, la expresión se puede conseguir de forma conveniente cultivando en condiciones apropiadas células hospedadoras recombinantes que contienen la proteína DC-SIGNR o un equivalente funcional de la misma. Preferiblemente, la proteína DC-SIGN o DC-SIGNR se produce por medios recombinantes, mediante expresión de un ácido nucleico codificante. Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de diferentes células hospedadoras son bien conocidos.

Cuando se expresa en forma recombinante, la proteína DC-SIGN, la proteína DC-SIGNR o un equivalente funcional de las mismas se genera preferiblemente por la expresión de un ácido nucleico codificante en una célula hospedadora. Se puede usar cualquier célula hospedadora, dependiendo de los requisitos individuales de un sistema particular. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de ratón y muchas otras. Las bacterias también son hospedadores preferidos para la producción de proteína recombinante debido a la facilidad con la que se pueden manipular y desarrollar las bacterias. Un hospedador bacteriano preferido común es *E. coli*.

Los ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos o cualquier otro agente o compuesto descrito en este documento se pueden aislar y/o purificar. Un especialista en la técnica sabrá cómo aislarlos y/o purificarlos. Se proporcionan métodos en cualquier manual de laboratorio tal como "Molecular Cloning" por Sambrook, Fritsch y Maniatis.

Como se usa en este documento, a lo largo de la memoria descriptivas se usan las siguientes abreviaturas convencionales para indicar aminoácidos específicos: A=ala=alanina; R=arg=arginina; N=asn=asparagina; D=asp=ácido aspártico; C=cys=cisteína; Q=gln=glutamina; e=glu=ácido glutámico; G=gly=glicina; H=his=histidina; I=ile=isoleucina;

L=leu=leucina; K=lys=lisina; M=met=metionina; F=phe=fenilalanina; P=pro=prolina; S=ser=serina; T=thr=treonina; W=trp=triptófano, Y=tyr=tirosina; y V=val=valina.

Esta invención describe un animal no humano transgénico que comprende un transgén que codifica el polipéptido de interés o un equivalente funcional del mismo. Véase, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 6.025.539, un ratón transgénico para IL-5; en la patente de Estados Unidos N° 6.023.010, animales no humanos transgénicos empobrecidos en un tipo celular linfocítico maduro; en la patente de Estados Unidos N° 6.018.098, un modelo *in vivo* e *in vitro* de fotoenvejecimiento cutáneo; en la patente de Estados Unidos N° 6.018.097, ratones transgénicos que expresan insulina humana; en la patente de Estados Unidos 6.008.434, ratones transgénicos para el factor de diferenciación del crecimiento 11; en la patente de Estados Unidos N° 6.002.066, ratones transgénicos modificados en H2-M; en la patente de Estados Unidos N° 5.994.618, ratones transgénicos para el factor de diferenciación del crecimiento 8; en la patente de Estados Unidos N° 5.986.171, un método para examinar la neurovirulencia de poliovirus; en la patente de Estados Unidos N° 5.981.830, ratones Knockout y su descendencia con un gen de hepsina alterado; en la patente de Estados Unidos N° 5.981.829, un ratón transgénico DELTA.Nur77; en la patente de Estados Unidos N° 5.936.138, un gen que codifica proteína L3T4 mutante que facilita la infección por VHC y un ratón transgénico que expresa dicha proteína; en la patente de Estados Unidos N° 5.912.411, ratones transgénicos para un activador transcripcional inducible por tetraciclina; en la patente de Estados Unidos N° 5.894.078, un ratón transgénico que expresa app C-100.

Los métodos usados para generar ratones transgénicos son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el manual titulado "Manipulating the Mouse Embryo" por Brigid Hogan *et al.*, (Ed. Cold Spring Harbor Laboratory) 1986. Véase, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 4.736.866 de Leder y Stewart, métodos para la producción de un ratón transgénico.

Desde hace algún tiempo se sabe que es posible realizar la transformación genética de un cigoto (y el embrión y organismo maduro que resultan del mismo) mediante la colocación o la inserción de material genético exógeno en el núcleo del cigoto o en cualquier material genético nucleico que finalmente forma parte del núcleo del cigoto. El genotipo de cigoto y el organismo que resulta de un cigoto incluirá el genotipo del material genético exógeno. Adicionalmente, la inclusión de material genético exógeno en el cigoto dará como resultado una expresión fenotípica del material genético exógeno.

El genotipo del material genético exógeno se expresa después de la división celular del cigoto. Sin embargo, la expresión fenotípica, por ejemplo la producción de un producto o productos proteicos del material genético exógeno, o alteraciones del fenotipo natural del cigoto o del organismo, tendrá lugar en el punto del desarrollo del cigoto o del organismo durante el cual el material genético exógeno particular sea activo. Las alteraciones de la expresión del fenotipo incluyen un aumento o disminución de la expresión de un fenotipo o una alteración en la promoción y/o control de un fenotipo, incluyendo la adición de un nuevo promotor y/o controlador o el suplemento de un promotor existente y/o controlador del fenotipo.

La transformación genética de diversos tipos de organismos se expone y se describe con detalle en la patente de Estados Unidos N° 4.873.191, expedida el 10 de Octubre de 1989. La transformación genética de organismos se puede usar como un análisis *in vivo* de la expresión génica durante la diferenciación y en la eliminación o disminución de enfermedades genéticas por terapia génica o usando un mamífero no humano transgénico como sistema modelo de una enfermedad humana. Este sistema modelo se puede usar para ensayar supuestos fármacos para determinar su valor terapéutico potencial en seres humanos.

El material genético exógeno se puede poner en el núcleo de un huevo maduro. Se prefiere que el huevo esté en un estado fertilizado o activado (por partenogénesis). Después de la adición del material genético exógeno, se añade un conjunto haploide complementario de cromosomas (por ejemplo, una célula espermática o un cuerpo polar) para permitir la formación de un cigoto. Este cigoto se deja desarrollar en un organismo, tal como implantándolo en una hembra pseudogestante. El organismo resultante se analiza con respecto a la integración del material genético exógeno. Si se determina una integración positiva, el organismo se puede usar para el análisis *in vivo* de la expresión génica, expresión que se considera relacionada con una enfermedad genética particular.

Los "animales no humanos transgénicos" de la invención se producen introduciendo "transgenes" en la línea germinal del animal no humano. Pueden usarse células diana embrionarias en diversos estados del desarrollo para introducir transgenes. Se usan diferentes métodos dependiendo de la etapa del desarrollo de la célula diana embrionaria. El cigoto es la mejor diana para la microinyección. En el ratón, el pronúcleo masculino alcanza un tamaño de aproximadamente 20 μm de diámetro que permite la inyección reproducible de 1-2 pl de solución de ADN. El uso de cigotos como diana para transferencia génica tiene una ventaja principal porque, en la mayoría de los casos, el ADN inyectado se incorporará en el gen hospedador antes de la primera escisión (Brinster, *et al.*, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4438-4442). Como consecuencia, todas las células del animal no humano transgénico llevarán el transgén incorporado. Esto también se reflejará, en general, en la transmisión eficaz del transgén a la descendencia del fundador, ya que 50% de las células germinales llevarán el transgén. La microinyección de cigotos es el método preferido para incorporar transgenes en la práctica de la invención.

También se puede usar infección retroviral para introducir transgenes en un animal no humano. El embrión no humano en desarrollo se puede cultivar *in vitro* hasta el estado de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para la infección retroviral (Jaenich, R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 73, 1260-1264). La

infección eficaz de los blastómeros se consigue por tratamiento enzimático para retirar la zona pelúcida (Hogan, *et al.*, (1986) en Manipulación the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). El sistema de vector viral usado para introducir el transgén es típicamente un retrovirus defectuoso en la replicación que lleva el transgén (Jahner, *et al.*, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6927-6931, Van der Putten, *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6248-6152). La transfección se obtiene de manera sencilla y eficaz cultivando los blastómeros en una monocapa de células productoras de virus (Van der Putten, *supra*; Stewart, *et al.*, (1987) EMBO J. 6, 383-388). Como alternativa, la infección se puede realizar en una etapa posterior. Los virus o las células productoras de virus se pueden inyectar en el blastocelo (Jahner, D., *et al.*, (1982) Nature 298, 623-628). La mayoría de los fundadores serán mosaicos para el transgén, ya que la incorporación se produce solamente en un subconjunto de las células que formaron el animal no humano transgénico. Además, el fundador puede contener diversas inserciones retrovirales del transgén en diferentes posiciones en el genoma que generalmente se segregarán en la descendencia. Además, también es posible introducir transgenes en la línea germinal, aunque con baja eficacia, por infección retroviral intrauterina del embrión a la mitad de la gestación (Jahner, D. *et al.*, (1982) *supra*).

Un tercer tipo de célula diana para la introducción de transgenes es la célula madre embrionaria (ES). Las células ES se obtienen a partir de embriones antes de la implantación cultivados *in vitro* y fusionados con embriones (Evans, M. J., *et al.*, (1981) Nature 292, 154-156; Bradley, M. O., *et al.*, (1984) Nature 309, 255-258; Gossler *et al.*, (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 9065-9069; y Robertson, *et al.*, (1986) Nature 322, 445-448). Los transgenes se pueden introducir de forma eficaz en las células ES por transfección con ADN o por transducción mediada por retrovirus. Estas células ES transformadas pueden combinarse después de esto con blastocistos de un animal no humano. Las células ES después colonizan al embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante. Para una revisión véase Jaenisch, R. (1988) Science 240, 14681474.

Como se usa en este documento, "un transgén" es una secuencia de ADN introducida en la línea germinal de un animal no humano mediante intervención humana, tal como mediante los métodos que se han descrito anteriormente.

La invención se ilustra en la sección de Detalles Experimentales mostrada a continuación. Estos detalles experimentales se indican para ayudar a entender la invención, pero de ninguna manera pretenden ni deben considerarse limitantes de la invención como se expone en las reivindicaciones que se proporcionan más adelante.

Detalles experimentales

Primer Conjunto de Experimentos

Unión de la glicoproteína estructural E2 del Virus de la Hepatitis C a Lectinas de tipo C Humanas, DC-SIGN y DC-SIGN-R

Resumen

La proteína DC-SIGN, un lectina de tipo C humana, se expresa sobre la superficie de células dendríticas (DC), y una proteína altamente homóloga, DC-SIGN-R, se encuentra a altos niveles en las células endoteliales sinusoidales del hígado y del ganglio linfático. Estas moléculas se unen a la glicoproteína de la envuelta de VIH, gp120, y facilitan la transmisión del virus en trans mediante la unión a DC-SIGN. La E2 de VHC es el equivalente funcional de gp120 de VIH y contiene abundantes oligosacáridos del tipo de alto contenido de manosa que se pueden unir a moléculas de lectina, DC-SIGN y DC-SIGN-R. Para ensayar esta hipótesis, se construyeron líneas celulares HeLa que expresan DC-SIGN o DC-SIGN-R y se evaluó la unión a la proteína E2 y a viriones de VHC. Usando un ensayo fluorométrico con perlas, se demostró por primera vez que la E2 purificada se une a DC-SIGN y a DC-SIGN-R y que estas interacciones se inhiben por un anticuerpo monoclonal contra DC-SIGN/DC-SIGN-R además de manano y quelantes de calcio. Según estos experimentos, parece ser que la proteína DC-SIGN y la proteína DC-SIGN-R funcionan como co-receptores de unión para VHC y que su expresión en DC, y en el endotelio del hígado y de la placenta, tienen implicaciones importantes para la enfermedad por VHC.

Materiales y Métodos

Plásmidos y células

Se introdujeron plásmidos pcDNA3-DC-SIGN y pcDNA3-DC-SIGN-R (artículo N° 5444 y 6749, respectivamente, AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD), en células HeLa por transfección usando una formulación de lípidos (Effectene, Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Dos días después de la transfección, las células se trataron con medio de crecimiento convencional (Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contienen 10% de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan UT), penicilina/estreptomicina (Life Technologies, Carlsbad, CA) y L-glutamina (Life Technologies) suplementado con 600 µg/ml Genetina (Life Technologies). Después de 2 semanas, se seleccionaron las colonias de células supervivientes, se expandieron y se exploraron mediante citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales que reconocían DC-SIGN (507D, L-SIGN (612X), o tanto DC- como L-SING (604L). Las líneas celulares HeLa transfectadas se cultivaron de forma rutinaria en DMEM suplementado con 10% de FBS, penicilina/estreptomicina y L-glutamina con Genetina (600 µg/ml). Las células en crecimiento se dividieron para el cultivo de mantenimiento usando una solución de disociación celular (Sigma, St. Louis, MO).

Anticuerpos

Se usaron los siguientes mAb:

- 5 El mAb HCM-091-a-5 Anti-E2 (clon 4F6/2) de Austral Biologicals (San Ramon, CA), es un mAb IgG1 de ratón que reacciona con el epítipo lineal E2 y con suero de donantes seropositivos a VHC. H31, H33, H44, H48, H53, H55, H60 y H61 son mAb de ratón anti-E2 de VHC (de Dr. Jean Dubuisson, Institut Pasteur de Lille, Francia) que presenta reacción cruzada con epítopos conformacionales (Deleersnyder *et al.*, J. Virol, 71, 697-704 (1997), Flint *et al.*, J. Virol, 73, 6782-6790 (1990)).
- 10 120507 (507D) de BD Pharmingen (San Diego, CA) es un dominio de unión a lectina, específico para DC-SIGN y dirigido, dependiente de la conformación, de IgG2b de ratón. 507D bloquea la infección por VIS y VIH y la adhesión de ICAM-3 (Jameson *et al.*, J. Virol, 76, 1866-1875 (2002), Wu *et al.*, J. Virol, 76, 5905-5914 (2002)).
- 15 120507 (604L) de BD Pharmingen (San Diego, CA) es un dominio de unión a lectina específico para DC-SIGN-R, dirigido, dependiente de la conformación, de IgG2b de ratón. 604L no bloquea la unión a VIS o VIH y solamente muestra un bloqueo débil o no muestra bloqueo de la adhesión de ICAM-3 (Jameson *et al.*, J. Virol, 76, 1866-1875 (2002), Wu *et al.*, J. Virol, 76, 5905-5914 (2002)).
- 20 120507 (612X) de BD Pharmingen (San Diego, CA) es una IgG2a de ratón que reconoce el dominio de unión a lectina de DC-SIGN y DC-SIGN-R. 612X bloquea la adhesión de ICAM-3 y la infección por VIH (Jameson *et al.*, J. Virol, 76, 1866-1875 (2002), Wu *et al.*, J. Virol, 76, 5905-5914 (2002)).
- 25 DC4 (artículo N° 5442, AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD) es una IgG1 de ratón que reconoce tanto la proteína DC-SIGN como la proteína DC-SIGN-R mediante la región de cuello o de repetición, y no el dominio de unión a lectina. DC4 no bloquea la unión de ICAM-3 o la transmisión de VIS (Baribaud *et al.*, J. Virol, 10281-10289 (2001)).
- 30 DC28 (artículo N° 5443, AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD) es una IgG2a de ratón que reconoce tanto la proteína DC-SIGN como la proteína DC-SIGN-R mediante la región de cuello o de repetición y no el dominio de unión a lectina. DC28 no bloquea la unión de ICAM-3 o la transmisión de VIS (Baribaud *et al.*, J. Virol, 10281-10289 (2001)).

Inmunofluorescencia

- 35 Las células se tiñeron en PBS/BSA al 0,5% a 4°C durante 30 minutos con mAb primarios y se lavaron antes de la adición de mAb secundarios conjugados con FITC con especificidad de isotipo (anti-ratón-FITC, BD Pharmingen (San Diego, CA) durante 30 minutos adicionales a 40°C. Después del lavado, se analizaron las células mediante citometría de flujo usando un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Se incluyeron controles con especificidad de isotipo para establecer posiciones de cuadrante.
- 40

Preparación de perlas fluorescentes con E2 de VHC

- 45 Se recubrieron microesferas marcadas con NeutrAvidin™ FluoSpheres® modificadas con carboxilato (505/515 nm, 1,0 µm; Molecular Probes, Eugene, OR) con glicoproteína E2 de VHC como se describe para las perlas con ICAM-1 (Geijtenbeek *et al.*, Blood, 94, 754-764 (1999)). En resumen, se sonicaron perlas recubiertas con NeutrAvidin™ y se lavaron en PBS/BSA (al 0,5%). Las perlas se incubaron con fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratón específica AffiniPure conjugada con Sp-biotinilada (6 µg/ml en PBS/BSA (al 0,5%); Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) durante 2 horas a 37°C. Después del lavado, las perlas se incubaron con anticuerpos de ratón anti-E2 (6 µg/ml en PBS/BSA (al 0,5%)) a 4°C durante una noche. Las perlas se lavaron y se incubaron con 250 ng/ml de E2 en VHC purificada producida en células CHO (Accurate Chemicals, NY) durante una noche a 4°C. La identidad de la proteína E2 se confirmó mediante análisis de transferencia de Western con mAb anti-E2 (datos no mostrados).
- 50

- 55 *Ensayo de adhesión de perlas fluorescentes*

- Este se realizó como se describe por Geijtenbeek *et al.*, (Blood, 94, 754-764 (1999)), con modificaciones. Las células se retiraron del cultivo por solución de disociación celular (Sigma) durante 5 minutos a 37°C y se lavaron 3 veces en tampón de adhesión (Tris-HCl 20 mM [pH 8,0], NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 2 mM y BSA al 0,5%). Las células se resuspendieron a una concentración final de 5x10⁶ células/ml en tampón de adhesión durante 30 minutos a 4°C para recargar los niveles de Ca²⁺. Las células (5 x 10⁵) se preincubaron con manano (20 µg/ml; Sigma), anticuerpos (0,1-10 µg/ml), EDTA (5 mM) o EGTA (5 mM) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron perlas fluorescentes recubiertas con E2 de VHC (20 perlas/célula) y la suspensión se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se determinó la adhesión midiendo el porcentaje de células que se habían unido a las perlas fluorescentes mediante citometría de flujo usando un FACScan (Becton Dickinson, Oxnard, CA).
- 60
- 65

Resultados

Para investigar si la proteína DC-SIGN y la proteína DC-SIGN-R son receptores para E2 de VHC, se produjeron líneas celulares HeLa estables mediante transfección de ADNc que codificaban DC-SIGN o DC-SIGN-R. El análisis de citometría de flujo se realizó en clones seleccionados de estas células (HeLa-DC-SIGN y HeLa-DC-SIGN-R) usando un panel de anticuerpos específicos anti-DC-SIGN o anti-DC-SIGN-R que, según se había informado, reaccionaban con tejidos humanos (Figura 4 y Tabla 1 presentada a continuación). Se expresaron altos niveles de moléculas DC-SIGN y DC-SIGN-R en la superficie celular de las líneas celulares respectivas. Las células parentales HeLa no se tiñeron con ninguno de los anticuerpos anti-DC-SIGN o anti-DC-SIGN-R.

TABLA 1

Expresión en la superficie celular de DC-SIGN y DC-SIGN-R en líneas celulares estables HeLa-DC-SIGN y HeLa-DC-SIGN-R

Clon de Anticuerpo	Especificidad	% de Células Positivas (Intensidad de Fluorescencia Media)		
		HeLa-DC-SIGN	HeLa-DC-SIGN-R	HeLa parental
507 (D)	DC-SIGN	90,6 (81,1)	3,5 (17,1)	0,8 (7,8)
612 (X)	DC-SIGN, DC-SIGN-R	67,3 (46,6)	94,8 (102,1)	0,3 (8,1)
604 (L)	DC-SIGN-R	1,1 (14,2)	96,0 (128,9)	0,1 (8,6)
Control de Isotipo	Ninguna	1,0 (16,9)	2,8 (13,7)	0,1 (7,9)

Para determinar si DC-SIGN y DC-SIGN-R se unen a la glicoproteína E2 de VHC, se adaptó un ensayo de adhesión de citometría de flujo (Geijtenbeek, *et al.*, Blood, 94, 754-764 (1999)). La proteína E2 de VHC producida en células CHO se capturó en perlas fluorescentes usando un panel de mAAb anti-E2, que se incubaron con células DC-SIGN- y DC-SIGN-R-HeLa a una proporción de 20 perlas por célula. Las perlas recubiertas con E2 de VHC se unieron de forma eficaz a ambos tipos de células y la unión se midió de forma eficaz por manano (Figura 5) y EDTA o EGTA (datos no mostrados). Se observaron bajos niveles de adhesión de fondo en la línea celular parental HeLa no transfectada, que no expresa DC-SIGN ni DC-SIGN-R. Los niveles de unión eran dependientes del mAAb anti-E2 usado para el recubrimiento, sin embargo la tendencia fue similar para células con DC-SIGN y DC-SIGN-R. Las perlas conjugadas solamente con anticuerpo y sin proteína E2, no se unieron a las células (datos no mostrados).

El panel de mAAb anti-DC-SIGN y anti-DC-SIGN-R se ensayó con respecto a su efecto sobre la adhesión de E2:DC-SIGN/DC-SIGN-R en el ensayo de unión a perlas fluorescentes (Figura 6). La unión de E2 a DC-SIGN-R se inhibió por DC4, un mAAb que reconoce tanto la región de DC-SIGN como la de DC-SIGN-R, sin embargo, la unión a DC-SIGN se inhibía solamente de manera moderada por un subconjunto de mAAb del panel, lo que sugería que la E2 puede interactuar con diferentes sitios en estas moléculas. DC4 no inhibe la unión del lentivirus o la unión de ICAM-3 a DC-SIGN y DC-SIGN-R, por lo tanto, puede representar un nuevo inhibidor específico para VHC.

Discusión

Por lo tanto, se ha demostrado que la glicoproteína E2 de VHC interacciona con DC-SIGN y DC-SIGN-R, y que el manano, los quelantes de calcio y un mAAb anti-DC-SIGN/DC-SIGN-R inhiben esta interacción. Estas observaciones son nuevas, y la expresión de estos receptores de VHC potenciales en DC-SIGN y en endotelio tiene implicaciones importantes para el ciclo de vida viral. La proteína DC-SIGN expresada en DC puede transmitir el VHC en trans a células susceptibles de una manera similar a VIH, y la expresión de DC-SIGN-R en el hígado y en la placenta puede dictar el tropismo viral y la patogénesis posterior.

Las células endoteliales sinusoidales hepáticas están en contacto continuo con leucocitos en tránsito y pueden capturar virus, células apoptóticas y antígenos de la sangre y promover la infección en trans de células diana. Por lo tanto, es posible que DC-SIGN-R promueva la infección de estas células, estableciendo de este modo un depósito para la producción de nuevos virus que entrarán en hepatocitos. Un mecanismo similar puede funcionar para la transmisión vertical de VHC a través de la placenta a término, un tejido que contiene elevados niveles de DC-SIGN-R. La inhibición de estas interacciones representa estrategias terapéuticas y profilácticas para la enfermedad por VHC. Aún no se ha esclarecido el papel de DC-SIGN y DC-SIGN-R como moléculas de encadenamiento que organizan el tráfico y la localización de VHC en el hígado, sin embargo, sus interacciones con E2 de VHC representan dianas nuevas para la intervención terapéutica.

Segundo Conjunto de Experimentos

Resumen

Se describe un inhibidor de la unión de VHC a DC-SIGN y/o DC-SIGN-R que anula la unión de sueros positivos a VHC o viriones purificados en el ensayo descrito a continuación. Este inhibidor puede interactuar con el virus, con el receptor o con ambos.

Unión de suero a células

Se cultivan líneas celulares HeLa (HeLa-DC-SIGN, HeLa-DC-SIGN-R) o células HeLa parentales durante una noche en DMEM que contiene FBS al 10% en una placa de 24 pocillos a 1×10^5 células/pocillo. Al día siguiente, las células se lavan una vez con un tampón de adherencia y después se bloquean con tampón de adherencia que contiene suero de cabra inactivado por calor al 10% durante 20 minutos a 37°C. Las células se lavan una vez con tampón de adherencia y el o los inhibidores se añaden durante una hora en tampón de adhesión a la mitad de los pocillos. Previamente se diluyen diez μl de suero positivo para ARN de VHC (positivo para el virus) o negativo para ARN de VHC (negativo para el virus) hasta un volumen final de 200 μl , y se añaden a los pocillos. También se pueden añadir el o los inhibidores a alícuotas de los sueros durante una hora para permitir la interacción con el virus. Se permite que el virus se una a las células durante una hora a 37°C con suave agitación cada 15 minutos. Finalmente, el suero se retira y las células se lavan cinco veces con tampón de adherencia.

Extracción de ARN viral

El ARN viral se extrae de las células usando un kit Mini Spin de ARN viral de QIAmp (Qiagen) con modificaciones. En resumen, se añaden dos extracciones con 280 μl de tampón de lisis por pocillo y se transfieren a un tubo de 1,7 ml. La placa vacía se lava con 140 μl de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco con calcio y magnesio, y los líquidos de lavado se agrupan en el mismo tubo. La extracción de ARN y la unión a columnas spin se realiza usando las directrices del fabricante. Después de un lavado con tampón de lavado, se retira el ADN de la columna mediante el tratamiento con DNasa sin RNasa (Qiagen) usando las directrices del fabricante. El ARN se lava y se eluye en dos etapas usando 30 μl y 40 μl de tampón de elución, y los eluatos se combinan.

RT-PCR específica para VHC

Se combina medio nmol de cebador RJD-5 con 0,5 μl de ARN extraído en un volumen final de 6 μl . Las muestras se calientan durante 10 minutos a 70°C y después se enfrían hasta 4°C usando un sistema de PCR GeneAmp (Perkin Elmer). En una mezcla de reacción de 10 μl , el molde precalentado se combina con 1xTampón de Primera Cadena, DTT 10 mM, desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTP) 5 mM, y 7,5 U de ThermoScript (Invitrogen), la mezcla se incuba a 58°C durante 50 minutos, y después a 85°C durante 5 minutos antes del enfriamiento a 4°C. De esta reacción de RT, se usan 5 μl como molde para la PCR en una reacción de 50 μl que contiene 1 x Tampón de PCR de Alta Fidelidad, MgSO_4 2 mM, dNTP 2 mM, 50 pmol de cebadores RJD-1 y RJD-5 y 1,25 U de ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum Taq (Invitrogen). La amplificación por PCR se realiza usando el método de Young *et al* (Young KK, Resnik RM, Myers TW. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. J Clin Microbiol. 1993 Apr;31(4):886-6).

Transferencia de los productos de RT-PCR

Se resuelven diez μl de cada reacción de RT-PCR en un gel de agarosa al 1% que contiene un marcador de ADN biotinilado (NEB). El gel se transfiere por capilaridad en una membrana de nitrocelulosa Protran (tipo BA-85, Schleicher and Schull) siguiendo el método de transferencia de Southern descrito en Sambrook, Fritsch y Maniatis (Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. en Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989). Al día siguiente, el ADN se entrecruza con la membrana a 2400 J/m² usando un StrataLinker (Stratagene) y se seca a temperatura ambiente durante al menos una hora.

Hibridación para detectar VHC

La transferencia se incuba durante 4 horas a 63°C en solución de prehibridación. La solución de prehibridación contiene 5x solución de Denhardt [BSA sin ácidos grasos al 0,2% (p/v) (JRH Biosciences), polivinilpirrolidona polivi-

nilo al 0,2% (p/v) (PVP, Sigma), Ficoll-400 al 0,2% (p/v) (Sigma)], 6 x SSC (NaCl 0,9 M, citrato sódico 90 mM, pH 7,4), dodecilsulfato sódico al 0,5% (p/v) (SDS, Promega), y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque (Invitrogen). Después de la incubación se añade 1 pmol/ml de cebador RJD-6 o RJD-7 a la solución de prehibridación para preparar la solución de hibridación y se incuba durante una noche a 63°C. A la mañana siguiente, la transferencia se lava dos veces durante 5 minutos en tampón de lavado [2 x SSC, SDS al 0,1% (p/v)] a temperatura ambiente, dos veces durante 15 minutos en tampón de lavado a 63°C, y una vez más en tampón de lavado a temperatura ambiente. Después, la mancha de transferencia se lava una vez durante 5 minutos en PBST [solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin calcio y magnesio, Tween-20 al 0,05% (v/v)]. Después, la mancha de transferencia se incuba con estreptavidina-HRP (Amersham) a 1/1500 en PBST durante 45 minutos a temperatura ambiente. La mancha de transferencia se lava dos veces rápidamente y después tres veces durante 15 minutos en PBST. La mancha de transferencia se revela usando Western Lightning (NEN/Perkin Elmer) y película Kodak. Se ejemplifica una señal positiva para ARN de HCV por una banda específica de 243 pares de bases. Se compara la intensidad de la banda de 243 pares de bases en presencia y en ausencia de inhibidor, y una disminución en la intensidad indica la inhibición de la unión de VHC.

Nombre del Oligo	Secuencia
RJD-1 (KY80 ¹)	5'-GCA GAA AGC GTC TAG CCA TGG CGT-3'
RJD-5 (KY78 ¹)	5'-CTC GCA AGC ACC CTA TCA GGC AGT-3'
RJD-6	5'-biotina-GGA GAG CCA TAG TGG TCT GCG GAA C-3'
RJD-7 (KY88 ¹)	5'-biotina-GTT GGG TCG CGA AAG GCC TTG TGG T-3'

Tercer Conjunto de Experimentos

Resumen

Se describe un nuevo método mejorado para detectar VHC en muestras de seres humanos (sangre, suero, plasma, tejido, fluido amniótico, etc.) que utiliza el ensayo descrito en el ejemplo proporcionado más adelante. En este método, las muestras se ensayan en el ensayo de unión a células (ensayo SIGN) para determinar la unión a células HeLa que expresan DC-SIGN y/o DC-SIGN-R. Como control, se usa el ensayo sin células convencional a diluciones variables de muestra para determinar el límite de detección y la linealidad del ensayo de SIGN. Este ensayo proporciona información cuantitativa adicional sobre la carga viral de VHC (por ejemplo, una mayor sensibilidad para detectar la presencia de VHC en una muestra biológica), además de propiedades cualitativas (unión a DC-SIGN o a DC-SIGN-R) del virus presente en la muestra. Este ensayo proporciona nueva información relevante para el uso del receptor, la distribución de cuasiespecies virales (por ejemplo, fenotipos patogénicos) y, por lo tanto, tiene utilidad para controlar la progresión de la enfermedad clínica.

Unión de muestra a células

Se cultivan líneas celulares HeLa (HeLa-DC-SIGN, HeLa-DC-SIGN-R) o células HeLa parentales durante una noche en DMEM que contiene FBS al 10% en una placa de 24 pocillos con 1×10^5 células/pocillo. Al día siguiente, las células se lavan una vez con tampón de adherencia y después se bloquean con tampón de adherencia que contiene suero de cabra inactivado por calor al 10% durante 20 minutos a 37°C. Las células se lavan una vez con tampón de adherencia. Se diluye un volumen fijo (por ejemplo 10-1000 μ l) de suero positivo para ARN de VHC (positivo para el virus) o negativo para ARN de VHC (negativo para el virus), u otras muestras (plasma, extractos tisulares, etc.) en tampón de adherencia hasta un volumen final de 200 μ l, y se prepara un intervalo de 10 diluciones seriadas. Estas suspensiones se añaden a los pocillos durante 1 hora para permitir la interacción con el virus y se incuban a 37°C con suave agitación cada 15 minutos. Finalmente, la muestra se retira y las células se lavan cinco veces con tampón de adherencia. Para determinar el límite de detección y la linealidad del ensayo, se usan alícuotas de las mismas muestras sin unión a células (muestras sin células) en etapas posteriores como se analiza a continuación.

Extracción de ARN viral

Se extrae ARN viral de las células, o muestras sin células, usando un kit Mini Spin de ARN viral de QIAmp (Qiagen) con modificaciones. En resumen, se añaden dos extracciones con 280 μ l de tampón de lisis por pocillo y se transfieren a un tubo de 1,7 ml. La placa vacía se lava con 140 μ l de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco con calcio y magnesio, y los líquidos de lavado se agrupan en el mismo tubo. La extracción de ARN y la unión a columnas spin se realiza usando las directrices del fabricante. Después de un lavado con tampón de lavado, se retira el ADN de la columna por tratamiento con DNasa sin RNasa (Qiagen) usando las directrices del fabricante. El ARN se lava y se eluye en dos etapas usando 30 μ l y 40 μ l de tampón de elución, y los eluatos se combinan.

RT-PCR específica para VHC

Se combina medio nmol de cebador RJD-5 con 0,5 μ l de ARN extraído en un volumen final de 6 μ l. Las muestras se calientan durante 10 minutos a 70°C y después se enfrían hasta 4°C usando un sistema de PCR GeneAmp (Perkin Elmer). En una mezcla de reacción de 10 μ l, el molde precalentado se combina con 1xTampón de Primera Cadena, DTT 10 mM, desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTP) 5 mM, y 7,5 U de ThermoScript (Invitrogen), la mezcla se incuba a 58°C durante 50 minutos y después a 85°C durante 5 minutos antes del enfriamiento a 4°C. De esta reacción de RT, 5 μ l se usan como molde para la PCR en una reacción de 50 μ l que contiene 1 x Tampón de PCR de Alta Fidelidad, MgSO₄ 2 mM, dNTP 2 mM, 50 pmol de cebadores RJD-1 y RJD-5 y 1,25 U de ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum Taq (Invitrogen). La amplificación por PCR se realiza usando el método de Young *et al.* (Young KK, Resnick RM, Myers TW. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. J Clin Microbiol. 1993 Apr 3; 31(4):886-6).

Transferencia de los productos de RT-PCR

Se resuelven diez μ l de cada reacción de RT-PCR en un gel de agarosa al 1% que contiene un marcador de ADN biotinilado (NEB). El gel se transfiere por capilaridad sobre una membrana de nitrocelulosa Protran (tipo BA-85, Schleicher and Schull) siguiendo el método de transferencia de Southern descrito en Sambrook, Fritsch y Maniatis (Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. en Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989). El día siguiente, el ADN se entrecruza con la membrana a 2400 J/m² usando un Stratalinker (Stratagene) y después se seca a temperatura ambiente durante al menos una hora.

Hibridación para detectar VHC

La mancha de transferencia se incuba durante 4 horas a 63°C en solución de prehibridación. La solución de prehibridación contiene 5 x solución de Denhardt [BSA sin ácidos grasos al 0,2% (p/v) (JRH Biosciences), polivinilpirrolidona al 0,2% (p/v) (PVP, Sigma), Ficoll-400 al 0,2% (p/v) (Sigma)], 6 x SSC (NaCl 0,9 M, citrato sódico 90 mM, pH 7,4), dodecilsulfato sódico al 0,5% (p/v) (SDS, Promega) y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque (Invitrogen). Después de la incubación se añade 1 pmol/ml de cebador RJD-6 o RJD-7 a la solución de prehibridación para preparar la solución de hibridación, que se incuba durante una noche a 63°C. A la mañana siguiente, la mancha de transferencia se lava dos veces durante 5 minutos en tampón de lavado [2 x SSC, SDS al 0,1% (p/v)] a temperatura ambiente, dos veces durante 15 minutos en tampón de lavado a 63°C y una vez más en tampón de lavado a temperatura ambiente. Después, la mancha de transferencia se lava una vez durante 5 minutos en PBST [solución salina tampónada con fosfato de Dulbecco sin calcio y magnesio, Tween-20 al 0,05% (v/v)]. Después, la mancha de transferencia se incuba con estreptavidina-HRP (Amersham) a 1/1500 en PBST durante 45 minutos a temperatura ambiente. La mancha de transferencia se lava dos veces rápidamente y después tres veces durante 15 minutos en PBST. La mancha de transferencia se revela usando Western Lightening (NEN/Perkin Elmer) y película Kodak. Se ejemplifica una señal positiva para el ARN de HCV mediante una banda específica de 243 pares de bases. La intensidad de la banda de 243 pares de bases se compara entre muestras idénticas en el ensayo de unión a células (SING) y el ensayo sin células para determinar las diferencias cuantitativas y cualitativas. La diferencia en las intensidades de señal observadas en los ensayos de DC-SIGN y DC-SIGN-R proporciona información relevante para el receptor de VHC y el tropismo y, finalmente, para la progresión clínica.

Nombre del Oligo	Secuencia
RJD-1 (KY80 ¹)	5'-GCA GAA AGC GTC TAG CCA TGG CGT-3'
RJD-5 (KY78 ¹)	5'-CTC GCA AGC ACC CTA TCA GGC AGT-3'
RJD-6	5'-biotina-GGA GAG CCA TAG TGG TCT GCG GAA C-3'
RJD-7 (KY88 ¹)	5'-biotina-GTT GGG TCG CGA AAG GCC TTG TGG T-3'

Se pueden considerar numerosas realizaciones diferentes del ensayo anterior. Por ejemplo, se puede cuantificar el VHC capturado en células HeLa-DC-SIGN y HeLa-DC-SIGN-R usando otras lecturas convencionales, tales como mediante análisis de transferencia de Western de proteínas de VHC usando anticuerpos contra proteínas virales. En otra realización, se pueden inmovilizar proteínas DC-SIGN y DC-SIGN-R purificadas sobre una superficie, tal como una placa o perla, usando tecnologías convencionales y se pueden usar para capturar y concentrar VHC a partir de muestras del paciente. La cantidad de VHC se puede cuantificar por medición del número de genomas virales por métodos de RT-PCR como se describe, por análisis de proteínas virales por medio de transferencia de Western, por ELISA o por otras metodologías convencionales que se conocen bien por los especialistas en la técnica.

Un especialista en la técnica entenderá fácilmente que los métodos específicos y los resultados analizados en este documento son sólo ilustrativos de la invención, que se describe de manera más completa en las reivindicaciones que se proporcionan a continuación.

Referencias

1. **Alter**, H.J. and L.B. **Seef**. 1993. Transfusion-associated hepatitis. In "Viral Hepatitis" (Z.a.Thomas, Ed.). *Churchill Livingstone*, Edinburgh
2. **Anonymous**. 1999. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J.Viral.Hepat.* 6:35-47.
3. **Bashirova**, A.A., T.B. **Geijtenbeek**, G.C. van **Duijnhoven**, S.J. van **Vliet**, J.B. **Eilering**, M.P. **Martin**, L. **Wu**, T.D. **Martin**, N. **Viebig**, P. A. **Knolle**, V.N. **KewalRamani**, Y. van **Kooyk**, and M. **Carrington**. 2001. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (dc-sign)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes hiv-1 infection. *J.Exp.Med.* 193:671-678.
4. **Bertolini**, L., S. **Iacovacci**, A. **Ponzetto**, G. **Gorini**, M. **Battaglia**, and G. **Carloni**. 1993. The human bone-marrow-derived B-cell line CE, susceptible to hepatitis C virus infection. *Res.Virol.* 144:281-285.
5. **Carloni**, G., S. **Iacovacci**, M. **Sargiacomo**, G. **Ravagnan**, A. **Ponzetto**, C. **Peschle**, and M. **Battaglia**. 1993. Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection. *Arch.Virol.Suppl.* 8:31-39.
6. **Cocquerel**, L., S. **Duvet**, J.C. **Meunier**, A. **Pillez**, R. **Cacan**, C. **Wychowski**, and J. **Dubuisson**. 1999. The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *J.Virol.* 73:2641-2649.
7. **Cocquerel**, L., J.C. **Meunier**, A. **Pillez**, C. **Wychowski**, and J. **Dubuisson**. 1998. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J.Virol.* 72:2183-2191.
8. **Cocquerel**, L., C. **Wychowski**, F. **Minner**, F. **Penin**, and J. **Dubuisson**. 2000. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J.Virol.* 74:3623-3633.
9. **Dubuisson**, J. 2000. Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Curr.Top. Microbiol.Immunol.* 242:135-148.
10. **Dubuisson**, J., H.H. **Hsu**, R.C. **Cheung**, H. B. **Greenberg**, D.G. **Russell**, and CM. **Rice**. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J.Virol.* 68:6147-6160.
11. **Dubuisson**, J. and CM. **Rice**. 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J.Virol.* 70:778-786.
12. **Duvet**, S., L. **Cocquerel**, A. **Pillez**, R. **Cacan**, A. **Verbert**, D. **Moradpour**, C. **Wychowski**, and J. **Dubuisson**. 1998. Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *J.Biol.Chem.* 273:32088-32095.
13. **Flint**, M., J. **Dubuisson**, C. **Maidens**, R. **Harrop**, G.R. **Guile**, P. **Borrow**, and J. A. **McKeating**. 2000. Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J.Virol.* 74:702-709.
14. **Flint**, M. and J.A. **McKeating**. 1999. The C-terminal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein confers localization within the endoplasmic reticulum. *J.Gen.Virol.* 80 (Pt 8):1943-1947.
15. **Flint**, M., J.M. **Thomas**, CM. **Maidens**, C. **Shotton**, S. **Levy**, W.S. **Barclay**, and J. A. **McKeating**. 1999. Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J.Virol.* 73:6782-6790.
16. **Fry**, D.E. and L.M. **Flint**. 1997. Hepatitis: an overview of important issues. *Bull.Am.Coll.Surg.* 82:8-13.
17. **Geijtenbeek**, T.B., D.S. **Kwon**, R. **Torensma**, S.J. van **Vliet**, G. C. van **Duijnhoven**, J. **Middel**, I. L. **Cornelissen**, H.S. **Nottet**, V.N. **KewalRamani**, D.R. **Littman**, C.G. **Figdor**, and Y. van **Kooyk**. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597.
18. **Gilljam**, G. 1993. Envelope glycoproteins of HIV-1, HIV-2, and SIV purified with Galanthus nivalis agglutinin induce strong immune responses. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 9:431-438.
19. **Grakoui**, A., C. **Wychowski**, C. **Lin**, S.M. **Feinstone**, and CM. **Rice**. 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polypeptide cleavage products. *J.Virol.* 67:1385-1395.

20. **Higginbottom, A., E.R. Quinn, CC Kuo, M. Flint, L.H. Wilson, E. Bianchi, A. Nicosia, P.N. Monk, J. A. McKeating, and S. Levy.** 2000. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J.Virol.* 74:3642-3649.
- 5 21. **Hijikata, M., N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, and K. Shimotohno.** 1991. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:554 7-5551.
- 10 22. **Hong, Z., M. Beaudet-Miller, R.E. Lanford, B. Guerra, J. Wright-Minogue, A. Skelton, B.M. Baroudy, G.R. Reyes, and J.Y. Lau.** 1999. Generation of transmissible hepatitis C virions from a molecular clone in chimpanzees. *Virology* 256:36-44.
- 15 23. **Iacovacci, S., L. Bertolini, A. Manzin, M.B. Valli, M. Battaglia, A. Ponzetto, M. Clementi, and G. Carloni.** 1997. Quantitation of hepatitis C virus RNA production in two human bone marrow-derived B-cell lines infected *in vitro*. *Res.Virol.* 148:147-151.
- 20 24. **Iacovacci, S., A. Manzin, S. Barca, M. Sargiacomo, A. Serafino, M.B. Valli, G. Macioce, H.J. Hassan, A. Ponzetto, M. Clementi, C. Peschle, and G. Carloni.** 1997. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected *in vitro*. *Hepatology* 26:1328-1337.
- 25 25. **Jones, I.M., C. Chan-Fook, W.R. Jiang, and B.E. Clarke.** 2000. Receptors for hepatitis C virus. *J.Virol.* 74:10860-10861.
26. **Kato, N., T. Nakazawa, T. Mizutani, and K. Shimotohno.** 1995. Susceptibility of human T-lymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 206:863-869.
27. **Kolykhalov, A.A., E.V. Agapov, K.J. Blight, K. Mihalik, S.M. Feinstone, and CM. Rice.** 1997. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 277:570-574.
- 30 28. **Lagging, L.M., K. Meyer, R.J. Owens, and R. Ray.** 1998. Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J.Virol.* 72:3539-3546.
- 35 29. **Lanford, R.E., C. Sureau, J.R. Jacob, R. White, and T.R. Fuerst.** 1994. Demonstration of *in vitro* infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* 202:606-614.
30. **Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager.** 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.
- 40 31. **Matsuura, Y., T. Suzuki, R. Suzuki, M. Sato, H. Aizaki, I. Saito, and T. Miyamura.** 1994. Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology* 205:141-150.
- 45 32. **McHutchison, J.G., S.C. Gordon, E.R. Schiff, M.L. Shiffman, W.M. Lee, V.K. Rustgi, Z.D. Goodman, M.H. Ling, S. Cort, and J.K. Albrecht.** 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N.Engl.J.Med.* 339:1485-14 92.
- 50 33. **Meola, A., A. Sbardellati, E.B. Bruni, M. Cerretani, M. Pezzanera, A. Ceccacci, A. Vitelli, S. Levy, A. Nicosia, C. Traboni, J. McKeating, and E. Scarselli.** 2000. Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. *J.Virol.* 74:5933-5938.
- 55 34. **Meunier, J.C., A. Fournillier, A. Choukhi, A. Cahour, L. Cocquerel, J. Dubuisson, and C. Wychowski.** 1999. Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J.Gen.Virol.* 80 (Pt 4):887-896.
35. **Michalak, J.P., C. Wychowski, A. Choukhi, J.c. Meunier, S. Ung, CM. Rice, and J. Dubuisson.** 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J.Gen.Virol.* 78 (Pt 9):2299-2306.
- 60 36. **Op De Beeck, A., R. Montserret, S. Duvet, L. Cocquerel, R. Cacan, B. Barberot, M. Le Maire, F. Penin, and J. Dubuisson.** 2000. The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J.Biol.Chem.* 275:31428-31437.
- 65 37. **Patel, J., A.H. Patel, and J. McLauchlan.** 1999. Covalent interactions are not required to permit or stabilize the non-covalent association of hepatitis C virus glycoproteins E1 and E2. *J.Gen.Virol.* 80 (Pt 7):1681-1690.
38. **Petracca, R., F. Falugi, G. Galli, N. Norais, D. Rosa, S. Campagnoli, V. Burgio, E. Di Stasio, B. Giardina, M. Houghton, S. Abrignani, and G. Grandi.** 2000. Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J.Virol.* 74:4824-4830.

39. **Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani.** 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.
40. **Pohlmann, S., E.J. Soilleux, F. Baribaud, G.J. Leslie, L.S. Morris, J. Trowsdale, B. Lee, N. Coleman, and R.W. Doms.** 2001. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:2670-2675.
41. **Ralston, R., K. Thudium, K. Berger, C. Kuo, B. Gervase, J. Hall, M. Selby, G. Kuo, M. Houghton, and Q.L. Choo.** 1993. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J.Virol.* 67:6753-6761.
42. **Rice, CM.** 1996. Flaviviridae; The viruses and their replication. 3rd ed. In "Fields Virology" (B.N. Fields, Ed.) pp. 931-1034. *Lippincott-Raven Publishers*, Philadelphia
43. **Selby, M.J., E. Glazer, F. Masiarz, and M. Houghton.** 1994. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology* 204:114-122.
44. **Shimizu, Y.K., A. Iwamoto, M. Hijikata, R.H. Purcell, and H. Yoshikura.** 1992. Evidence for *in vitro* replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:5477-5481.
45. **Shimizu, Y.K., A.J. Weiner, J. Rosenblatt, D.C. Wong, M. Shapiro, T. Popkin, M. Houghton, H.J. Alter, and R.H. Purcell.** 1990. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:6441-6444.
46. **Smith, D.B. and P. Simmonds.** 1998. Hepatitis C virus: types, subtypes and beyond. In "Methods in molecular medicine" (Lau, Ed.), pp. 134-146. *Humana Press*, Totowa
47. **Soilleux, E.J., R. Barten, and J. Trowsdale.** 2000. DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J.Immunol.* 165:2937-2942.
48. **Spaete, R.R., D. Alexander, M.E. Rugroden, Q.L. Choo, K. Berger, K. Crawford, C. Kuo, S. Leng, C. Lee, and R. Ralston.** 1992. Characterization of the hepatitis C virus E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells. *Virology* 188:819-830.
49. **Takikawa, S., K. Ishii, H. Aizaki, T. Suzuki, H. Asakura, Y. Matsuura, and T. Miyamura.** 2000. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J.Virol.* 74:5066-5074.
50. **Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J.M. Binley, W.C. Olson, G.P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P.J. Maddon, and J. P. Moore.** 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384:184-187.
51. **Valli, M.B., G. Carloni, A. Manzin, F. Nasorri, A. Ponzetto, and M. Clementi.** 1997. Hepatitis C virus infection of a Vero cell clone displaying efficient virus-cell binding. *Res.Virol.* 148:181-186.
52. **Wunschmann, S, J.D. Medh, D. Klinzmann, W.N. Schmidt, and J.T. Stapleton.** 2000. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J.Virol.* 74:10055-10062.
53. **Yanagi, M., R.H. Purcell, S.U. Emerson, and J. Bukh.** 1999. Hepatitis C virus: an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. *Virology* 262:250-263.
54. **Galun et al** (1995) *J. Inf Dis* 172: 25.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo o una parte del mismo en una cantidad eficaz para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta del virus de la hepatitis C (VHC) a una proteína DC-SIGN presente en la superficie de una célula, para la fabricación de un medicamento para administración a un sujeto para inhibir la infección por VHC de las células de dicho sujeto susceptibles a la infección por VHC.

2. Uso de un anticuerpo o una parte del mismo en una cantidad eficaz para inhibir la unión de una glicoproteína de la envuelta del virus de la hepatitis C (VHC) a una proteína DC-SIGNR presente en la superficie de una célula, para la fabricación de un medicamento para administración a un sujeto para inhibir la infección por VHC de una célula diana del sujeto cuya susceptibilidad a la infección por VHC aumenta cuando el VHC se une a una célula que expresa la proteína DC-SIGNR.

3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que la célula susceptible a la infección por VHC es un hepatocito de hígado.

4. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que la célula que expresa la proteína DC-SIGNR es una célula sinusoidal de hígado.

5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o la parte del mismo es un anticuerpo monoclonal.

6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o la parte del mismo es un anticuerpo policlonal.

7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o la parte del mismo es un anticuerpo humanizado.

8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o la parte del mismo es un anticuerpo quimérico.

9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o la parte del mismo es una parte del anticuerpo.

10. El uso de la reivindicación 9, en el que la parte del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo.

11. El uso de la reivindicación 9, en el que la parte del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo.

12. El uso de la reivindicación 9, en el que la parte del anticuerpo comprende una parte Fab.

13. El uso de la reivindicación 9, en el que la parte del anticuerpo comprende una parte F(ab')₂.

14. El uso de la reivindicación 9, en el que la parte del anticuerpo comprende una parte Fd.

15. El uso de la reivindicación 9, en el que la parte del anticuerpo comprende una parte Fv.

16. El uso de la reivindicación 9, en el que la parte del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo.

17. El uso de la reivindicación 9, en el que la parte del anticuerpo comprende uno o más dominios de CDR del anticuerpo.

18. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que la glicoproteína de la envuelta de VHC es una proteína de la envuelta E1 de VHC.

19. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que la glicoproteína de la envuelta de VHC es una proteína de la envuelta E2 de VHC.

20. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que el anticuerpo o la parte del mismo se va a administrar por vía oral, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía tópica o por suministro mediado por liposomas.

21. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que el sujeto es un ser humano, un primate, un equino, un ovino, un ave, un bovino, un porcino, un canino, un felino o un ratón.

22. El uso de la reivindicación 21, en el que la cantidad eficaz del anticuerpo o de la parte del mismo está comprendida entre 1 mg y 50 mg por kg de peso corporal del sujeto.

ES 2 296 985 T3

23. El uso de la reivindicación 22, en el que la cantidad eficaz del anticuerpo o de la parte del mismo está comprendida entre 2 mg y 40 mg por kg de peso corporal del sujeto.

24. El uso de la reivindicación 23, en el que la cantidad eficaz del anticuerpo o de la parte del mismo está comprendida entre 3 mg y 30 mg por kg de peso corporal del sujeto.

25. El uso de la reivindicación 24, en el que la cantidad eficaz del anticuerpo o de la parte del mismo está comprendida entre 4 mg y 20 mg por kg de peso corporal del sujeto.

26. El uso de la reivindicación 25, en el que la cantidad eficaz del anticuerpo o de la parte del mismo está comprendida entre 5 mg y 10 mg por kg de peso corporal del sujeto.

27. El uso de la reivindicación 19, en el que el anticuerpo o la parte del mismo se administra al menos una vez al día.

28. El uso de la reivindicación 27, en el que el anticuerpo o la parte del mismo se administra diariamente.

29. El uso de la reivindicación 19, en el que el anticuerpo o la parte del mismo se administra cada dos días.

30. El uso de la reivindicación 19, en el que el anticuerpo o la parte del mismo se administra cada seis a ocho días.

31. El uso de la reivindicación 30, en el que el anticuerpo o la parte del mismo se administra semanalmente.

32. Un método para determinar si un compuesto puede inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;

b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con suficiente proteína DC-SIGNR detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGNR sobre la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada, en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada para formar un complejo;

c) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

d) poner en contacto el complejo con el compuesto;

e) determinar si se ha desplazado algo de proteína DC-SIGNR del complejo, indicando el desplazamiento de la proteína DC-SIGNR del complejo que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC, determinándose de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

33. Un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

a) inmovilizar una proteína DC-SIGNR sobre un soporte sólido;

b) poner en contacto la proteína DC-SIGNR inmovilizada con suficiente glicoproteína de la envuelta de VHC detectable para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC sobre la proteína DC-SIGNR inmovilizada, en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

d) poner en contacto el complejo con el compuesto;

e) determinar si se ha desplazado algo de glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo, indicando el desplazamiento de la glicoproteína de la envuelta de VHC del complejo que el compuesto se une a la proteína DC-SIGNR, determinándose de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

34. Un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con suficiente proteína DC-SIGNR detectable para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGNR en la glicoproteína de la envuelta de VHC, en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC para formar un complejo;

b) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

c) medir la cantidad de proteína DC-SIGNR que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo;

d) poner el contacto el complejo con el compuesto para desplazar la proteína DC-SIGNR del complejo;

e) medir la cantidad de proteína DC-SIGNR que está unida al compuesto en presencia del compuesto; y

5 f) comparar la cantidad de proteína DC-SIGNR unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en la etapa (e) con la cantidad medida en la etapa (c), indicando una cantidad reducida medida en la etapa (e) que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC, identificándose de este modo el compuesto como un compuesto que es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula.

10 35. Un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

a) inmovilizar una glicoproteína de la envuelta de VHC sobre un soporte sólido;

15 b) poner en contacto la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada con el compuesto y la proteína DC-SIGNR detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en ausencia del compuesto para formar un complejo;

c) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

20 d) comparar la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC inmovilizada en ausencia del compuesto;

25 e) indicando una cantidad reducida de proteína DC-SIGNR medida en presencia del compuesto que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGNR, determinándose de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

30 36. El método de la reivindicación 35, en el que la cantidad de DC-SIGNR detectable es suficiente para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGNR en la glicoproteína de la envuelta de VHC.

37. Un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

35 a) inmovilizar una proteína DC-SIGNR sobre un soporte sólido;

b) poner en contacto la proteína DC-SIGNR inmovilizada con el compuesto y la glicoproteína de la envuelta de VHC detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR inmovilizada a la glicoproteína de la envuelta de VHC en ausencia del compuesto para formar un complejo;

40 c) retirar la glicoproteína de la envuelta de VHC no unida;

45 d) comparar la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC detectable que está unida a la proteína DC-SIGNR inmovilizada en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de glicoproteína de la envuelta de VHC detectable que se une a la proteína DC-SIGNR inmovilizada en ausencia del compuesto;

50 e) indicando una cantidad reducida de glicoproteína de la envuelta de VHC medida en presencia del compuesto que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGNR, para determinar de este modo si el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

38. El método de la reivindicación 37, en el que la cantidad de la glicoproteína de la envuelta de VHC detectable es suficiente para saturar todos los sitios de unión para la glicoproteína de la envuelta de VHC sobre la proteína DC-SIGNR.

55 39. Un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la infección por VHC de una célula, que comprende:

60 a) poner en contacto una glicoproteína de la envuelta de VHC con el compuesto y la proteína DC-SIGNR detectable en condiciones que permitan la unión de la proteína DC-SIGNR a la glicoproteína de la envuelta de VHC en ausencia del compuesto para formar un complejo;

b) retirar la proteína DC-SIGNR no unida;

65 c) comparar la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que está unida a la glicoproteína de la envuelta de VHC en el complejo en presencia del compuesto con la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable que está unida al compuesto en ausencia del compuesto;

ES 2 296 985 T3

indicando una cantidad reducida de proteína DC-SIGNR medida en presencia del compuesto que el compuesto se une a la glicoproteína de la envuelta de VHC o a la proteína DC-SIGNR, determinándose de este modo que el compuesto es un compuesto capaz de inhibir la infección por VHC de la célula.

5 40. El método de la reivindicación 39, en el que la cantidad de proteína DC-SIGNR detectable es suficiente para saturar todos los sitios de unión para la proteína DC-SIGNR en la glicoproteína de la envuelta de VHC.

10 41. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 32, 34, 35 ó 37, en el que la proteína DC-SIGNR detectable está marcada con un marcador detectable.

15 42. El método de la reivindicación 33 ó 39, en el que la glicoproteína de la envuelta de VHC detectable está marcada con un marcador detectable.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

```
msdskeprlq qlgllleeeql rglgfrqtrg ykslagclgh gplvlqllsf tllaglllvq  
skvpssisqe qsrqdaiyqn ltqlkaavge lseksklgei yqeltqlkaa vgelpekskl  
qeiyqeltrl kaavgelpek sklqeiyqel twlkaavgel pekskmqei yqeltrlkaav  
gelpekskqg eiyqeltrlk aavgelpeks kqqeiyqelt rlkaavgelp ekskqqeiyq  
eltqlkaave rlchpcpwew tffqgncyfm snsqrnwhds itackevgaq lvviksaeeq  
nflqlqssrs nrftwmglsd lnqegtwwv dgspllpfks qywnrgepnn vgeedcaefs  
gngwmdkcn lakfwickks aascsrdeeq flspapatpn pppa
```

FIGURA 2

```
msdskeprvq qlglleedpt tsgirlfprd fqfqqihghk sstgclghga lvlqllsfml  
lagvlvailv qvskvpssls qeqseqdaiy gnltqlkaav gelseksklq eiyqeltqlk  
aavgelpeks klqeiyygelt rlkaavgelp eksklqeiyy eltrlkaavg elpeksklqe  
iyqeltrlka avgelpeksk lqeiyyelte lkaavgelpe ksklqeiyye ltqlkaavge  
lpdqskqqqi yqeltdlhta ferlcrhpcp dwtffqgncy fmsnsqrnwh dsvtacqevr  
aqlvviktae eqnflqlqts rsnrfswmgl sdlnqegtwg wvdgsplspq fqrywnsgep  
nnsqnedxae fsgsgwndnr cdvdnywick kpaacfrde
```

FIGURA 3

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRL
 GVRATRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPPLYGNEGCGWAGWLLSPRG
 SRPSWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLED
 GVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSSGLYHVTNDCPNSSIVYEAAD
 AILHTPGCVPCVREGNASRCWAVTPTVATRDGKLPPTQLRRHIDLLVGSATLCSALY
 VGDLCGSVFLVGQLF TFSRRHWTQDCNCSIYPGHI TGHMAWDMMMNWSPTAALVV
 AQLLRIPQAIMDMIAGAHWGLAGIAYFSMVGNWAKVLVVL L L L FAGVDAETHVTGSSA
 GRITAGLVGLLTPGAKONIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSS
 GCPERLASCRRLTDFAGWGPI SYANGSGLDERPYCWHYPPRPGIVPAKSVCGFVYC
 FTPSPVVGTDRSGAPTYSWGANDTDVFLWNTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGA
 PPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINY
 TIFKVRMYVGGVEHRLAECNWRGERCDLEDRSELSPLLLSTTOWQVLPCTTL
 PALSTGLIHLHONI VDVQYLYGVGSSIASWAIKWEYVVL L L L LADARVCSC L W M M L L
 ISQEAALENLVI LNAASLAGTHGLVSFLVFFCFAWYLKGRWVPGAVYAFYGMWPLLL
 LLLALPQRAYALDTEVAASCGGVVLVGLMALTLSPYYKRYISWCMWWLQYFLTRVEAQ
 LHVWVPLNVRGGRDAVILLMCVVHPTLVFDITKLLLAIFGPLWILQASLLKVPYFVR
 VQGLLRICALARKIAGGHYVOMAI I KLGA LTGTYYVNH L TPLRDWAHNGLRDLAVAVE
 PVVFSRMEKLI TWGADTAACGDI INGLPVSARRGOE I L L G P A D G M V S K G W R L L A P I T
 AYAQQTRGLGCI I TSLTGRDKJQVEGEVQIVSTATOTFLATCINGVCWTVYHGAGTR
 TIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPA PQGSRSLT PCTCGSSDLYLVTRHADVI PVRRRG
 DSRGSLSPRPISYKLGSSGGPI LCPAGHAVGLFRAAVCTRGVAKAVDFI PVENLETT
 MRSVPFTDNSSPPAVPQSFQVAHLHAPTSGSKSTKVPAAYAAQGYKVLVLPVSVAATL
 GFGAYMSKAHGVDPNIRTGVRTITTGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDII ICDECHS
 TDATSI LGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVSHPNIEEVALSTTGEIPFYGK
 AIPLEVIKGGRLIFCHSKKKCELA AKLVALGINAVAYYRGLDVSVIPTSGDVVVVS
 TDALMTGFTGDFSDVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETTTLPQDAVSRTORRGRTGRG
 KPGIYRFVAPGERPSGMFDSVLCCECYDAGCAWYELTPAETTVRLRAYMNTPGLFVQC
 DHLEFWEGVFTGLTHIDAHFLSQTQSGENFPYLVAYQATVCARAQAPPPSWDQMWKC
 LIRLKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEVT L THPITKYIMTMSADLEVVSTWVLVGGVLA
 ALAAYCLSTGCVVIVGRI VLSGKPAI I PDREVL YQEFDEMEEC S QHLPYIEQGMMLAE
 OFKQKALGLLQTASRQAEVITPAVOTNWQKLEVFWAKHMWNFISG IQYLAGLSTLPGN
 PAIASLMAFTAAVTSP LTTGQTL LFNILGGWVAAQLAAPGAATAFVGAGLAGAAIGSV
 GLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFKIMSGEVPSTEDLVNLLPAILSPGALVVGVC AA
 ILRRHVGPGE GAVQWMNRLIAFASRGNHVSPTHYVPESDAAARVTAI LSSSLTVTQLLR
 RLHQWISSECTTPCSGSLRDIWDWICEVLSDFKTWLKAKLMPQLPGIPFVSCQRGYR
 GVWRGDGIMHTRCHCGAEITGHVKNGTMRI VGPRTCRNMWSGTFPINAYTTGCTPLP
 APNYKFALWRVSAEYVEIRRVGDFHYVSGMTTDLNLCPCQIPSPFEFTLEDGVR LHR
 FAPPCKPLLRREVSFRVGLHEY PVGSQLPCEPEPDVAVLTSMLTDPSHITAEAGRRL
 ARGSPPSMASSASQLSAPSLKATCTANHDSFDAELIEANLLWRQEMGGNITRVESEN
 KVVIDLSDPLVAEEDEREVSVP AEI LRKSRRFARALPVHARPDYNPPLVETWKKPDY
 EPPVVHGCPLPPPRSPVPPPRKKRTVVLTESTLSTALAE L ATKSPGSSSTSGITGON
 TTTSSPAPSGCPPDSVSESYSMPPLEGEPGDPDLSDGSWSTVSSGADTEDVVCSSM
 SYSWTGALVTPCAAEQKLPINALSNSLLRHHNLVYSTTSRSACQROKQVTFDRLQVL
 DSHYQDVLKEVKAAA SKVKANLLSVEEACSLTPPHSAKSKFGYGAKDVRCHARKAVAH
 INSVWKD LLED SVTPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGGRKPARLI VFPDLGVRVCEKMA LY
 DVVSKLPLAVMGSSYGFQYSPGORVEFLVQAWKSKKTPMGFSYDTRCFDSTVTESDIR
 TEEATYQCCDLDPQARVAIKSLTERLYVGGPLTNSRGENCYRRCRASGVLTTS CGNT
 LTCYIKARAACRAAGLQDCTMLVCGDDL VVICESAGVQEDAASLRAFTEAMTRY SAPP
 GDPPQPEYDLELITSCSSNVSVAH DGAGKRVYLT RDPTT PLARAANETARHTPVNSW
 LGNIIMFAPTLWARMILMTHFFSVLIARDQLEQALNCEIYGACYSIEPLDLPPIIORL
 HGLSAFSLHSYSGEINRVAACLRLKLGVPPLRAWHRARSVRARLLSRGGRAAICGKY
 LFNWAVRTKLKLTPIAAAGRLDLSGWFTAGYSGGDIYHSVSHARPRWFWFC L L L L AAG
 VGIYLLPNR

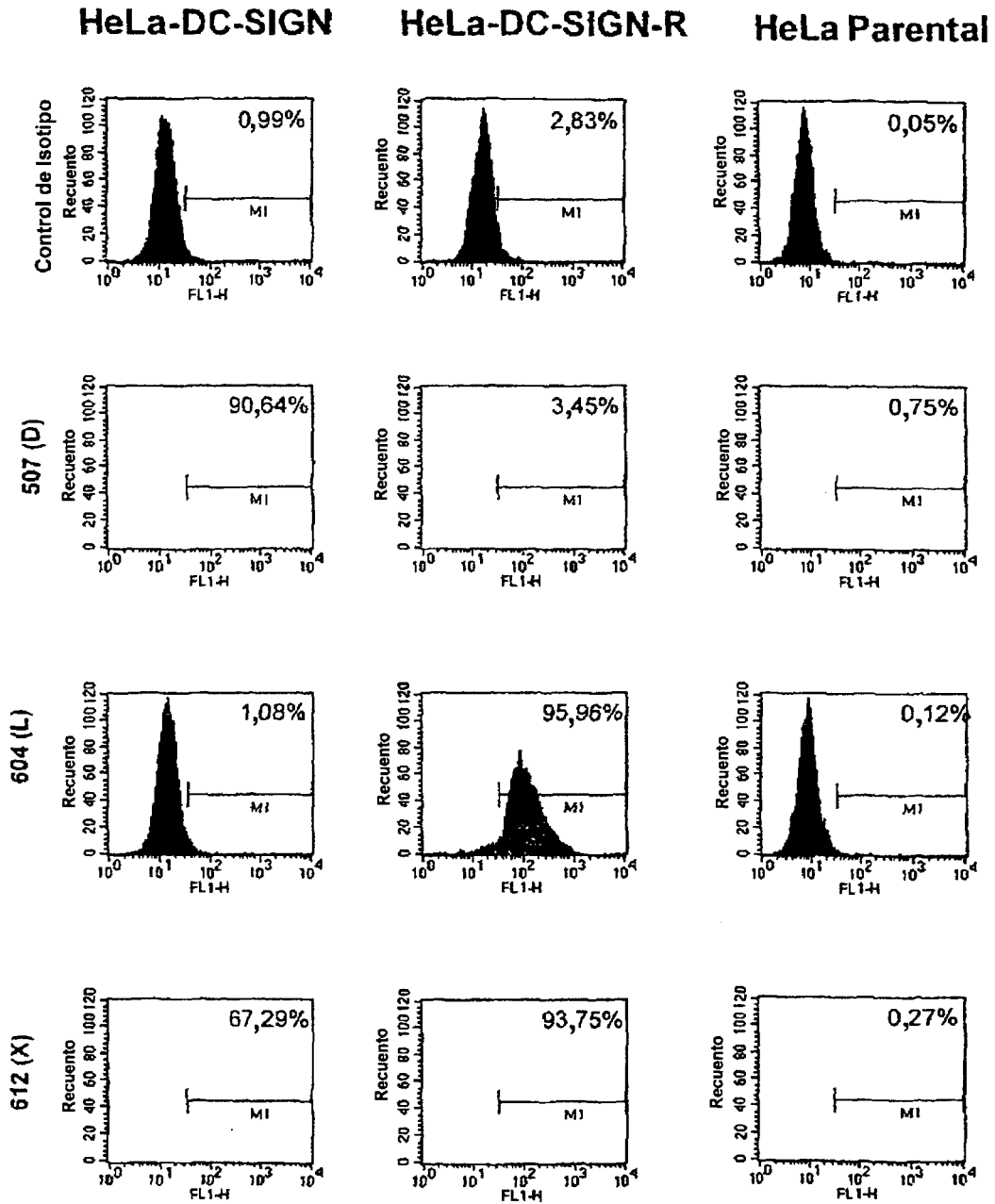


Figura 4. Caracterización de líneas celulares HeLa-DC-SIGN y HeLa-DC-SIGN-R usando anticuerpos específicos para DC-SIGN (507(D)), DC-SIGN-R (604(L)) o ambas moléculas (612(X)).

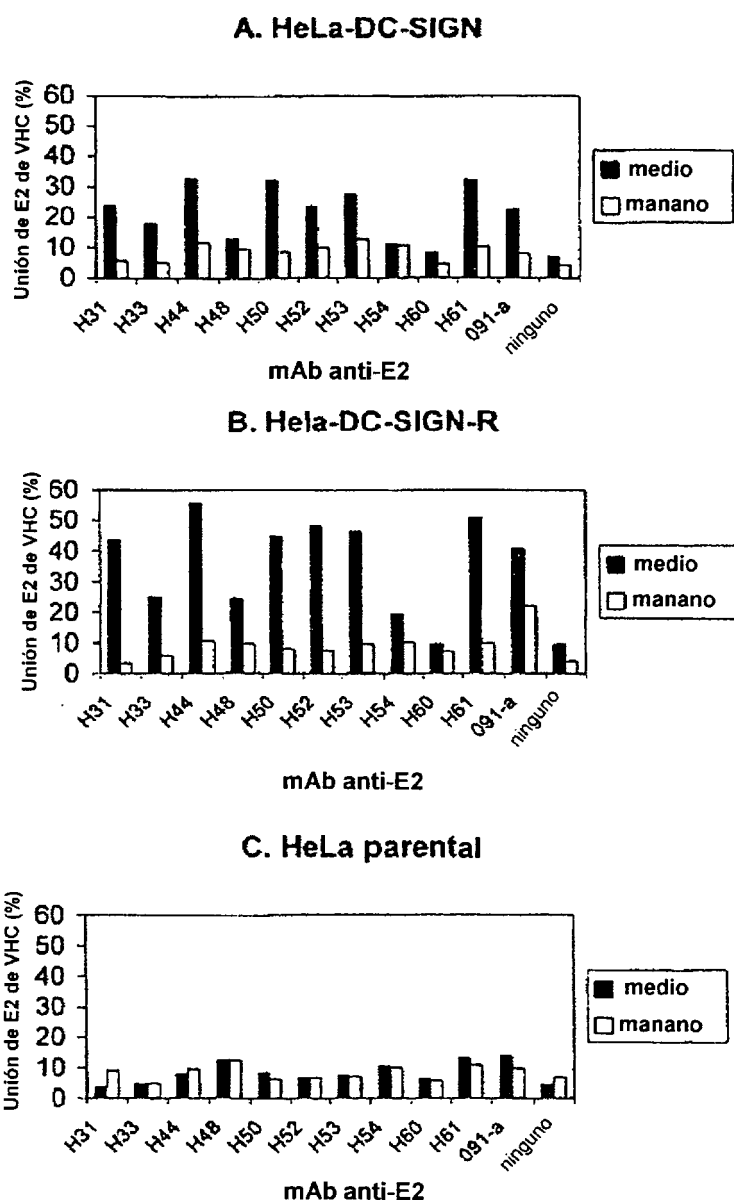


Figura 5. Transfectantes de DC-SIGN y DC-SIGNR se unen a E2 de VHC. Se permitió que células (A) HeLa-DC-SIGN, (B) HeLa-DC-SIGNR y (C) HeLa parentales se unieran a perlas recubiertas con E2 de VHC que se prepararon por conjugación con un panel de mAb anti-E2. La adhesión se cuantificó por análisis FACS y se bloqueó con manano (20 $\mu\text{g/ml}$), y se muestra un experimento representativo de tres.

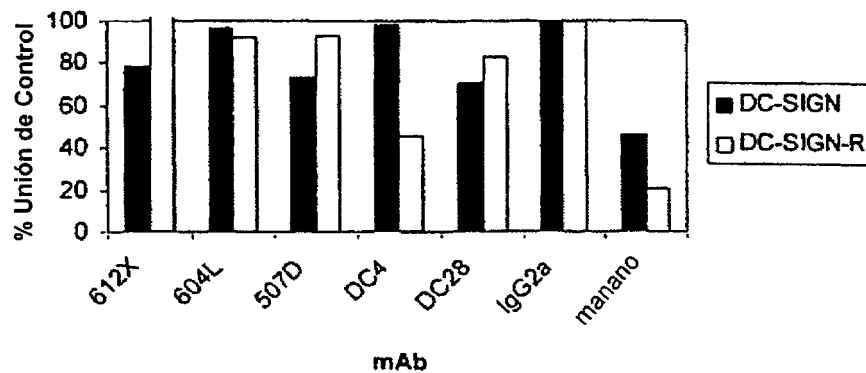


Figura 6. Efecto de mAb sobre la adhesión de E2 de VHC a DC-SIGN o DC-SIGN-R. Se incubaron células HeLa que expresaban DC-SIGN o DC-SIGN-R con mAb o manano como se describe, y se añadieron perlas de E2 conjugada con H53 a una proporción entre perla y célula de 20:1. La unión se cuantificó mediante fluorescencia usando una máquina FACScan y los resultados se normalizaron hasta los niveles de control (IgG2a)

ES 2 296 985 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC

5 <120> USOS DE DC-SIGN Y DC-SIGNR PARA INHIBIR LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS
C

10 <130> B5920 - CA/CS/PAM

<140> EP 02759107.2

<141> 26-06-2002

15 <150> 09/891, 894

<151> 26-06-2001

20 <160> 7

<170> PatenIn versión 3.1

25 <210> 1

<211> 404

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 1

35 Met Ser Asp Ser Lys Glu Pro Arg Leu Gln Gln Leu Gly Leu Leu Glu
1 5 10 15
Glu Glu Gln Leu Arg Gly Leu Gly Phe Arg Gln Thr Arg Gly Tyr Lys
20 25 30
40 Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly His Gly Pro Leu Val Leu Gln Leu Leu
35 40 45
45 Ser Phe Thr Leu Leu Ala Gly Leu Leu Val Gln Val Ser Lys Val Pro
50 55 60
50
55
60
65

ES 2 296 985 T3

	Ser	Ser	Ile	Ser	Gln	Glu	Gln	Ser	Arg	Gln	Asp	Ala	Ile	Tyr	Gln	Asn	
	65					70					75					80	
5	Leu	Thr	Gln	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Ser	Lys	
					85					90					95		
10	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Gln	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	
				100					105						110		
15	Glu	Leu	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	
			115					120					125				
20	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Leu	Gln	
	130						135						140				
25	Glu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	
	145					150					155					160	
30	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Met	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	
					165					170					175		
35	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Gln	Gln	Glu	Ile	
				180					185					190			
40	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Glu	
				195				200					205				
45	Lys	Ser	Lys	Gln	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Lys	Ala	
	210						215					220					
50	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Gln	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	
	225					230					235					240	
55	Glu	Leu	Thr	Gln	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Cys	His	Pro	Cys	
				245						250					255		
60	Pro	Trp	Glu	Trp	Thr	Phe	Phe	Gln	Gly	Asn	Cys	Tyr	Phe	Met	Ser	Asn	
				260					265						270		
65	Ser	Gln	Arg	Asn	Trp	His	Asp	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Lys	Glu	Val	Gly	
			275					280					285				
70	Ala	Gln	Leu	Val	Val	Ile	Lys	Ser	Ala	Glu	Glu	Gln	Asn	Phe	Leu	Gln	
	290						295					300					

ES 2 296 985 T3

Leu Gln Ser Ser Arg Ser Asn Arg Phe Thr Trp Met Gly Leu Ser Asp
 305 310 315 320

5

Leu Asn Gln Glu Gly Thr Trp Gln Trp Val Asp Gly Ser Pro Leu Leu
 325 330 335

10

Pro Ser Phe Lys Gln Tyr Trp Asn Arg Gly Glu Pro Asn Asn Val Gly
 340 345 350

15

Glu Glu Asp Cys Ala Glu Phe Ser Gly Asn Gly Trp Asn Asp Asp Lys
 355 360 365

20

Cys Asn Leu Ala Lys Phe Trp Ile Cys Lys Lys Ser Ala Ala Ser Cys
 370 375 380

25

Ser Arg Asp Glu Glu Gln Phe Leu Ser Pro Ala Pro Ala Thr Pro Asn
 385 390 395 400

30

Pro Pro Pro Ala

<210> 2
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (368) ... (368)

40

<223> Xaa = cualquier aminoácido
 <400> 2

45

Met Ser Asp Ser Lys Glu Pro Arg Val Gln Gln Leu Gly Leu Leu Glu
 1 5 10 15

50

Glu Asp Pro Thr Thr Ser Gly Ile Arg Leu Phe Pro Arg Asp Phe Gln
 20 25 30

55

Phe Gln Gln Ile His Gly His Lys Ser Ser Thr Gly Cys Leu Gly His
 35 40 45

60

65

ES 2 296 985 T3

	Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Met	Leu	Leu	Ala	Gly	Val	
	50						55					60					
5	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Val	Gln	Val	Ser	Lys	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	
	65					70					75					80	
10	Gln	Glu	Gln	Ser	Glu	Gln	Asp	Ala	Ile	Tyr	Gln	Asn	Leu	Thr	Gln	Leu	
					85					90					95		
15	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	
				100					105					110			
20	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Gln	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Glu	
			115					120					125				
25	Lys	Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Lys	Ala	
		130					135					140					
30	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	
	145					150					155					160	
35	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Glu	Lys	Ser	
					165					170					175		
40	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	
			180					185						190			
45	Gly	Glu	Leu	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	
			195					200					205				
50	Thr	Glu	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Leu	
		210					215					220					
55	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Gln	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	
	225					230					235					240	
60	Leu	Pro	Asp	Gln	Ser	Lys	Gln	Gln	Gln	Ile	Tyr	Gln	Glu	Leu	Thr	Asp	
					245					250					255		
65	Leu	Lys	Thr	Ala	Phe	Glu	Arg	Leu	Cys	Arg	His	Cys	Pro	Lys	Asp	Trp	
				260					265					270			
	Thr	Phe	Phe	Gln	Gly	Asn	Cys	Tyr	Phe	Met	Ser	Asn	Ser	Gln	Arg	Asn	
			275					280					285				

ES 2 296 985 T3

Trp His Asp Ser Val Thr Ala Cys Gln Glu Val Arg Ala Gln Leu Val
 290 295 300
 5 Val Ile Lys Thr Ala Glu Glu Gln Asn Phe Leu Gln Leu Gln Thr Ser
 305 310 315 320
 10 Arg Ser Asn Arg Phe Ser Trp Met Gly Leu Ser Asp Leu Asn Gln Glu
 325 330 335
 15 Gly Thr Trp Gln Trp Val Asp Gly Ser Pro Leu Ser Pro Ser Phe Gln
 340 345 350
 20 Arg Tyr Trp Asn Ser Gly Glu Pro Asn Asn Ser Gly Asn Glu Asp Xaa
 355 360 365
 25 Ala Glu Phe Ser Gly Ser Gly Trp Asn Asp Asn Arg Cys Asp Val Asp
 370 375 380
 30 Asn Tyr Trp Ile Cys Lys Lys Pro Ala Ala Cys Phe Arg Asp Glu
 385 390 395
 35 <210> 3
 <211> 3011
 <212> PRT
 <213> Virus de la Hepatitis C
 <400> 3
 40 Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15
 45 Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30
 50 Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45
 55 Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60
 60 Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
 65 70 75 80
 65

ES 2 296 985 T3

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp
 85 90 95
 5
 Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
 100 105 110
 10
 Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
 115 120 125
 15
 Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
 130 135 140
 20
 Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
 145 150 155 160
 25
 Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
 165 170 175
 30
 Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr
 180 185 190
 35
 Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro
 195 200 205
 40
 Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr Pro
 210 215 220
 45
 Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys Trp Val
 225 230 235 240
 50
 Ala Val Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr Thr
 245 250 255
 55
 Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys
 260 265 270
 60
 Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly
 275 280 285
 65
 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Asp Cys
 290 295 300
 70
 Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 75
 Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Val Ala Gln

ES 2 296 985 T3

	325	330	335
5	Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Met Asp Met Ile Ala Gly Ala His 340 345 350		
10	Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp 355 360 365		
15	Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu 370 375 380		
20	Thr His Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val 385 390 395 400		
25	Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr 405 410 415		
30	Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser 420 425 430		
35	Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn 435 440 445		
40	Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr Asp 450 455 460		
45	Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Leu 465 470 475 480		
50	Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly Ile 485 490 495		
55	Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser 500 505 510		
60	Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser 515 520 525		
65	Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro 530 535 540		
	Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe 545 550 555 560		
	Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly Asn 565 570 575		

ES 2 296 985 T3

	Asn	Thr	Leu	Leu	Cys	Pro	Thr	Asp	Cys	Phe	Arg	Lys	His	Pro	Glu	Ala	
				580					585					590			
5	Thr	Tyr	Ser	Arg	Cys	Gly	Ser	Gly	Pro	Trp	Ile	Thr	Pro	Arg	Cys	Met	
			595					600					605				
10	Val	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Leu	Trp	His	Tyr	Pro	Cys	Thr	Ile	Asn	Tyr	
		610					615					620					
15	Thr	Ile	Phe	Lys	Val	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly	Val	Glu	His	Arg	Leu	
	625					630					635					640	
20	Glu	Ala	Ala	Cys	Asn	Trp	Thr	Arg	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp	Leu	Glu	Asp	
					645					650					655		
25	Arg	Asp	Arg	Ser	Glu	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Ser	Thr	Thr	Gln	Trp	
				660					665					670			
30	Gln	Val	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly	
		675						680					685				
35	Leu	Ile	His	Leu	His	Gln	Asn	Ile	Val	Asp	Val	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Gly	
	690						695					700					
40	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Ala	Ser	Trp	Ala	Ile	Lys	Trp	Glu	Tyr	Val	Val	
	705					710					715					720	
45	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Asp	Ala	Arg	Val	Cys	Ser	Cys	Leu	Trp	
					725					730					735		
50	Met	Met	Leu	Leu	Ile	Ser	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Asn	Leu	Val	
				740					745					750			
55	Ile	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Val	Ser	Phe	
		755						760					765				
60	Leu	Val	Phe	Phe	Cys	Phe	Ala	Trp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Arg	Trp	Val	Pro	
		770					775					780					
65	Gly	Ala	Val	Tyr	Ala	Phe	Tyr	Gly	Met	Trp	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
	785					790					795					800	
70	Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Val	Ala	Ala	
					805					810					815		

ES 2 296 985 T3

Ser Cys Gly Gly Val Val Leu Val Gly Leu Met Ala Leu Thr Leu Ser
 820 825 830
 5 Pro Tyr Tyr Lys Arg Tyr Ile Ser Trp Cys Met Trp Trp Leu Gln Tyr
 835 840 845
 10 Phe Leu Thr Arg Val Glu Ala Gln Leu His Val Trp Val Pro Pro Leu
 850 855 860
 15 Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Val Ile Leu Leu Met Cys Val Val
 865 870 875 880
 His Pro Thr Leu Val Phe Asp Ile Thr Lys Leu Leu Leu Ala Ile Phe
 885 890 895
 20 Gly Pro Leu Trp Ile Leu Gln Ala Ser Leu Leu Lys Val Pro Tyr Phe
 900 905 910
 25 Val Arg Val Gln Gly Leu Leu Arg Ile Cys Ala Leu Ala Arg Lys Ile
 915 920 925
 30 Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Ile Ile Lys Leu Gly Ala Leu
 930 935 940
 35 Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asn His Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala
 945 950 955 960
 His Asn Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe
 965 970 975
 40 Ser Arg Met Glu Thr Lys Leu Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala
 980 985 990
 45 Cys Gly Asp Ile Ile Asn Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Gln
 995 1000 1005
 50 Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly Trp
 1010 1015 1020
 55 Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly
 1025 1030 1035
 60 Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn
 1040 1045 1050
 65

ES 2 296 985 T3

	Gln Val	Glu Gly Glu Val	Gln	Ile Val Ser Thr	Ala	Thr Gln Thr
	1055		1060		1065	
5	Phe Leu	Ala Thr Cys Ile	Asn	Gly Val Cys Trp	Thr	Val Tyr His
	1070		1075		1080	
10	Gly Ala	Gly Thr Arg Thr	Ile	Ala Ser Pro Lys	Gly	Pro Val Ile
	1085		1090		1095	
15	Gln Met	Tyr Thr Asn Val	Asp	Gln Asp Leu Val	Gly	Trp Pro Ala
	1100		1105		1110	
20	Pro Gln	Gly Ser Arg Ser	Leu	Thr Pro Cys Thr	Cys	Gly Ser Ser
	1115		1120		1125	
25	Asp Leu	Tyr Leu Val Thr	Arg	His Ala Asp Val	Ile	Pro Val Arg
	1130		1135		1140	
30	Arg Arg	Gly Asp Ser Arg	Gly	Ser Leu Leu Ser	Pro	Arg Pro Ile
	1145		1150		1155	
35	Ser Tyr	Leu Lys Gly Ser	Ser	Gly Gly Pro Leu	Leu	Cys Pro Ala
	1160		1165		1170	
40	Gly His	Ala Val Gly Leu	Phe	Arg Ala Ala Val	Cys	Thr Arg Gly
	1175		1180		1185	
45	Val Ala	Lys Ala Val Asp	Phe	Ile Pro Val Glu	Asn	Leu Glu Thr
	1190		1195		1200	
50	Thr Met	Arg Ser Pro Val	Phe	Thr Asp Asn Ser	Ser	Pro Pro Ala
	1205		1210		1215	
55	Val Pro	Gln Ser Phe Gln	Val	Ala His Leu His	Ala	Pro Thr Gly
	1220		1225		1230	
60	Ser Gly	Lys Ser Thr Lys	Val	Pro Ala Ala Tyr	Ala	Ala Gln Gly
	1235		1240		1245	
65	Tyr Lys	Val Leu Val Leu	Asn	Pro Ser Val Ala	Ala	Thr Leu Gly
	1250		1255		1260	
	Phe Gly	Ala Tyr Met Ser	Lys	Ala His Gly Val	Asp	Pro Asn Ile
	1265		1270		1275	
	Arg Thr	Gly Val Arg Thr	Ile	Thr Thr Gly Ser	Pro	Ile Thr Tyr

ES 2 296 985 T3

	1280		1285		1290
5	Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu	Ala Asp Gly Gly Cys	Ser Gly Gly		
	1295	1300	1305		
10	Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys	Asp Glu Cys His Ser	Thr Asp Ala		
	1310	1315	1320		
15	Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly	Thr Val Leu Asp Gln	Ala Glu Thr		
	1325	1330	1335		
20	Ala Gly Ala Arg Leu Val Val	Leu Ala Thr Ala Thr	Pro Pro Gly		
	1340	1345	1350		
25	Ser Val Thr Val Ser His Pro	Asn Ile Glu Glu Val	Ala Leu Ser		
	1355	1360	1365		
30	Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe	Tyr Gly Lys Ala Ile	Pro Leu Glu		
	1370	1375	1380		
35	Val Ile Lys Gly Gly Arg His	Leu Ile Phe Cys His	Ser Lys Lys		
	1385	1390	1395		
40	Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala	Lys Leu Val Ala Leu	Gly Ile Asn		
	1400	1405	1410		
45	Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly	Leu Asp Val Ser Val	Ile Pro Thr		
	1415	1420	1425		
50	Ser Gly Asp Val Val Val Val	Ser Thr Asp Ala Leu	Met Thr Gly		
	1430	1435	1440		
55	Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser	Val Ile Asp Cys Asn	Thr Cys Val		
	1445	1450	1455		
60	Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser	Leu Asp Pro Thr Phe	Thr Ile Glu		
	1460	1465	1470		
65	Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp	Ala Val Ser Arg Thr	Gln Arg Arg		
	1475	1480	1485		
	Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys	Pro Gly Ile Tyr Arg	Phe Val Ala		
	1490	1495	1500		
	Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly	Met Phe Asp Ser Ser	Val Leu Cys		
	1505	1510	1515		

ES 2 296 985 T3

	Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala	1520	1525	1530
5	Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu	1535	1540	1545
10	Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr	1550	1555	1560
15	Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln	1565	1570	1575
20	Ser Gly Glu Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val	1580	1585	1590
25	Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp	1595	1600	1605
30	Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro	1610	1615	1620
35	Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Leu Thr	1625	1630	1635
40	His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu	1640	1645	1650
45	Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala	1655	1660	1665
50	Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val	1670	1675	1680
55	Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg	1685	1690	1695
60	Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser Gln	1700	1705	1710
65	His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln Phe	1715	1720	1725
	Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser Arg Gln Ala	1730	1735	1740

ES 2 296 985 T3

	Glu Val	Ile Thr Pro Ala	Val	Gln Thr Asn Trp	Gln	Lys Leu Glu
	1745		1750		1755	
5	Val Phe	Trp Ala Lys His	Met	Trp Asn Phe Ile	Ser	Gly Ile Gln
	1760		1765		1770	
10	Tyr Leu	Ala Gly Leu Ser	Thr	Leu Pro Gly Asn	Pro	Ala Ile Ala
	1775		1780		1785	
15	Ser Leu	Met Ala Phe Thr	Ala	Ala Val Thr Ser	Pro	Leu Thr Thr
	1790		1795		1800	
20	Gly Gln	Thr Leu Leu Phe	Asn	Ile Leu Gly Gly	Trp	Val Ala Ala
	1805		1810		1815	
25	Gln Leu	Ala Ala Pro Gly	Ala	Ala Thr Ala Phe	Val	Gly Ala Gly
	1820		1825		1830	
30	Leu Ala	Gly Ala Ala Ile	Gly	Ser Val Gly Leu	Gly	Lys Val Leu
	1835		1840		1845	
35	Val Asp	Ile Leu Ala Gly	Tyr	Gly Ala Gly Val	Ala	Gly Ala Leu
	1850		1855		1860	
40	Val Ala	Phe Lys Ile Met	Ser	Gly Glu Val Pro	Ser	Thr Glu Asp
	1865		1870		1875	
45	Leu Val	Asn Leu Leu Pro	Ala	Ile Leu Ser Pro	Gly	Ala Leu Val
	1880		1885		1890	
50	Val Gly	Val Val Cys Ala	Ala	Ile Leu Arg Arg	His	Val Gly Pro
	1895		1900		1905	
55	Gly Glu	Gly Ala Val Gln	Trp	Met Asn Arg Leu	Ile	Ala Phe Ala
	1910		1915		1920	
60	Ser Arg	Gly Asn His Val	Ser	Pro Thr His Tyr	Val	Pro Glu Ser
	1925		1930		1935	
65	Asp Ala	Ala Ala Arg Val	Thr	Ala Ile Leu Ser	Ser	Leu Thr Val
	1940		1945		1950	
	Thr Gln	Leu Leu Arg Arg	Leu	His Gln Trp Ile	Ser	Ser Glu Cys
	1955		1960		1965	

ES 2 296 985 T3

	Thr	Thr	Pro	Cys	Ser	Gly	Ser	Trp	Leu	Arg	Asp	Ile	Trp	Asp	Trp
	1970						1975					1980			
5	Ile	Cys	Glu	Val	Leu	Ser	Asp	Phe	Lys	Thr	Trp	Leu	Lys	Ala	Lys
	1985						1990					1995			
10	Leu	Met	Pro	Gln	Leu	Pro	Gly	Ile	Pro	Phe	Val	Ser	Cys	Gln	Arg
	2000						2005					2010			
15	Gly	Tyr	Arg	Gly	Val	Trp	Arg	Gly	Asp	Gly	Ile	Met	His	Thr	Arg
	2015						2020					2025			
20	Cys	His	Cys	Gly	Ala	Glu	Ile	Thr	Gly	His	Val	Lys	Asn	Gly	Thr
	2030						2035					2040			
25	Met	Arg	Ile	Val	Gly	Pro	Arg	Thr	Cys	Arg	Asn	Met	Trp	Ser	Gly
	2045						2050					2055			
30	Thr	Phe	Pro	Ile	Asn	Ala	Tyr	Thr	Thr	Gly	Pro	Cys	Thr	Pro	Leu
	2060						2065					2070			
35	Pro	Ala	Pro	Asn	Tyr	Lys	Phe	Ala	Leu	Trp	Arg	Val	Ser	Ala	Glu
	2075						2080					2085			
40	Glu	Tyr	Val	Glu	Ile	Arg	Arg	Val	Gly	Asp	Phe	His	Tyr	Val	Ser
	2090						2095					2100			
45	Gly	Met	Thr	Thr	Asp	Asn	Leu	Lys	Cys	Pro	Cys	Gln	Ile	Pro	Ser
	2105						2110					2115			
50	Pro	Glu	Phe	Phe	Thr	Glu	Leu	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	His	Arg	Phe
	2120						2125					2130			
55	Ala	Pro	Pro	Cys	Lys	Pro	Leu	Leu	Arg	Glu	Glu	Val	Ser	Phe	Arg
	2135						2140					2145			
60	Val	Gly	Leu	His	Glu	Tyr	Pro	Val	Gly	Ser	Gln	Leu	Pro	Cys	Glu
	2150						2155					2160			
65	Pro	Glu	Pro	Asp	Val	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Met	Leu	Thr	Asp	Pro
	2165						2170					2175			
	Ser	His	Ile	Thr	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Leu	Ala	Arg	Gly
	2180						2185					2190			
	Ser	Pro	Pro	Ser	Met	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Leu	Ser	Ala

ES 2 296 985 T3

	2195		2200		2205
5	Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp 2210 2215 2220				
10	Ala Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly 2225 2230 2235				
15	Gly Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu 2240 2245 2250				
20	Asp Ser Phe Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val 2255 2260 2265				
25	Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Arg Phe Ala Arg 2270 2275 2280				
30	Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val 2285 2290 2295				
35	Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly 2300 2305 2310				
40	Cys Pro Leu Pro Pro Pro Arg Ser Pro Pro Val Pro Pro Pro Arg 2315 2320 2325				
45	Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr Leu Ser Thr Ala 2330 2335 2340				
50	Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Ser Phe Gly Ser Ser Ser Thr Ser 2345 2350 2355				
55	Gly Ile Thr Gly Asp Asn Thr Thr Thr Ser Ser Glu Pro Ala Pro 2360 2365 2370				
60	Ser Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser Met 2375 2380 2385				
65	Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly 2390 2395 2400				
	Ser Trp Ser Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Thr Glu Asp Val Val 2405 2410 2415				
	Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro 2420 2425 2430				

ES 2 296 985 T3

	Cys	Ala	Ala	Glu	Glu	Gln	Lys	Leu	Pro	Ile	Asn	Ala	Leu	Ser	Asn
	2435						2440					2445			
5	Ser	Leu	Leu	Arg	His	His	Asn	Leu	Val	Tyr	Ser	Thr	Thr	Ser	Arg
	2450						2455					2460			
10	Ser	Ala	Cys	Gln	Arg	Gln	Lys	Lys	Val	Thr	Phe	Asp	Arg	Leu	Gln
	2465						2470					2475			
15	Val	Leu	Asp	Ser	His	Tyr	Gln	Asp	Val	Leu	Lys	Glu	Val	Lys	Ala
	2480						2485					2490			
20	Ala	Ala	Ser	Lys	Val	Lys	Ala	Asn	Leu	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Ala
	2495						2500					2505			
25	Cys	Ser	Leu	Thr	Pro	Pro	His	Ser	Ala	Lys	Ser	Lys	Phe	Gly	Tyr
	2510						2515					2520			
30	Gly	Ala	Lys	Asp	Val	Arg	Cys	His	Ala	Arg	Lys	Ala	Val	Ala	His
	2525						2530					2535			
35	Ile	Asn	Ser	Val	Trp	Lys	Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	Val	Thr	Pro
	2540						2545					2550			
40	Ile	Asp	Thr	Thr	Ile	Met	Ala	Lys	Asn	Glu	Val	Phe	Cys	Val	Gln
	2555						2560					2565			
45	Pro	Glu	Lys	Gly	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Phe	Pro
	2570						2575					2580			
50	Asp	Leu	Gly	Val	Arg	Val	Cys	Glu	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
	2585						2590					2595			
55	Val	Ser	Lys	Leu	Pro	Leu	Ala	Val	Met	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gly	Phe
	2600						2605					2610			
60	Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Glu	Phe	Leu	Val	Gln	Ala	Trp
	2615						2620					2625			
65	Lys	Ser	Lys	Lys	Thr	Pro	Met	Gly	Phe	Ser	Tyr	Asp	Thr	Arg	Cys
	2630						2635					2640			
	Phe	Asp	Ser	Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Asp	Ile	Arg	Thr	Glu	Glu	Ala
	2645						2650					2655			

ES 2 296 985 T3

	Ile Tyr	Gln Cys Cys Asp	Leu	Asp Pro Gln Ala Arg	Val Ala Ile
	2660		2665		2670
5	Lys Ser	Leu Thr Glu Arg	Leu	Tyr Val Gly Gly Pro	Leu Thr Asn
	2675		2680		2685
10	Ser Arg	Gly Glu Asn Cys	Gly	Tyr Arg Arg Cys Arg	Ala Ser Gly
	2690		2695		2700
15	Val Leu	Thr Thr Ser Cys	Gly	Asn Thr Leu Thr Cys	Tyr Ile Lys
	2705		2710		2715
20	Ala Arg	Ala Ala Cys Arg	Ala	Ala Gly Leu Gln Asp	Cys Thr Met
	2720		2725		2730
25	Leu Val	Cys Gly Asp Asp	Leu	Val Val Ile Cys Glu	Ser Ala Gly
	2735		2740		2745
30	Val Gln	Glu Asp Ala Ala	Ser	Leu Arg Ala Phe Thr	Glu Ala Met
	2750		2755		2760
35	Thr Arg	Tyr Ser Ala Pro	Pro	Gly Asp Pro Pro Gln	Pro Glu Tyr
	2765		2770		2775
40	Asp Leu	Glu Leu Ile Thr	Ser	Cys Ser Ser Asn Val	Ser Val Ala
	2780		2785		2790
45	His Asp	Gly Ala Gly Lys	Arg	Val Tyr Tyr Leu Thr	Arg Asp Pro
	2795		2800		2805
50	Thr Thr	Pro Leu Ala Arg	Ala	Ala Trp Glu Thr Ala	Arg His Thr
	2810		2815		2820
55	Pro Val	Asn Ser Trp Leu	Gly	Asn Ile Ile Met Phe	Ala Pro Thr
	2825		2830		2835
60	Leu Trp	Ala Arg Met Ile	Leu	Met Thr His Phe Phe	Ser Val Leu
	2840		2845		2850
65	Ile Ala	Arg Asp Gln Leu	Glu	Gln Ala Leu Asn Cys	Glu Ile Tyr
	2855		2860		2865
	Gly Ala	Cys Tyr Ser Ile	Glu	Pro Leu Asp Leu Pro	Pro Ile Ile
	2870		2875		2880

ES 2 296 985 T3

5 Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser
 2885 2890 2895

 10 Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly
 2900 2905 2910

 15 Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg
 2915 2920 2925

 20 Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys
 2930 2935 2940

 25 Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro
 2945 2950 2955

 30 Ile Ala Ala Ala Gly Arg Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala
 2960 2965 2970

 35 Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg
 2975 2980 2985

 40 Pro Arg Trp Phe Trp Phe Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val
 2990 2995 3000

 45 Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg
 3005 3010

40 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador

50 <400> 4

gcagaaagcg tctagccatg gcgt

24

55 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador

65 <400> 5

ctcgcaagca ccctatcagg cagt

24

ES 2 296 985 T3

	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 6	
	ggagagccat agtgggtctgc ggaac	25
15	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 7	
	gttgggtcgc gaaaggcctt gtggt	25
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		