



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 455**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07825334 .1**

96 Fecha de presentación : **25.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2076532**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.07.2009**

54 Título: **Derivados de citocinas.**

30 Prioridad: **25.07.2006 GB 0614755**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.06.2011**

73 Titular/es:  
**Mintaka Foundation for Medical Research  
Chemin Des Aulx 14  
1228 Plan-Les-Ouates, CH**

72 Inventor/es: **Hartley, Oliver**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 361 455 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

## CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a derivados de citocinas que tienen actividades anti-VIH, anti-inflamatorias u otras.

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

No se conoce ningún fármaco que sea capaz de curar las infecciones por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Hasta la fecha no parece estar al alcance ninguna vacuna capaz de prevenir la infección por VIH.

10 Las infecciones por VIH existentes actualmente, en muchos casos, se pueden controlar mediante Terapia Antirretroviral Altamente Activa (HAART) que implica una combinación de tres o más fármacos retrovirales. Sin embargo, la aparición de cepas de VIH resistentes de clase único, doble o triple fármaco está aumentando constantemente bajo la presión selectiva de los inhibidores de transcriptasa inversa y proteasa (RTI y PI) empleados actualmente en la HAART.

15 Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevos tipos de fármacos anti-VIH. Preferentemente, tales nuevos fármacos se dirigirían a aspectos del virus que son menos vulnerables al desarrollo de resistencia que la transcripción inversa y procesos de maduración vírica abordados por las RTI y PI que se han mencionado anteriormente. En ausencia de una vacuna de VIH existe adicionalmente una necesidad de agentes que sean capaces de prevenir la transmisión del VIH durante el contacto sexual.

20 Esta necesidad podría satisfacerse potencialmente mediante agentes que inhiben la entrada del VIH en células diana, es decir, agentes de la clase de los "inhibidores de entrada" (EI). Tales agentes se podrían aplicar, por ejemplo, por vía local y por vía tópica a los genitales humanos para prevenir la infección de células por VIH durante el contacto sexual. Los agentes que pueden prevenir la transmisión del VIH durante el contacto sexual se denominan con frecuencia (aunque de manera inapropiada) "microbicidas".

25 La entrada del VIH en células diana humanas depende de la unión del virión de VIH a la proteína de superficie celular humana CD4 y un denominado correceptor. Los correceptores principales usados por VIH incluyen los receptores acoplados a proteína G de siete dominios transmembrana CXCR4 y CCR5. Se observó que los ligandos de quimiocina naturales de CCR5, en particular RANTES (CCR5), inhibían la entrada de cepas de VIH trópicas para R5 (cepas de VIH que usan CCR5 como un correceptor) en células humanas [1]. RANTES es una citocina proinflamatoria que se sabe que promueve la acumulación y activación celular en enfermedades inflamatorias crónicas.

30 Ciertos derivados de RANTES con modificaciones en el extremo N presentaron actividad anti-VIH mejorada, por ejemplo, AOP-RANTES, la oxima de aminooxipentano de [glixilil]<sup>1</sup>RANTES(2-68) [2] en la que "(2-68)" indica los restos de 2 a 68 del péptido RANTES de origen natural. Los derivados de RANTES modificados químicamente adicionales con actividad anti-VIH incluyen NNY-RANTES (n-nonanoil-RANTES(2-68) [3, 4]) y PSC-RANTES [5].

35 Sin embargo, los derivados de RANTES modificados químicamente que se han mencionado anteriormente no inhiben solamente la entrada del VIH en las células, sino que también son agonistas relativamente fuertes de CCR5: AOP-, NNY- y PSC-RANTES provocan una cascada de señalización proinflamatoria que implica el flujo de entrada de calcio citosólico. El uso de agentes con tal actividad de señalización como fármacos anti-VIH podría conducir a efectos secundarios indeseados que implican, por ejemplo, inflamación. La inducción de inflamación es un efecto secundario altamente indeseable para agentes anti-VIH profilácticos y se ha reconocido que el riesgo de infección por VIH puede de hecho estar aumentado en tejido inflamado.

40 Los agentes tales como derivados de RANTES también pueden inducir señalización en células diana debido a la ausencia de selectividad o especificidad del agente por CCR5, es decir, debido a que el agente se une también a las proteínas receptoras CCR1 y CCR3.

45 Una desventaja de los polipéptidos modificados químicamente es que no se pueden producir mediante medios biotecnológicos directos (expresión y fermentación). También se han descrito derivados de RANTES anti-VIH completamente codificados, es decir, derivados que consisten solamente en aminoácidos codificados de manera natural [6, 7]. Sin embargo, la potencia anti-VIH de todos los derivados de RANTES codificados completamente descritos inicialmente era menor que la de la variante PSC-RANTES modificada químicamente [5].

50

**DIVULGACIÓN DE LA INVENCION****Moléculas de la invención**

5 Ahora se han identificado agentes peptídicos codificados completamente con alta potencia anti-VIH. Estos agentes peptídicos pueden producirse de manera sencilla mediante procedimientos biotecnológicos convencionales, evitando el gasto y esfuerzo requeridos para la síntesis o modificación química. Inesperadamente se ha hallado que en realizaciones preferidas los agentes peptídicos de la presente invención combinan una alta potencia anti-VIH con una capacidad de provocar solamente un bajo grado de señalización proinflamatoria, evitando de este modo los efectos secundarios inflamatorios.

10 En realizaciones adicionales, los agentes de la invención conducen a la internalización de CCR5 en la célula (regulación negativa o modulación negativa por secuestro de receptor). Este mecanismo de acción sorprendente es ventajoso ya que (i) se puede conseguir la protección de duración comparativa larga mediante una única dosis del fármaco y (ii) las cepas de VIH trópicas para R5 resistentes es menos probable que evolucionen si ni CCR5 ni su forma unida a fármaco están accesibles sobre la superficie de la célula diana para la interacción con el virus.

15 Los agentes peptídicos particularmente preferidos combinan una alta potencia anti-VIH con una alta actividad de secuestro de receptor y una baja actividad de señalización. Los agentes peptídicos preferidos adicionales de la invención combinan al menos una propiedad deseable seleccionada entre el grupo que consiste en alta potencia anti-VIH, alta actividad de secuestro de receptor y baja actividad de señalización con una alta selectividad de receptor, es decir, unión preferente a CCR5 con respecto a CCR1 y/o CCR3.

20 Los agentes peptídicos de la invención comprenden una secuencia distintiva que comprende QGP[P o L], es decir, la cuarta posición de la secuencia distintiva puede ser P o L. Preferentemente, esta secuencia distintiva está localizada cerca del extremo N del polipéptido. Preferentemente, la secuencia distintiva está localizada de tal forma que el comienzo de la secuencia distintiva se encuentra dentro de 15 restos del extremo N del polipéptido, más preferentemente dentro de 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1 restos del extremo N. En el presente documento, la expresión "el comienzo de la secuencia distintiva" se refiere al extremo N de la secuencia distintiva. La secuencia distintiva también puede estar localizada en el extremo N final del polipéptido, es decir, los extremos N del polipéptido como una totalidad y la secuencia distintiva pueden coincidir.

25 Por tanto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende una parte N-terminal y una parte C-terminal, en el que dicha parte N-terminal comprende la secuencia distintiva QGP[P o L] y la secuencia de aminoácidos de dicha parte C-terminal tiene una identidad de al menos el 70% con la SEC ID N°: 1.

30 Preferentemente, dicha secuencia distintiva es

QGP[P o L][L o G o S o M][M o D o S o Q o G] o en una realización preferida adicional,

QGP[P o L][L o G][M o D o S].

Más preferentemente, dicha secuencia distintiva es

35 QGP[P o L][L o G o S o M][M o D o S o Q o G]XX[Q o G o L o A o T o S]X, o en una realización preferida adicional,

QGP[P o L][L o G][M o D o S]XX[Q o L]X, en la que X indica cualquier aminoácido natural o modificado.

Más preferentemente, dicha secuencia distintiva es QGP[P o L] LM o QGPPG[D o S].

Más preferentemente, dicha secuencia distintiva es QGPPLM o QGPPGD.

En una realización, dicha secuencia distintiva es

40 QGP[P o L][L o M][M o Q][A o W o G o Q o N]X[Q o G o L][S o V o T o G], o en realizaciones preferidas adicionales,

QGP[P o L][L o M][M o Q][A o W o G o Q o N][L o T o M o S o G o Q o R o Y][Q o G o L][S o V o T o G] o

QGP[P o L]LM[A o W][L o T o M][[Q o G][S o V o T o G].

Preferentemente, dicha secuencia distintiva es QGPPLM[A o W][L o T o M][[Q o G][S o V o T o G].

En una realización adicional, dicha secuencia distintiva es

QGP[P o L][L o G o S][D o S o G o Q] XX[L o A o T o Q][W o A o V], o en realizaciones preferidas adicionales,  
 QGP [P o L][L o G o S][D o S o G o Q][T o I o S o W o Q][V o L o A o S o G][L o A o T o Q][W o A o V] o  
 QGPPG[D o S][T o I]VL[W o A].

5 Preferentemente, dicha secuencia distintiva es QGPPGD[T o I]VL[W o A].

En una realización adicional, dicha secuencia distintiva es

QGPP[G o L][M o Q]XX[Q o S][S o V], o en realizaciones preferidas adicionales,  
 QGPP [G o L][M o Q][S o G o W o A o T][L o F o T o S o G o Y][Q o S][S o V] o  
 QGPPLM[S o G][L o F o T]Q[S o V].

10 De acuerdo con realizaciones preferidas, el polipéptido de la presente invención comprende una secuencia  
 distintiva seleccionada entre el grupo QGPPLMALQS, QGPPLMWMQV, QGPPLMWLQV, QGPPLMWTQS,  
 QGPPLMWLQT, QGPPLMWTQV, QGPPLMWMQS, QGPPLMATQS, QGPPLMWLQS, QGPPLMALQV,  
 QGPPLMWLGG, QGPPLMWRGS, QGPPLMWLQV, QGPPLMQTTP, QGPPLSWLQV, QGPPLSWLQS,  
 QGPPGQWSQV, QGPPLMAGLS, QGPPLSWQQS, QGPPGMWSQS, QGPPLQWRQS, QGPPLMGTQS,  
 15 QGPPLMQLQV, QGPPLWSQV, QGPPLMSWSQS, QGPPLMNLQV, QGPPLMSAYQV y QGPPMQGGLS.

De acuerdo con realizaciones preferidas adicionales, el polipéptido de la presente invención comprende una  
 secuencia distintiva seleccionada entre el grupo QGPPGDTVLW, QGPPGDIVLA, QGPPGSYDYS, QGPPGDGGSV,  
 QGPLSGQSTP, QGPPGDWLQV, QGPPLMSLAV, QGPPLMSLTV, QGPLSGWAQV, QGPLSQSSQV,  
 QGPLSSQSQV y QGPLGQQGQV.

20 De acuerdo con realizaciones preferidas adicionales, el polipéptido de la presente invención comprende una  
 secuencia distintiva seleccionada entre el grupo QGPPLMSFQS, QGPPLMSTQS, QGPPLMSLQV, QGPPLMGLQV,  
 QGPLSGWLQV, QGPPLQWFQV, QGPPLQWTQV, QGPPLMALSV, QGPPLMWSQV, QGPPGQWGQV,  
 QGPPGSWSQV, QGPPLMSSQS, QGPPLMGLSV, QGPPLMTLQV y QGPPGQWYQS.

25 De acuerdo con realizaciones preferidas adicionales, el polipéptido de la presente invención comprende una  
 secuencia distintiva seleccionada entre el grupo QGPPLMSVLA, QGPPGSWSSV, QGPPLGSMGP,  
 QGPPLQWMQA, QGPPLQWMQV, QGPPLMSTQV, QGPPLMSLSV, QGPPLMSLQS, QGPPLMSLQA,  
 QGPPLMSVQS, QGPPLMSAQS, QGPPLMSGQS y QGPPLMSGQV.

30 En una realización adicional, dicha parte N-terminal consiste en no más de 15 aminoácidos,  
 preferentemente no más de 14, 13, 12, 11, 10 aminoácidos. De acuerdo con una realización preferida, dicha parte N-  
 terminal consiste en 10 aminoácidos.

De acuerdo con una realización, el extremo N de la parte C-terminal es directamente adyacente al extremo  
 C de la parte C-terminal, es decir, la parte N-terminal y la parte C-terminal son directamente adyacentes.

En una realización adicional, dicha parte C-terminal de la cadena polipeptídica es idéntica a la SEC ID N°:  
 1.

35 En una realización adicional, la secuencia distintiva está localizada en el extremo N final.

Las realizaciones preferidas de las secuencias distintivas de los derivados de RANTES de la presente  
 invención se exponen en la Tabla 1:

**Tabla 1**

<b>SEC ID Nº</b>	<b>Secuencia distintiva</b>
SEC ID Nº: 2	QGPPLMALQS
SEC ID Nº: 3	QGPPLMWMQV
SEC ID Nº: 4	QGPPLMWLQV
SEC ID Nº: 5	QGPPLMWTQS
SEC ID Nº: 6	QGPPLMWLQT
SEC ID Nº: 7	QGPPLMWTQV
SEC ID Nº: 8	QGPPLMWMQS
SEC ID Nº: 9	QGPPLMATQS
SEC ID Nº: 10	QGPPLMWLQS
SEC ID Nº: 11	QGPPLMALQV
SEC ID Nº: 12	QGPPLMWLGG
SEC ID Nº: 13	QGPPLMWRGS
SEC ID Nº: 14	QGPLLMWLQV
SEC ID Nº: 15	QGPPLMQTTP

(cont.)

<b>SEC ID Nº</b>	<b>Secuencia distintiva</b>
SEC ID Nº: 16	QGPPGDTVWLW
SEC ID Nº: 17	QGPPGDIVLA
SEC ID Nº: 18	QGPPGSYDYS
SEC ID Nº: 19	QGPPGDGGSV
SEC ID Nº: 20	QGPLSGQSTP
SEC ID Nº: 21	QGPPGDWLQV
SEC ID Nº: 22	QGPPPLMSFQS
SEC ID Nº: 23	QGPPPLMSTQS
SEC ID Nº: 24	QGPPPLMSLQV
SEC ID Nº: 25	QGPPPLMGLQV
SEC ID Nº: 26	QGPLSGWLQV
SEC ID Nº: 27	QGPPPLMSVLA
SEC ID Nº: 28	QGPPGSWSSV
SEC ID Nº: 29	QGPPPLGSMGP
SEC ID Nº: 30	QGPPPLSWLQV
SEC ID Nº: 31	QGPPPLSWLQS
SEC ID Nº: 32	QGPPGQWSQV
SEC ID Nº: 33	QGPPMMAGLS
SEC ID Nº: 34	QGPPPLSWQQS
SEC ID Nº: 35	QGPPGMWSQS
SEC ID Nº: 36	QGPPPLQWRQS
SEC ID Nº: 37	QGPPPLMGTQS
SEC ID Nº: 38	QGPPPLMLQV
SEC ID Nº: 39	QGPPPLSWSQV
SEC ID Nº: 40	QGPPMSWSQS
SEC ID Nº: 41	QGPPPLMNLQV
SEC ID Nº: 42	QGPPMSAYQV
SEC ID Nº: 43	QGPPMQGGLS
SEC ID Nº: 44	QGPPPLMSLAV
SEC ID Nº: 45	QGPPPLMSLTV
SEC ID Nº: 46	QGPLSGWAQV

(cont.)

<b>SEC ID N°</b>	<b>Secuencia distintiva</b>
SEC ID N°: 47	QGPLSQSSQV
SEC ID N°: 48	QGPLSSQSQV
SEC ID N°: 49	QGPLGQQGQV
SEC ID N°: 50	QGPPLQWFQV
SEC ID N°: 51	QGPPLQWTQV
SEC ID N°: 52	QGPPLMALSV
SEC ID N°: 53	QGPPLMWSQV
SEC ID N°: 54	QGPPGQWGQV
SEC ID N°: 55	QGPPGSWSQV
SEC ID N°: 56	QGPPLMSSQS
SEC ID N°: 57	QGPPLMGLSV
SEC ID N°: 58	QGPPLMTLQV
SEC ID N°: 59	QGPPGQWYQS
SEC ID N°: 60	QGPPLQWMQA
SEC ID N°: 61	QGPPLQWMQV
SEC ID N°: 62	QGPPLMSTQV
SEC ID N°: 63	QGPPLMSLSV
SEC ID N°: 64	QGPPLMSLQS
SEC ID N°: 65	QGPPLMSLQA
SEC ID N°: 66	QGPPLMSVQS
SEC ID N°: 67	QGPPLMSAQS
SEC ID N°: 68	QGPPLMSGQS
SEC ID N°: 69	QGPPLMSGQV

5 La presente invención proporciona los agentes peptídicos como se han desvelado anteriormente y, además, ácidos nucleicos que codifican dichos agentes peptídicos. Dichos ácidos nucleicos se pueden denominar "ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención". A continuación, el término "agente" incluye tanto agentes peptídicos de la presente invención como ácidos nucleicos que codifican dichos agentes peptídicos. El experto en la materia conoce cómo diseñar o identificar ácidos nucleicos que codifican dichos agentes peptídicos de acuerdo con el código genético.

10 Por tanto, la presente invención desvela ácidos nucleicos que comprenden uno o más segmentos que codifican uno o más agentes peptídicos de acuerdo con la presente invención. Dicho ácido nucleico puede ser ARN o ADN. Dicho ácido nucleico puede ser además un vector, es decir, los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la presente invención se pueden incorporar dentro de un vector. Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la presente invención pueden incorporarse además en un virus. Por tanto, la invención también proporciona un virus que contiene, dentro de su genoma, que comprende uno o más segmentos que codifican uno o más agentes peptídicos de acuerdo con la presente invención.

5 Preferentemente, los agentes peptídicos de la presente invención son inhibidores altamente potentes de la entrada del VIH en células, es decir, tienen una alta potencia anti-VIH. De acuerdo con la presente invención, las expresiones "alta potencia de VIH", "alta potencia" o "altamente potente" se usan con respecto a agentes o agentes peptídicos que tienen un valor de CI50, medido por ensayos de fusión celular y replicación de VIH descritos en Materiales y Procedimientos de 1000 pM (1 nM) o menor, preferentemente menos de 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90; 80, 70, 60, 50, 40, 30 o 20 pM.

10 En la bibliografía, la potencia de los agentes se expresa en ocasiones en términos de valores de "CI50" obtenidos de un ensayo de unión competitiva, es decir, típicamente con respecto a una competición con una molécula trazadora marcada para unirse al receptor de interés. En este caso, la CI50 se define como la concentración del agente a la cual el 50% del trazador se desplaza del receptor por dicho agente y en ocasiones también se denomina una "afinidad aparente". Sin embargo, para los agentes de la presente invención se ha observado que tales valores de CI50 de afinidad aparente obtenidos, por ejemplo, con respecto a RANTES nativo o MIP-1 beta no siempre son proporcionales a la potencia anti-VIH de la molécula. Por tanto, es preferible usar valores de CI50 obtenidos de los ensayos descritos en Material y Procedimientos.

15 En realizaciones preferidas, los agentes peptídicos son péptidos o polipéptidos que están relacionados con el péptido RANTES. Los agentes peptídicos pueden comprender la secuencia SEC ID N°: 1 o una variante, homólogo (ortólogo, variante alélica, derivado, mutante funcional) o fragmento de la misma. Preferentemente, dicha secuencia o la variante, homólogo o fragmento o de la misma constituye o está localizada dentro de una parte diferente del agente peptídico que la secuencia distintiva. Sin embargo, la secuencia distintiva también puede estar contenida dentro de la SEC ID N°: 1 variante u homóloga.

Dichas variantes, homólogos o fragmentos pueden contener sustituciones, inserciones, deleciones, adiciones o truncamientos de secuencia.

25 De acuerdo con la presente invención se dice que una secuencia lleva similitud con o es un homólogo de la SEC ID N°: 1 si dicha secuencia tiene una identidad de más del 70% con la SEC ID N°: 1. Preferentemente, dicha secuencia tiene una identidad de secuencia de más del 70% con la SEC ID N°: 1, más preferentemente más del 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,9% de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 1.

30 También se dice que una secuencia lleva similitud con o es un homólogo de la SEC ID N°: 1 si contiene una o más sustituciones conservativas con respecto a la SEC ID N°: 1. Las sustituciones conservativas son sustituciones en la secuencia de un agente peptídico o polipeptídico que no conducen a una pérdida significativa de función de dicho agente o que conducen a una pérdida solamente pequeña de función. Tal pérdida de función debido a una o más sustituciones conservativas se puede considerar que no es significativa si dicha pérdida asciende a menos del 20% (preferentemente menos del 15%, 10%, 6% o 4%) con respecto a la función del agente que tiene la secuencia no sustituida. Las sustituciones conservativas con frecuencia son sustituciones en las que una cadena lateral de aminoácido se sustituye por una cadena lateral de aminoácido que está relacionada o es similar en propiedades físicoquímicas con el resto sustituido. Tales sustituciones conservativas pueden realizarse, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la columna central y preferentemente en la misma línea en la columna derecha pueden sustituirse entre sí:

**Tabla 2**

alifático	No-polar	G A P
		I L V
	polar no cargado	C S T M
		N Q
polar cargado	D E	
	K R H	
aromático		H F W Y

40 De acuerdo con la presente invención, se dice que una secuencia lleva similitud con o es un homólogo de la SEC ID N°: 1 si más del 30% de los restos en dicha secuencia son idénticos o están sustituidos conservativamente con respecto a la SEC ID N°: 1. Preferentemente, más del 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dicha secuencia es idéntico o está sustituido conservativamente con respecto a la SEC ID N°: 1.

5 La invención proporciona adicionalmente polipéptidos que comprenden fragmentos de la SEC ID N°: 1 o dichos homólogos de la misma. Los fragmentos deben comprender al menos n aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 1 o dichos homólogos de la misma y, dependiendo de la secuencia particular, n es 5 o más (preferentemente más de 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 57).

10 Los agentes peptídicos de la invención tienen preferentemente una baja actividad de señalización, es decir, su administración y/o unión a CCR5 causa solamente un bajo grado de señalización proinflamatoria en células diana. Los agentes peptídicos con una "baja actividad de señalización" de acuerdo con la presente invención conducen a una respuesta de señalización del 30% o menos de la respuesta máxima ( $E_{\text{máx}}$ ) provocada por PSC-RANTES, cuando se ensaya a una concentración de 300 nM en el ensayo de señalización de Flujo de Calcio (véase Materiales y Procedimientos). Preferentemente, los agentes peptídicos de la invención tienen actividades de señalización, medidas en dicho ensayo, de menos del 30%, más preferentemente menos del 26%, 22%, 20%, 18%, 16%, 14%, 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1%.

15 Los agentes peptídicos de la invención preferentemente son selectivos para CCR5 con respecto a los receptores CCR1 y CCR3. De acuerdo con la presente invención, un agente que se une a CCR1 y/o CCR3 al igual que CCR5 todavía se considera que tiene selectividad para CCR5 con respecto a CCR1 y CCR3 si no activa sustancialmente CCR1 o CCR3. Más preferentemente, los agentes de la presente invención no se unen sustancialmente a ni activan sustancialmente CCR1 y CCR3. En el contexto de la presente invención se considera que un agente no se une sustancialmente a CCR1 y/o CCR3 si el valor de  $CI_{50}$  del agente con respecto a la unión de CCR1 y/o CCR3 es mayor de 50 nM, más preferentemente mayor de 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 1000 nM, medido usando el Ensayo de Unión de Distinción de CCR1 y/o el Ensayo de Unión de Distinción de CCR3 (véase Materiales y Procedimientos). La selectividad de la activación de CCR5 con respecto a la activación de CCR1 y/o CCR3 se puede evaluar mediante el Ensayo de Flujo de Calcio como se describe en Materiales y Procedimientos. En el contexto de la presente invención se considera que un agente no activa sustancialmente CCR1 y/o CCR3 si su actividad de señalización es menos del 30%, más preferentemente menos del 26%, 22%, 20%, 18%, 16%, 14%, 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% de la  $E_{\text{máx}}$  provocada en ese receptor por RANTES nativo/CCL5, medido por el Ensayo de Flujo de Calcio.

30 Los agentes peptídicos de la invención tienen preferentemente una alta actividad de secuestro de receptor, es decir, la administración y/o unión a CCR5 causa un alto grado de secuestro de receptor. Dicho secuestro es preferentemente internalización de receptor, regulación negativa o modulación negativa. Los agentes peptídicos con una "alta actividad de secuestro de receptor" de acuerdo con la presente invención conducen al secuestro de al menos el 50% del nivel de control de moléculas CCR5 de superficie cuando se ensaya en el ensayo de Modulación Negativa de superficie de CCR5 / secuestro de receptor (véase en Materiales y Procedimientos). Preferentemente, los agentes peptídicos de la invención tienen actividades de secuestro de receptor de más del 50% del nivel de control de CCR5 de superficie, por ejemplo, al menos el 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% del nivel de control del CCR5 de superficie.

40 Preferentemente, los agentes de la invención combinan una alta potencia anti-VIH con una baja actividad de señalización o combinan una alta potencia anti-VIH con una alta actividad de secuestro de receptor. Más preferentemente, los agentes de la invención combinan una alta potencia anti-VIH tanto con una baja actividad de señalización como alta de secuestro de receptor. Además, los agentes de la invención combinan preferentemente al menos una propiedad seleccionada entre el grupo que consiste en una alta potencia anti-VIH, alta actividad de secuestro de receptor y baja actividad de señalización con selectividad por CCR5. De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas de la invención, los agentes de la invención se caracterizan por una combinación de niveles intermedios de potencia anti-VIH (niveles de  $CI_{50}$ , medidos por el Ensayo de Fusión Celular de, por ejemplo, entre 0,15 y 1 nM, entre 0,15 y 0,7 nM, entre 0,3 y 1 nM o entre 0,5 y 1 nM) con niveles intermedios de actividad de señalización (por ejemplo, entre el 30% y el 50% o entre el 30% y el 45% medidos mediante el Ensayo de Flujo de Calcio) y niveles intermedios de actividad de secuestro de receptor (por ejemplo, entre el 20% y el 60%, entre el 30% y el 50%, entre el 20% y el 50% o entre el 30 y el 60%, medidos por el Ensayo de Modulación Negativa de Superficie de CCR5. Los ensayos se describen más adelante en Materiales y Procedimientos.

55 Los términos proteína, "péptido" o "polipéptido" se usan de forma intercambiable y se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también incluyen cualquier polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador. También se incluyen en la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.) así como

otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden aparecer como cadenas sencillas o cadenas asociadas. Los polipéptidos de la invención pueden estar glucosilados de forma natural o de forma no natural (es decir, el polipéptido tiene un patrón de glucosilación que difiere del patrón de glucosilación encontrado en el polipéptido de origen natural correspondiente).

## 5 Preparación de los agentes peptídicos

Los agentes peptídicos de la invención se pueden preparar de varias maneras, por ejemplo, usando técnicas conocidas de biología molecular (es decir, ingeniería genética y fermentación – en general, biotecnología) o química de proteínas (por ejemplo, síntesis de péptidos química).

10 Los péptidos y agentes de ácido nucleico se preparan preferentemente usando las técnicas conocidas de ingeniería genética como se describe, por ejemplo, en [13]. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para producir agentes peptídicos o polipéptidos de la invención, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped en condiciones que inducen la expresión del polipéptido.

15 Por ejemplo, los agentes peptídicos de la presente invención se pueden preparar en forma recombinante mediante expresión en una célula huésped. Tales procedimientos de expresión se conocen bien por los expertos en la materia y muchos están descritos con detalle en [13]. Se puede elegir un vector de expresión adecuado para el huésped de elección. El vector puede contener una molécula de ADN recombinante que codifica un agente peptídico unido operativamente a una secuencia de control de la expresión que se reconoce por la maquinaria de transcripción del huésped. Cuando un agente peptídico de la invención se produce de este modo mediante expresión recombinante, el agente se recupera mediante purificación de un cultivo de células huésped.

20 Un procedimiento preferido implica la síntesis química *in vitro* [8, 9]. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para producir un agente peptídico, en el que el agente peptídico se sintetiza en parte o completamente usando medios químicos. Se prefiere particularmente la síntesis peptídica en fase sólida, tal como los procedimientos basados en química de tBoc o Fmoc [10]. También se puede usar parcial o completamente la síntesis enzimática [11].

25 Se puede usar la síntesis biológica diferente que mediante expresión en una célula huésped, por ejemplo, los polipéptidos se pueden producir mediante traducción de ARN *in vitro*. Los agentes peptídicos de la invención, por ejemplo, también se pueden preparar digiriendo polipéptidos más largos usando proteasas.

30 Los procedimientos biológicos, incluyendo la ingeniería genética, fermentación y expresión generalmente están restringidos a la producción de polipéptidos basados en L-aminoácidos pero se puede usar la manipulación de la maquinaria de traducción *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, moléculas de aminoacil ARNt) para permitir la introducción de D-aminoácidos (o de otros aminoácidos no naturales, tales como yodotiroxina o metilfenilalanina, azidohomoalanina, etc.) [12]. Cuando se incluyen D-aminoácidos, sin embargo, se prefiere usar la síntesis química. Los polipéptidos de la invención pueden tener modificaciones covalentes en el extremo C y/o extremo N.

### Células huésped

35 La presente invención también proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

40 De acuerdo con un aspecto de la invención, la célula huésped es adecuada para la producción biotecnológica de los agentes de la presente invención. Los huéspedes adecuados para la producción biotecnológica de los agentes de la presente invención incluyen especies procariotas usadas de forma común, tales como *E. coli*, o levaduras eucariotas que se pueden preparar para expresar altos niveles de proteínas recombinantes y que pueden cultivarse de forma sencilla en grandes cantidades. Las líneas celulares cultivadas *in vitro* también son adecuadas, particularmente cuando se usan sistemas de expresión dirigidos por virus tales como el sistema de expresión en Baculovirus que implica el uso de células de insecto como huéspedes. Los agentes peptídicos también se pueden expresar *in vivo*, por ejemplo, en larvas de insecto o en tejidos de mamífero. Preferentemente, el agente peptídico se expresa en *E. coli*; por ejemplo, es adecuada la cepa BLR(DE3) aunque los sistemas equivalentes son igualmente apropiados, de lo que será consciente el lector experto.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una célula huésped que es capaz de sobrevivir y propagarse en el intestino humano o animal o vagina, y preferentemente de expresar en el mismo el agente peptídico codificado por dicho ácido nucleico. Preferentemente, la célula huésped de acuerdo con este aspecto de la invención también secreta dicho agente peptídico en el periplasma o medio. Más adelante en el presente documento, el término "agente" comprende además células huésped como se describe en el presente documento.

50

Preferentemente, la célula huésped es un microorganismo altamente colonizante y no patógeno. Los microorganismos altamente colonizantes de acuerdo con la presente invención son cepas que son capaces de competir con microbios autóctonos por la colonización prolongada de superficies de mucosa interna. La célula huésped es preferentemente un microorganismo que pertenece a la flora del intestino o la vagina humana, más preferentemente un microorganismo que se encuentra de forma común en la flora del intestino o vagina humana. Más preferentemente, la célula huésped es un microorganismo probiótico y/o comensal, es decir, un género, especie o cepa que es beneficioso al menos para el huésped humano. Preferentemente, la célula huésped de acuerdo con la presente invención es parte de la flora intestinal o vaginal humana o animal normal o sana. De acuerdo con una realización, la célula huésped pertenece a un género seleccionado entre el grupo que consiste en Bacteroides, Clostridium, Fusobacterium, Eubacterium, Ruminococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Streptococcus, Escherichia y Lactobacillus. La célula huésped es preferentemente una especie seleccionada entre el grupo que consiste en Escherichia coli, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus iners, Lactobacillus jensenii, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus GG, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum y Streptococcus gordonii. Preferentemente, el microorganismo altamente colonizante de acuerdo con la presente invención es Escherichia coli Nissle 1917. Sin embargo, cualquier otra cepa altamente colonizante de Escherichia coli o cualquier otra especie que se ha mencionado anteriormente también es una cepa preferida de acuerdo con la presente invención. En otra realización, la célula huésped es una levadura. Preferentemente, la levadura es una levadura comensal tal como Pichia guelliermondii o Saccharomyces boulardii. En otra realización, la célula huésped es una célula humana.

El experto está al tanto de los procedimientos de transformación de microorganismos con ácidos nucleicos extraños y del uso posteriormente de los microorganismos transformados para expresar un polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos en forma intracelular, periplásmica o secretada [véase referencias 13, 15, 16, 17].

## 25 **Composiciones farmacéuticas**

La presente invención proporciona composiciones que comprenden un agente de acuerdo con la presente invención y un medio de soporte farmacéuticamente aceptable. Los agentes de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de los agentes peptídicos o ácidos nucleicos correspondientes, por tanto, se proporcionan para su uso como un medicamento. Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender cualquier agente de la presente invención, es decir, más adelante en el presente documento, un agente peptídico, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un ácido nucleico, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una célula huésped de acuerdo con la presente invención. La preparación de composiciones farmacéuticas se conoce bien por el experto en la materia.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender en particular más de un agente (múltiple) de la presente invención, por ejemplo, dos o más agentes. La invención también proporciona una preparación o sistema farmacéutico que comprende (a) un primer agente, que es un agente de la invención; y (b) un segundo agente farmacéutico. De acuerdo con ciertas realizaciones, el segundo agente farmacéutico puede incluir inhibidores de la transcriptasa inversa (RTI), inhibidores de proteasa (PI), inhibidores de la integrasa e inhibidores del ensamblaje vírico. De acuerdo con realizaciones adicionales, el segundo agente farmacéutico puede incluir otros inhibidores de entrada que los de la presente invención, por ejemplo, sustancias polianiónicas (por ejemplo, sulfato de celulosa), agentes de unión a glicano o lectinas, agentes de unión a receptor de glucano (por ejemplo, manano soluble), anticuerpos, inhibidores de entrada de molécula pequeña, inhibidores de entrada de péptidos o agentes de unión a CXCR4 (de bloqueo de CXCR4). De acuerdo con otras realizaciones adicionales, el segundo agente farmacéutico puede incluir un detergente o un agente que modifica el pH, por ejemplo, un ácido o un agente de tamponamiento del pH. De acuerdo con otras realizaciones más, el segundo agente farmacéutico puede incluir un ARN inhibidor (ARNip), en el que el ARNip puede estar químicamente modificado.

De acuerdo con otros aspectos de la invención, dicho segundo agente también puede ser un fármaco antiinflamatorio o un inmunosupresor. Dichos agentes múltiples de la invención o dicho primer y segundo agente se formulan en mezcla o como composiciones separadas, por ejemplo, para la administración simultánea aunque separada o para la secuencial (véase más adelante).

Las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes de la invención pueden por supuesto prepararse mediante procedimientos convencionales, tal como haciendo reaccionar la base y/o ácido libre del agente con al menos una cantidad estequiométrica del ácido o base formadora de sal deseada.

Las sales farmacéuticamente aceptables de agentes de la invención incluyen sales con cationes inorgánicos tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, cinc y amonio y sales con bases orgánicas. Las bases orgánicas adecuadas incluyen *N*-metil-*D*-glucamina, arginina, benzatrina, diolamina, olamina, procaína y

5 trometamina. Las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes de la invención también incluyen sales obtenidas de ácidos orgánicos o inorgánicos. Los aniones adecuados incluyen acetato, adipato, besilato, bromuro, camsilato, cloruro, citrato, edisilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hiporato, hclato, bromhidrato, clorhidrato, ioduro, isetionato, lactato, lactobionato, maleato, mesilato, metilbromuro, metilsulfato, napsilato, nitrato, oleato, pamoato, fosfato, poligalacturonato, estearato, succinato, sulfato, sulfosalicilato, tanato, tartrato, tereftalato, tosilato y trietiodida.

Las formas de dosificación farmacéuticas de un agente de la invención se pueden proporcionar en un sistema de liberación instantánea, liberación controlada, liberación sostenida o de suministro de fármaco dirigido.

10 Las formas de dosificación usadas comúnmente incluyen, por ejemplo, soluciones y suspensiones, (micro-)emulsiones, pomadas, geles, cremas, pastas, espumas, supositorios, óvulos, implantes, parches, liposomas, comprimidos, grageas, pastillas para chupar, cápsulas de cubierta blanda o dura, polvos amorfos o cristalinos, polvos o comprimidos efervescentes, aerosoles y formulaciones liofilizadas. Dependiendo de la vía de administración usada se pueden requerir dispositivos especiales para la aplicación o administración del fármaco, tales como, por ejemplo, jeringas y agujas, inhaladores, bombas, lápices de inyección, aplicadores, matraces especiales u otros dispositivos para la administración que también se pueden implantar dentro del cuerpo. En particular, los agentes de la presente invención, por ejemplo, también pueden estar comprendidos dentro, o estar asociados con, un dispositivo o agente anticonceptivo, por ejemplo, un dispositivo, espiral o diafragma intrauterino o intracervical, o distribuirse sobre un condón, por ejemplo, contenido en forma de un líquido, solución, gel o polvo de revestimiento. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, los agentes de la presente invención no tienen que estar necesariamente asociados con un dispositivo o agente anticonceptivo. Preferentemente, el agente de la invención está comprendido dentro y se administra mediante un sistema de suministro de liberación prolongada. Preferentemente, dicho sistema de suministro de liberación prolongada comprende un anillo vaginal u otro implante que es adecuado para la inserción y/o implante en la vagina o cuello del útero y proporciona la liberación lenta (controlada y/o sostenida) del agente de la presente invención.

25 Las formas de dosificación farmacéuticas están compuestas con frecuencia del fármaco, un excipiente o excipientes y un sistema de recipiente/cierre. Se pueden añadir uno o múltiples excipientes, también denominados principios activos, a un agente de la invención para mejorar o facilitar la fabricación, estabilidad, administración y seguridad del fármaco y pueden proporcionar un medio para conseguir un perfil de liberación de fármaco deseado. Por lo tanto, el tipo del excipiente o excipientes a añadir al fármaco puede depender de diversos factores, tales como, por ejemplo, las propiedades físicas y químicas del fármaco, la vía de administración y el procedimiento de fabricación. En la técnica están disponibles excipientes farmacéuticamente aceptable e incluyen los enumerados en diversas farmacopeas (véase, por ejemplo, [18, 19]).

30 Las formas de dosificación farmacéuticas de un agente de la presente invención se pueden fabricar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales de mezcla, tamizado, disolución, fundido, granulado, preparación de grageas, formación de comprimidos, suspensión, extrusión, secado por pulverización, levigación, emulsión, (nano/micro-)encapsulación, captura o liofilización. Como se ha señalado anteriormente, las composiciones de la presente invención pueden incluir uno o más principios inactivos farmacéuticamente aceptables que facilitan el procesamiento de moléculas activas en preparaciones para su uso farmacéutico.

40 La formulación apropiada depende de la vía de administración deseada. Por ejemplo, para inyección intravenosa la composición se puede formular en solución acuosa, si es necesario usando tampones fisiológicamente compatibles que incluyen, por ejemplo, fosfato, histidina o citrato para el ajuste del pH de la formulación y un agente de tonicidad, tal como, por ejemplo, cloruro sódico o dextrosa. Para la administración a través de la mucosa o nasal se pueden preferir formulaciones semisólidas, líquidas o parches, que contienen posiblemente mejoradores de la penetración. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica. Para la administración oral, los agentes se pueden formular en formas de dosificación líquidas o sólidas y como formulaciones de liberación instantánea o controlada/sostenida. Las formas de dosificación adecuadas para la ingestión oral por un sujeto incluyen comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas de cubierta dura y blanda, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y emulsiones. Los agentes también se pueden formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Para los supositorios vaginales se pueden usar muchas bases diferentes de supositorio conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, gelatina glicerizada, gelatina despolarizada, manteca de cacao, polietilenglicol, polisorbato u otros.

55 Para la administración oral, los agentes de la invención se proporcionarán generalmente en formas de dosificación sólidas, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas o como una solución o suspensión acuosa.

Las formas de dosificación oral sólidas se pueden obtener usando excipientes que pueden incluir

5 diluyentes inertes, cargas, disgregantes, aglutinantes (secos y húmedos), retardantes de la disolución, lubricantes, emolientes, antiadherentes, resinas de intercambio catiónico, agentes humectantes, antioxidantes, conservantes, agentes colorantes, edulcorantes y saporíferos. Estos excipientes pueden ser de fuente sintética o natural. Los  
 10 ejemplos de tales excipientes incluyen derivados de celulosa, ácido cítrico, fosfato dicálcico, gelatina, carbonato de magnesio, magnesio/lauril sulfato sódico, manitol, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, silicatos, dióxido de silicio, benzoato sódico, sorbitol, almidones, ácido esteárico o una sal del mismo, azúcares (es decir, dextrosa, sacarosa, lactosa, etc.), talco, tragacanto, mucílago, aceites vegetales (hidrogenados) y ceras. El etanol y el agua pueden servir como ayudas para la granulación. En ciertos casos el revestimiento de comprimidos con, por ejemplo, una  
 15 película enmascaradora del sabor, una película resistente al ácido estomacal o una película retardante de la liberación es deseable. Los polímeros naturales y sintéticos, en combinación con colorantes, azúcares y disolventes orgánicos o agua se usan con frecuencia para revestir comprimidos, dando como resultado grageas. Cuando se prefiere una cápsula con respecto a un comprimido, el polvo de fármaco, suspensión o solución del mismo se puede suministrar en una cápsula de cubierta dura o blanda compatible.

15 Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato sódico y cálcico, fosfato sódico y cálcico y lactosa. El almidón de maíz y el ácido algínico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina. El agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos se pueden revestir con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

20 Las cápsulas para su uso oral incluyen cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo está mezclado con un diluyente sólido y cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo está mezclado con agua o un aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

25 En una realización, los agentes de la presente invención se pueden administrar por vía tópica, a través de la piel o membrana mucosa, tal como a través de un parche transdérmico, una formulación semisólida o una líquida, por ejemplo, un gel, una (micro-)emulsión, una pomada, una solución, una (nano/micro)-suspensión o una espuma. La penetración del fármaco en la piel o en la membrana mucosa y en los tejidos subyacentes se puede regular, por ejemplo, usando mejoradores de la penetración; la elección apropiada y combinación de excipientes lipófilos, hidrófilos y anfífilos incluyendo agua, disolventes orgánicos, ceras, aceites, polímeros sintéticos y naturales, tensioactivos, emulsionantes; mediante ajuste del pH; y uso de agentes de formación de complejos. Se pueden usar otras técnicas, tales como iontoforesis, para regular la penetración en la piel de un agente de la invención. La  
 30 administración transdérmica o tópica se preferiría, por ejemplo, en situaciones en las que se desea el suministro local con una mínima exposición sistémica.

35 Para la administración mediante inhalación o la administración a la nariz, los agentes para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una solución, suspensión, emulsión o aerosol semisólido de envases presurizados o un nebulizador, habitualmente con el uso de un propulsor, por ejemplo, carbonos halogenados obtenidos de metano y etano, dióxido de carbono y cualquier otro gas adecuado. Para los aerosoles tópicos son útiles hidrocarburos tales como butano, isobuteno y pentano. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación apropiada se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad graduada. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador. Éstos contienen típicamente una mezcla de polvo del agente y una base de polvo  
 40 adecuada tal como lactosa o almidón.

45 Las composiciones formuladas para administración parenteral mediante inyección son habitualmente estériles y se pueden presentar en formas de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas, jeringas, lápices de inyección o en recipientes multi-dosis, conteniendo los últimos habitualmente un conservante. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación, tales como tampones, agentes de tonicidad, agentes mejoradores de la viscosidad, tensioactivos, agentes de suspensión y dispersantes, antioxidantes, polímeros biocompatibles, agentes quelantes y conservantes. Dependiendo del sitio de inyección, el vehículo puede contener agua, un aceite sintético o vegetal y/o co-disolventes orgánicos. En otros casos, tales como con un producto liofilizado o un concentrado, la formulación parenteral se reconstituirá o diluirá antes de la administración. Las formulaciones de liberación  
 50 prolongada, que proporcionan liberación controlada o sostenida de un agente de la invención, pueden incluir suspensiones inyectables de nano/micro partículas o nano/micro cristales o no micronizados. Los polímeros tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) o copolímeros de los mismos pueden servir como matrices de liberación controlada/sostenida, además de otros bien conocidos en la técnica. Otros sistemas de suministro de liberación prolongada se pueden presentar en forma de implantes y bombas que requieren incisión.

55 Los medios de soporte adecuados para la inyección intravenosa para las moléculas de la invención se conocen bien la técnica e incluyen soluciones basadas en agua que contienen una base, tal como, por ejemplo, hidróxido sódico, para formar un agente ionizado, sacarosa o cloruro sódico como un agente de tonicidad, por

ejemplo. La solución basada en agua puede comprender un tampón que contiene fosfato o histidina. Se pueden añadir co-disolventes, tales como, por ejemplo, polietilenglicoles. Estos sistemas basados en agua son eficaces disolviendo agentes de la invención y producen una baja toxicidad después de la administración sistémica. Las proporciones de los componentes de un sistema de solución se pueden variar considerablemente, sin destruir las características de solubilidad y toxicidad. Además, se puede variar la identidad de los componentes. Por ejemplo, se pueden usar tensioactivos de baja toxicidad, tales como polisorbatos o poloxámeros, al igual que polietilenglicol u otros co-disolventes, polímeros biocompatibles tales como polivinilpirrolidona se pueden añadir y otros azúcares y polioles pueden sustituir dextrosa.

#### Otros aspectos de la invención

La presente invención proporciona además un kit, por ejemplo, un kit de diagnóstico, que comprende uno o más agentes peptídicos, ácido nucleicos o células huésped de acuerdo con la invención.

#### Usos de las moléculas de la invención

##### Usos basados en la función biológica; tratamiento y prevención de enfermedades

La presente invención proporciona el uso de los agentes peptídicos de la presente invención para bloquear y/o causar el secuestro de CCR5. El secuestro puede ser en forma de internalización de CCR5 en células diana y/o la regulación negativa (modulación negativa) de CCR5 en células diana. La invención también proporciona el uso de ácidos nucleicos que codifican dichos agentes peptídicos o de una célula huésped de acuerdo con la presente invención (véase anteriormente) que comprende un ácido nucleico de la presente invención para la expresión y opcionalmente la secreción de dichos agentes peptídicos.

Como se ha mencionado anteriormente, con respecto a la presente invención, el término "agente" incluye agentes peptídicos, ácidos nucleicos que codifican dichos agentes peptídicos células huésped de acuerdo con la invención. La invención proporciona el uso de dichos agentes para el tratamiento y/o profilaxis (prevención) de enfermedades que se pueden tratar bloqueando y/o causando el secuestro de CCR5. Los agentes de la presente invención se proporcionan por tanto para su uso como medicamentos.

Uno o más de los agentes de la presente invención se pueden administrar a un sujeto. Cuando se administra más de un agente, dichos agentes se pueden administrar de forma conjunta (como una mezcla o por separado aunque sustancialmente de forma simultánea) o secuencialmente. Dichos uno o más agentes de la presente invención se pueden administrar en combinación con uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales que no están comprendidos en los agentes de la presente invención. El agente o los agentes de la presente invención entonces también se pueden administrar de forma conjunta (como una mezcla o por separado aunque de forma sustancialmente simultánea) con dicho uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales o secuencialmente.

De acuerdo con un aspecto preferido, la presente invención proporciona el uso de dichos agentes peptídicos, o de ácidos nucleicos que codifican los agentes peptídicos, para el tratamiento y/o prevención de infecciones por VIH y/o la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y/o trastornos y enfermedades asociados con los mismos en un sujeto.

La presente invención proporciona por tanto un procedimiento de tratamiento o prevención de la infección por VIH (la transmisión del VIH) en un sujeto que comprende la administración de una composición que comprende un agente de la presente invención. Además, se proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en un sujeto que comprende la administración de un agente de la presente invención.

Por ejemplo, la transmisión del VIH, es decir, la infección de células diana por VIH, se puede prevenir mediante la aplicación de una composición de acuerdo con la invención (por ejemplo, un supositorio, crema, gel, espuma, pasta, solución, líquido o polvo que contiene un agente de acuerdo con la presente invención). En esta realización, dicha composición se aplica preferentemente a los genitales humanos (vagina, recto, intestino) antes o durante o después del contacto sexual para prevenir la transmisión del VIH durante el contacto sexual. Más preferentemente, dicha composición se aplica antes del contacto sexual.

La presente invención también proporciona el uso de agentes de la presente invención como agentes anti-inflamatorios. Por tanto, los agentes son útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, los agentes de la presente invención son útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades malignas y también para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas y víricas. En el presente documento, el virus puede ser VIH o un virus diferente al VIH.

De acuerdo con aspectos adicionales de la invención también se proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de inflamación, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes o infecciones bacterianas y víricas que comprende la administración de una composición que comprende un agente de la presente invención. En particular, por ejemplo, se proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, ateroma o arteriosclerosis, asma, rinitis alérgica o dermatitis atópica, el rechazo de órganos, tejidos o células trasplantados, esclerosis múltiple y/u otras enfermedades desmielinizantes, neuropatía periférica así como cánceres, incluyendo cánceres metastatizantes.

En una realización preferida de la invención, para cualquiera de las anteriores enfermedades y afecciones, se proporciona un procedimiento de tratamiento o profilaxis en el que se administra una célula huésped como se ha desvelado anteriormente a un sujeto, expresando y secretando dicha célula huésped un agente peptídico de acuerdo con la presente invención.

La invención también proporciona el uso de ácidos nucleicos de la presente invención para terapia génica, en el que dichos ácidos nucleicos se incorporan en un virus para la administración a un sujeto.

### Modos de administración

Las composiciones de la presente invención se pueden suministrar directamente o en composiciones farmacéuticas que contienen excipientes (véase anteriormente), como se conoce bien en la técnica. Los presentes procedimientos de tratamiento implican administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de la presente invención a un sujeto.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente de acuerdo con la presente invención necesaria para tratar, mitigar o prevenir la patología a la que se dirige o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. En general, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, por ejemplo, en primates no humanos, ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Tal información se puede usar después para determinar las dosis útiles y las vías para administración a seres humanos.

La cantidad eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad de la patología, la salud general del sujeto, edad, peso y sexo del sujeto, alimentación, momento y frecuencia de la administración, combinación o combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar mediante experimentación rutinaria y es parte del criterio del médico. Generalmente, una cantidad eficaz, es decir, dosis de un agente será de 0,005 mg/kg a 50 mg/kg, preferentemente de 0,125 mg/kg a 20 mg/kg.

Los regímenes de tratamiento eficaces para agentes preferidos de la invención incluyen la administración una, dos o tres veces al día y/o una, dos, tres, cuatro, cinco o seis veces a la semana). Por lo tanto, estos regímenes se prefieren particularmente para su uso en la presente invención.

Una vía de administración eficaz y cómoda y una formulación apropiada de los agentes de la invención en composiciones farmacéuticas (véase anteriormente) también se pueden determinar de forma sencilla mediante experimentación rutinaria. En la técnica están disponibles diversas formulaciones y sistemas de suministro de fármaco (véase, por ejemplo, [20,21]).

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración vaginal, rectal, intestinal, oral, nasal (intranasal), pulmonar u otra administración a través de la mucosa, tópica, transdérmica, ocular, ótica y parenteral.

Las vías primarias para la administración parenteral incluyen administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. Las vías de administración secundarias incluyen administración intraperitoneal, intra-arterial, intra-articular, intracardiaca, intracisternal, intradérmica, intralesional, intraocular, intrapleural, intratecal, intrauterina e intraventricular. La indicación a tratar, junto con las propiedades físicas, químicas y biológicas del fármaco, dictan el tipo de formulación y la vía de administración a usar, así como si se prefiere el suministro local o sistémico.

Para las composiciones útiles para los presentes procedimientos de tratamiento se puede estimar una dosis terapéuticamente eficaz usando inicialmente una diversidad de técnicas bien conocidas en la técnica. Las dosis iniciales usadas en estudios animales se pueden basar en concentraciones eficaces establecidas en ensayos de cultivo celular. Se pueden determinar intervalos de dosificación apropiados para sujetos humanos, por ejemplo, usando los datos obtenidos de estudios animales y ensayos de cultivo celular.

Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, agente o fármaco de la presente invención se

5 refiere a una cantidad o dosis del agente, agente o fármaco que da como resultado la mitigación de síntomas o una prolongación de la supervivencia en un sujeto. La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales moléculas se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, determinando la DL50 (la dosis mortal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis de efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la proporción de DL50/DE50. Se prefieren los agentes que muestran altos índices terapéuticos.

10 La cantidad eficaz o la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad del agente o composición farmacéutica que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se está buscando por el investigador, veterinario, doctor médico u otro clínico, por ejemplo, regulación del metabolismo de glucosa, disminución en niveles de glucosa en sangre elevados o incrementados, tratamiento o prevención de un trastorno asociado con metabolismo alterado de la glucosa, por ejemplo, diabetes, etc.

15 Las dosificaciones preferentemente se incluyen en un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE50 con baja o sin toxicidad. Las dosificaciones pueden variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y/o la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración, dosificación e intervalo de dosificación se deben elegir de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, en vista de los aspectos concretos de la afección de un sujeto.

20 La cantidad e intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del resto activo que son suficientes para conseguir los efectos deseados, es decir, concentración eficaz mínima (CEM). La CEM variará para cada agente pero se puede estimar, por ejemplo, de datos *in vitro* y experimentos con animales. Las dosificaciones necesarias para conseguir la CEM dependerán de las características individuales y la vía de administración. En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración en plasma.

25 La cantidad de agente o composición administrada puede depender de una diversidad de factores que incluyen el sexo, edad y peso del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, el modo de administración y el criterio del médico a cargo del caso.

30 Las presentes composiciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dosificador que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. Tal envase o dispositivo puede comprender, por ejemplo, metal o lámina de plástico, tal como envase de blíster o tapones de vidrio y goma tales como en viales. El envase dispositivo dosificador puede estar acompañado de instrucciones para la administración. También se pueden preparar composiciones que comprenden un agente de la invención formulado en un medio de soporte farmacéuticamente compatible, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada. La presente invención proporciona por tanto un agente peptídico, ácido nucleico o célula huésped de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones por VIH, el tratamiento y/o prevención del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en el tratamiento y/o prevención de la transmisión por VIH y/o en la prevención de la transmisión del VIH durante el contacto sexual.

40 Por tanto, la presente invención proporciona un agente peptídico, ácido nucleico o célula huésped de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de inflamación, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infecciones bacterianas y víricas, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, ateroma o arteriosclerosis, asma, rinitis alérgica o dermatitis atópica, el rechazo de órganos, tejidos o células trasplantados, esclerosis múltiples y/u otras enfermedades desmielinizantes, neuropatía periférica, enfermedades malignas, cánceres o cánceres metastatizantes.

45 Por tanto, la presente invención proporciona el uso de un agente peptídico, ácido nucleico o célula huésped de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir infecciones por VIH, para tratar y/o prevenir el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o la aparición del mismo y prevenir la transmisión del VIH, por ejemplo, durante el contacto sexual.

50 La presente invención proporciona el uso de un agente peptídico, ácido nucleico o célula huésped de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir inflamación, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes o infecciones bacterianas y víricas, artritis reumatoide, ateroma o arteriosclerosis, asma, rinitis alérgica o dermatitis atópica, el rechazo de órganos, tejidos o células trasplantados, esclerosis múltiple y/u otras enfermedades desmielinizantes, neuropatía periférica, enfermedades malignas, cánceres o cánceres metastatizantes.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La Figura 1 muestra detalles de la caracterización de un derivado de citocina de polipéptido típico que

5 consiste en la SEC ID N°: 21 fusionada al extremo N de la SEC ID N°: 1. El polipéptido se preparó mediante síntesis química total como se describe en Materiales y Procedimientos. UA: Unidades de absorción. El panel A muestra HPLC analítica de material en bruto después de la escisión con HF. El panel B muestra una HPLC analítica de material deseado purificado de la preparación en bruto. El panel C muestra el trazo de una HPLC analítica de la mezcla de reacción después de la purificación y replegado/formación de puentes disulfuro. El panel D muestra el trazo obtenida mediante HPLC analítica con el material purificado replegado.

## MODOS DE REALIZAR LA INVENCION

### Materiales y Procedimientos

#### 10 Preparación de polipéptidos mediante síntesis química

15 La preparación de quimiocinas mediante síntesis química total se realizó en un sintetizador de péptidos ABI 430 modificado personalizado para realizar química de Boc con neutralización *in situ* [22]. La estrategia de síntesis también mostró una etapa de protección química (para terminar cualquier cadena con grupos amino libres al final de la etapa de acoplamiento) usando acetilglicina en cada ciclo. Después de la escisión por HF, los productos en bruto se analizaron mediante HPLC analítica y espectrometría de masas MALDI. Después de la purificación a escala preparativa del producto deseado se realizó replegado de proteínas y formación de puentes disulfuro de acuerdo con procedimientos publicados [23] y el material replegado se verificó mediante HPLC analítica (tiempo de retención más corto) y espectrometría de masas de electronebulización (pérdida de unidades de masa debido a oxidación del grupo tiol de la cisteína durante la formación de puentes disulfuro). Los productos finales se sometieron a purificación a escala preparativa y después se liofilizaron. Los detalles de la caracterización del material intermedio y parcialmente purificado para HPLC para una síntesis típica de una proteína de la invención que consiste en la SEC ID N°: 21 fusionada al extremo N de la SEC ID N°: 1 se muestra en la figura 1. Los resultados de la caracterización del material purificado de dicha proteína mediante espectrometría de masas se proporcionan en la siguiente tabla:

**Tabla 3: Caracterización de material purificado por espectrometría de masas**

Proteína que consiste en la SEC ID N°: 21 fusionada al extremo N de la SEC ID N°: 1	Masa calculada	Masa Observada
Material antes de replegado	7976,26	7976,76 ± 0,24
Material después del replegado	7922,26	7972,68 ± 0,36

25 El análisis del producto final mediante HPLC analítica se muestra en la figura 1.

#### Preparación de polipéptidos mediante expresión en organismos huésped

Los agentes polipeptídicos se prepararon mediante expresión en organismos huésped usando técnicas rutinarias que se conocen en la técnica, siguiendo procedimientos descritos, por ejemplo, en las referencias [13] y [14].

#### 30 Ensayo de Fusión Celular

35 Este procedimiento se realizó como se describe en [5] usando las líneas celulares HeLa-P5L [2] y HeLa-Env-ADA [26]. Las células HeLa-P5L se sembraron en placas de 96 pocillos ( $10^4$  células por pocillo). Veinticuatro horas después se retiró el medio y se sustituyó con medio que contenía  $10^4$  células HeLa-Env-ADA por pocillo más agentes peptídicos de quimiocinas de la presente invención. Después de 24 horas adicionales, las células se lavaron una vez en PBS, se lisaron y se ensayaron para actividad de  $\beta$ -galactosidasa mediante la adición del sustrato colorigénico CPRG (clorofenol rojo- $\beta$ -D-galactopiranosido). Los resultados se expresaron de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$100 \times (\text{absorbancia media} [\text{tratados}] - \text{absorbancia media} [\text{células sin envuelta}]) / (\text{absorbancia media} [\text{sin quimiocina}] - \text{absorbancia media} [\text{células sin envuelta}]).$$

40 Las mediciones se realizaron por triplicado para cada experimento independiente y los valores de CI50 obtenidos de curvas de dosis-inhibición se ajustaron usando el software Prism<sup>®</sup> (GraphPad). El valor de CI50 representa la concentración de un agente peptídico a la que se inhibió la fusión celular el 50% en comparación con un control que no se había expuesto a ningún agente inhibidor.

### Ensayo de Replicación Vírica

La replicación vírica se ensayó como se describe en las referencias [24] y [25], con la modificación de que se usaron células HeLa como material de partida y se añadieron células indicadoras SX22-1 solamente después de la expresión del virus.

### Ensayo de Flujo de Calcio

5 Los agentes se ensayaron para estimulación de la señalización de calcio mediante CCR5, CCR1 o CCR3 usando células (por ejemplo, células de Riñón Embrionario Humano (HEK)) transfectadas para dar una expresión estable de CCR5, CCR1 o CCR3, respectivamente. El procedimiento se realizó esencialmente como se describe en la referencia [6], usando placas de 96 pocillos y un fluorímetro FLEXstation (Molecular Devices). Las mediciones de fluorescencia se realizaron en dichas células cargadas con Fluo-4 (Molecular Probes) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se mantuvieron a 37°C. Las mediciones se realizaron por sextuplicado (n = 6) a una concentración de agente único (300 nM; una concentración que da E<sub>máx</sub> por PSC-RANTES y RANTES nativo).

### Ensayo de Modulación Negativa de Superficie de CCR5

15 Se sembraron células CHO-CCR5 [5] a 80.000 células/ml en placas de 96 pocillos. Al siguiente día se retiró el medio y se sustituyó con medio que contenía quimiocinas a diferentes concentraciones y las células se incubaron durante 1 h a 37°C. Al final de este periodo se retiró el medio y las células se fijaron con paraformaldehído al 4%. Después de dos lavados con PBS se añadieron soluciones de anticuerpo anti-CCR5 conjugado con ficoeritrina (clon 3A9, Pharmingen) o anticuerpo anti-CCR1 conjugado con ficoeritrina (para control negativo) en PBS- BSA al 1% a las células. Las placas se dejaron sobre hielo durante 1 h, después se lavaron tres veces con PBS-BSA al 1% antes de que se determinaran los valores de fluorescencia usando un fluorímetro FLEX-station. Los resultados se expresaron como el % del nivel de control de CCR5 de superficie:

20 **100 x (fluorescencia media [quimiocinas añadidas, anti-CCR5] – fluorescencia de control negativo media [anti-CCR1]) / (fluorescencia de control positivo media [sin quimiocinas añadidas, anti-CCR5] – fluorescencia media [anti-CCR1]).**

25 Cada determinación se realizó por sextuplicado (n = 6) y se usó PSC-RANTES como una quimiocina de referencia en cada experimento.

### Ensayo de Distinción de CCR1

30 La selectividad de CCR5 con respecto a CCR1 se midió en un ensayo de unión de competición de CCR1 usando un ligando de CCR1 natural radiomarcado como un trazador. MIP-RANTES/CCR5 puede usarse, por ejemplo, como un trazador para este Ensayo de Distinción de CCR1. El ensayo se realizó como se describe en la referencia [27].

### Ensayo de Distinción de CCR3

35 La selectividad de CCR5 con respecto a CCR1 se midió en un ensayo de unión de competición de CCR3 usando un ligando de CCR3 natural radiomarcado como un trazador. Se puede usar, por ejemplo, eotaxina/CCL11 o RANTES/CCL5 como un trazador para este Ensayo de Distinción de CCR3. El ensayo se realizó como se describe en la referencia [28].

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 Medición de potencia anti-VIH mediante el Ensayo de Fusión Celular

40 Se prepararon agentes peptídicos mediante síntesis química como se describe en Materiales y Procedimientos. Estos agentes se evaluaron individualmente usando el Ensayo de Fusión Celular como se describe en Materiales y Procedimientos y se obtuvieron valores de CI50 mediante la comparación del resultado del ensayo en presencia de los agentes con el resultado del ensayo obtenido en ausencia de los agentes. Los valores de CI50 obtenidos se enumeran en la Tabla 4.

45 En general, se encontraron bajos valores de CI50, es decir, altos valores de potencia anti-VIH para agentes peptídicos que se ajustaran bien a la secuencia distintiva consenso N-terminal Q G P [P/L] [L/G] [M/D] X X [Q/L]X o QGP [P o L][L o G o S o M][M o D o S o Q o G]XX[Q o G o L o A o T o S]X, en la que X representa a cualquier aminoácido y "/" representa "o". Son ejemplos de tales compuestos los derivados de RANTES que consisten en las secuencias distintivas N-terminales SEC ID N°: 2-69 fusionadas a las posiciones 10-68 de la secuencia de RANTES nativa (SEC ID N°: 1).

Tabla 4 Caracterización de los agentes peptídicos de la invención

Secuencia distintiva SEC ID N°:	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante el ensayo de fusión celular	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante el ensayo de replicación viral	Señalización de CCR5 (%) <sup>(1)</sup>	Secuestro de CCR5 (%) <sup>(2)</sup>
2	0,02	0,194	1,4	5
3	0,02		<5	3
4	0,02	0,380	4,6	3
5	0,02	0,576	5,3	0
6	0,02	0289	1,4	3
7	0,02	0,179	0,7	10
8	0,03	0,278	2,5	0
9	0,03	0,187	4,8	2
10	0,03	0,403	2,3	0
11	0,03		1,6	9
12	0,03	0,204	4,1	4
13	0,07		<5	9
14	0,13		1,4	8
15	0,65		2,4	2
16	0,02	0,091	96,3	70
17	0,02	129	87,7	70

(cont.)

Secuencia distintiva SEC ID N°:	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante el ensayo de fusión celular	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante el ensayo de replicación viral	Señalización de CCR5 (%)(1)	Secuestro de CCR5 (%)(2)
18	0,08		90,1	69
19	0,28		85,1	66
20	0,66		95,6	71
21	0,54		14,2	54
22	0,02	0,470	2,4	12
23	0,03	0,625	5,3	35
24	0,03	0,174	2,4	35
25	0,03		0,0	13
26	0,58		9,4	41
27	0,03		14,6	40
28	0,03	0,213	45,0	59
29	0,39		22,6	36
30	0,01		4,1	4
31	0,02		3,6	6
32	0,03		6,0	5
33	0,03		0,2	0
34	0,03		5,1	8
35	0,05		4,9	5
36	0,05		5,1	7
37	0,09		0,7	5
38	0,10		0,3	3
39	0,10		1,7	5
40	0,11		0	6
41	0,12		0	9
42	0,16		0,2	0
43	0,29		0,3	4
44	0,02		68,5	60
45	0,02		77,4	62

(cont.)

Secuencia distintiva SEC ID N°:	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante el ensayo de fusión celular	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante el ensayo de replicación viral	Señalización de CCR5 (%)(1)	Secuestro de CCR5 (%)(2)
46	0,40		97,6	72
47	0,44		96,9	78
48	0,64		100,5	78
49	0,74		97,2	77
50	0,02		7,6	11
51	0,02		5,0	12
52	0,02		8,3	11
53	0,02		5,1	16
54	0,06		2,1	12
55	0,07		7,3	33
56	0,15		7,5	15
57	0,16		4,9	18
58	0,23		0,7	25
59	0,23		6,0	15
60	0,02		11,8	8
61	0,02		12,7	7
62	0,03		29,6	45
63	0,03		42,7	50
64	0,04		17,2	28
65	0,04		11,5	30
66	0,07		33,4	42
67	0,12		10,3	15
68	0,17		10,6	24
69	0,22		20,1	38

(1) el % de señalización se expresa como el % de la respuesta máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ ) provocada por PSC-RANTES, cuando se ensaya a una concentración de 300 nM en el ensayo de señalización de Flujo de Calcio como se describe en Materiales y Procedimientos.

(2) el % de secuestro se expresa como la cantidad de secuestro con respecto al nivel de control de moléculas de CCR5 de superficie cuando se ensaya en el ensayo de Modulación Negativa de superficie de CCR5/secuestro de receptor como se describe en Materiales y Procedimientos.

**Ejemplo 2 Medición de potencia anti-VIH mediante el Ensayo de Replicación Viral**

Se prepararon agentes peptídicos de la invención mediante síntesis química como se describe en Materiales y Procedimientos. Los agentes se evaluaron individualmente usando el Ensayo de Replicación Viral como se describe en Materiales y Procedimientos y se obtuvieron valores de CI50 mediante la comparación del resultado del ensayo en presencia de los agentes con el resultado del ensayo obtenido en ausencia de los agentes. Los valores de CI50 obtenidos se enumeran en la Tabla 4.

En general se encontraron bajos valores de CI50, es decir, altos valores de potencia anti-VIH para agentes peptídicos que se ajustaron bien a la secuencia distintiva consenso N-terminal Q G P [P/L] [L/G] [M/D] X X [Q/L] X en la que X representa cualquier aminoácido y "/" representa "o". Son ejemplos de tales compuestos los derivados de RANTES que consisten en las secuencias distintivas N-terminales SEC ID N°: 2-29 fusionadas a las posiciones 10-68 de la secuencia de RANTES nativo (SEC ID N°: 1).

**Ejemplo 3 Medición de la señalización celular mediante el Ensayo de Flujo de Calcio**

Se evaluaron los agentes peptídicos preparados mediante síntesis química como se describe en Materiales y Procedimientos usando el Ensayo de Flujo de Calcio como se describe en Materiales y Procedimientos. Los valores de "señalización" obtenidos usando dicho ensayo para agentes peptídicos individuales de la presente invención se enumeran en la Tabla 4.

En general se encontraron bajos valores de señalización de, por ejemplo, como mucho el 6% o el 10% para agentes peptídicos que se ajustaron bien a la secuencia distintiva consenso N-terminal Q G P P L M [S/G] [L/F/T] Q [S/V] en la que "/" representa "o". Son ejemplos de tales compuestos los derivados de RANTES que consisten en las secuencias distintivas N-terminales SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24 o SEC ID N°: 25 fusionadas a las posiciones 10-68 de la secuencia de RANTES nativo (SEC ID N°: 1). Sin embargo, los derivados de RANTES de la presente invención con otras secuencias distintivas, tales como la SEC ID N°: 27 y la SEC ID N°: 21 también presentaron bajos valores de señalización del 20% o menos, el agente peptídico que lleva la secuencia distintiva SEC ID N°: 29 consiguió un bajo valor de señalización del 30% o menos y el agente peptídico que lleva la secuencia distintiva SEC ID N°: 28 consiguió un valor de señalización inferior al 46%. En global, se observaron bajos valores de señalización para agentes peptídicos que se ajustaron a la secuencia distintiva consenso N-terminal QGPP[G/L][M/Q]XX[Q/S][S/V] o QGPP[G/L][M/Q][S/G/W/A/T][L/F/T/S/G/Y][Q/S][S/V], por ejemplo, incluyendo derivados de RANTES que tienen las secuencias distintivas N-terminales SEC ID N°: 50, SEC ID N°: 51, SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 54 o SEC ID NO: 55.

**Ejemplo 4 Ensayo de secuestro de receptor mediante el Ensayo de Modulación Negativa de Superficie de CCR5**

Se evaluaron los agentes peptídicos preparados mediante síntesis química como se describe en Materiales y Procedimientos usando el Ensayo de Modulación Negativa de Superficie de CCR5 como se describe en Materiales y Procedimientos. Los valores de "secuestro de CCR5" obtenidos usando dicho ensayo para agentes péptidos individuales de la presente invención se enumeran en la Tabla 4. Los valores de secuestro de CCR5 obtenidos en los ensayos equivalentes de documentos de la técnica anterior se enumeran en la Tabla 5.

En general se encontraron altos valores de secuestro de CCR5 de, por ejemplo, al menos el 60% o el 65% o más para agentes peptídicos que se ajustaron bien a la secuencia consenso N-terminal Q G P P G D [T/I] VL [W/A], en la que "/" representa "o". Son ejemplos de tales compuestos los derivados de RANTES que consisten en las secuencias distintivas N-terminales SEC ID N°: 16 o SEC ID N°: 17 fusionadas a las posiciones 10-68 de la secuencia de RANTES nativa (SEC ID N°: 1). Sin embargo, los derivados de RANTES de la presente invención con otras secuencias distintivas, tales las SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20 también se caracterizaron por alta actividad de secuestro de CCR5 de, por ejemplo, el 60% o el 65% o más. Además, los agentes peptídicos de derivado de RANTES con las secuencias distintivas SEC ID N°: 21 y SEC ID N°: 28 también se caracterizaron por una alta actividad de secuestro de CCR5, es decir, de al menos el 50% o al menos el 54%, 55% o 59%. En global, se observaron altos valores de secuestro de CCR5 para agentes peptídicos que se conformaron a la secuencia distintiva consenso N-terminal QGP[P/L] [L/G/S] [D/S/G/Q]XX[L/A/T/Q] [W/A/V] o QGP[P/L][L/G/S][D/S/G/Q][T/I/S/W/Q][V/L/A/S/G] [L/A/T/Q][W/A/V], por ejemplo, incluyendo derivados de RANTES que tienen las secuencias distintivas N-terminales SEC ID N°: 44, SEC ID N°: 45, SEC ID N°: 46, SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 48, SEC ID N°: 49.

**Ejemplo 5 Ejemplo Comparativo**

Los derivados de RANTES de la técnica anterior como se enumera en la Tabla 5 se evaluaron usando ensayos como se han descrito para los agentes de la invención en el Ejemplo 1 al Ejemplo 4. Los resultados obtenidos en estos ensayos con los derivados de RANTES de la técnica anterior se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5 Caracterización de los derivados de citocina de la técnica anterior seleccionados

Nombre del agente	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante ensayo de fusión celular	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante ensayo de replicación vírica	Señalización de CCR5 (%) <sup>(1)</sup>	Secuestro de CCR5 (%) <sup>(2)</sup>
Met-RANTES <sup>(3)</sup>	75,14		15,0	26
AOP-RANTES <sup>(4)</sup>	1,12		80,7	71
NNY-RANTES <sup>(5)</sup>	0,29		84,5	77

(cont.)

Nombre del agente	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante ensayo de fusión celular	Potencia anti-VIH (CI50, nM) mediante ensayo de replicación vírica	Señalización de CCR5 (%) <sup>(1)</sup>	Secuestro de CCR5 (%) <sup>(2)</sup>
PSC-RANTES <sup>(6)</sup>	0,02	0,281	100,0	75
P1 <sup>(7)</sup>	6,59		0,0	5
P2 <sup>(7)</sup>	1,61		93,8	68

(1) El % de señalización se expresa como el % de la respuesta máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ ) provocada por PSC-RANTES, cuando se ensaya a una concentración de 300 nM en el Ensayo de Señalización de Flujo de Calcio como se describe en Materiales y Procedimientos.

(2) El % de secuestro se expresa como la cantidad de secuestro con respecto al nivel de control de moléculas de CCR5 de superficie cuando se ensaya en el ensayo de Modulación Negativa de superficie de CCR5 / secuestro del receptor como se describe en Materiales y Procedimientos.

(3) Compuesto descrito en la referencia [13]

(4) Compuesto descrito en la referencia [2]

(5) Compuesto descrito en la referencia [3]

(6) Compuesto descrito en la referencia [5]

(7) Compuesto descrito en la referencia [6]

## 5 Ejemplo 6 Ensayo de la eficacia *in vitro* de nuevas moléculas contra subtipos de VIH a nivel mundial

Las moléculas se ensayan frente a cepas de R5 representativas de todo el mundo.

En resumen, se ensayan aislados del VIH primarios obtenidos de diferentes sitios de campo a lo largo del mundo y puestos a disposición mediante depósitos de reactivo para su sensibilidad a la inhibición en ensayos de

replicación usando células primarias humanas.

El procedimiento se puede realizar como se describe en la referencia [29] o del siguiente modo:

5 Cultivos celulares. Se purifican PBMC de sangre de diferentes donantes humanos negativos a VIH mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque. Las PBMC purificadas se resuspenden en RPMI (Mediatech, Inc., Herndon, Pa.) complementado con suero fetal bobino al 10% (FBS; Life Technologies, Inc., Rockville, Md.), 100 U de penicilina y 100 µg de estreptomina (pen/strep; Mediatech, Inc.) por ml, 1 ng de interleucina-2 humana recombinante (IL-2; LifeTechnologies, Inc.) por ml y 1 U de fitohemaglutinina (PHA; Life Technologies, Inc.) por ml.

10 Virus. Se obtienen las siguientes cepas de VIH-1 R5 NSI del Programa de Investigación y Reactivos del SIDA: A-92RW009, A-92RW008, A-93UG075, B-92BR021, B-92TH026, B-BaL, C-92BR025, C-93IN101, D-94UG108, E/A-92TH022, E-92TH001, B/F-93BR019, F-93BR029, G-92NG083-JV1083 y G-92NG003-G3. También se obtienen dos cepas SI X4 (HXB2 y F-93BR020) del Programa de Reactivos de SIDA para su uso como controles. Para la mayoría de las cepas que se han enumerado anteriormente, la letra delante del guión indica el subtipo de la envuelta vírica y va seguida del año de aislamiento, país de origen y número de cepa, por ejemplo, A-92RW009 es una cepa del VIH-1 subtipo A aislada en Ruanda en 1992. Todos estos virus se propagan en cultivos de PBMC hasta que se obtienen altos títulos de virus (determinados mediante la actividad de transcriptasa inversa [RT]) en sobrenadantes de cultivo. Después se calculan los valores de dosis infectiva del cultivo tisular del 50% para cada virus usando la técnica de Reed-Muench [30].

20 Ensayos de replicación. Se añaden PBMC tratadas con PHA/IL-2 a placas de 96 pocillos (2 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) que contienen inhibidores diluidos de forma seriada. El aislado de VIH-1 apropiado en medio RPMI completo (aproximadamente 0,1 de multiplicidad de infección [MOI]) se añade después. Se realizan experimentos por triplicado con todos los aislados de VIH-1 R5 NCI. El día 3 post-infección, cada placa se centrifuga durante 5 min a 1.200 x g en una centrifuga de cesto basculante. Después se retira una alícuota (150 µl) de sobrenadante sin células de cada pocillo y se sustituye con 150 µl de medio RPMI completo que contiene las concentraciones apropiadas de inhibidor. Los días 5, 10 y 15 post-infección, cada placa se centrifuga de nuevo durante 5 min y se retiran muestras de sobrenadante sin células (25 µl) y se almacenan a -70° C para el análisis posterior. Los cultivos se desechan el día 15.

La producción de virus en presencia de inhibidores se mide en sobrenadantes sin células usando ensayos de RT como se ha descrito previamente [31].

### 30 **Ejemplo 7 Demostración de la eficacia *in vivo* de inhibidores de CCR5 en un modelo de primate no humano de transmisión de VIH vaginal**

Se usa el modelo de macaco para la prevención del VIH descrito más adelante para demostrar la eficacia *in vivo* de las moléculas de la invención.

35 En resumen, se pre-tratan grupos de macacos rhesus hembra adultos tratados con progesterona con 4 ml de PBS o soluciones de inhibidores en PBS. Quince minutos más tarde, los animales se exponen a 300 DICT<sub>50</sub> de VIHS SF 162 y se controlan durante hasta 24 semanas para el desarrollo de viremia en plasma [32].

El procedimiento se puede realizar como se describe en la referencia [33], o del siguiente modo:

40 se usan macacos rhesus hembra (*Macacca mulatta*) adultas que ciclan de forma normal que varían de 5 a 12 años de edad. Todos los estudios se adhieren a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, preparada por el Consejo Nacional de Investigación, Instituto Nacional de Salud y

con las directrices del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Centro de Investigación de Primates Nacional de Tulane. Todo el personal clave (manipuladores de animales, tratadores y técnicos de laboratorio implicados en la preparación de inóculos víricos y análisis virológicos) son ciegos en cuanto a la asignación del tratamiento.

45 Los animales se tratan con una única inyección intramuscular de 30 mg de acetato de depomedroxiprogesterona (Depo-Provera®). Después de 30-33 días se sedan con telazol, se ponen en decúbito ventral con las caderas elevadas y se introducen 4 ml de solución de inhibidor en PBS o PBS en solitario sin traumatismo en la cavidad vaginal usando un catéter francés plegable. Este volumen proporciona la cobertura más eficaz de las paredes de la cavidad vaginal sin pérdida indebida. Los animales se exponen 15 minutos más tarde a 300 DICT<sub>50</sub> de VIHS SF162 obtenido del Programa de Investigación y Reactivos de Referencia del SIDA del NIH en 1 ml de medio RPMI 1640. Se recoge sangre en tubos de EDTA cada semana después de la exposición. Se determinan los niveles víricos en plasma cuantificando el ARN *gag* de VIS usando un ensayo de RT-PCR en tiempo

real, como se ha descrito previamente [32]. El ensayo tiene un umbral de sensibilidad de 60 copias de ARN/ml con un coeficiente de variación inter-ensayo de <25%. El estado sin infección se define como una viremia en plasma indetectable de forma sistemática para todos los análisis. La seroconversión se controla mediante transferencia de Western usando el kit de Transferencia de Western para VIS Zeptomatrix (Zeptomatrix, Buffalo NY).

## 5 REFERENCIAS

1. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 22 de ago de 1996; 352 (6593): 722-5.
- 10 2. Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TN, Proudfoot AE. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science*. 11 de abr de 1997; 276 (5310): 276-9.
- 15 3. Mosier DE, Picchio GR, Gulizia RJ, Sabbe R, Poignard P, Picard L, Offord RE, Thompson DA, Wilken J. Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants. *J Virol*. mayo de 1999; 73 (5): 3544-50.
4. Sabbe R, Picchio GR, Pastore C, Chaloin O, Hartley O, Offord R, Mosier DE. Donor- and ligand-dependent differences in C-C chemokine receptor 5 reexpression. *J Virol*. ene de 2001; 75 (2): 661-71.
- 20 5. Hartley O, Gaertner H, Wilken J, Thompson D, Fish R, Ramos A, Pastore C, Dufour B, Cerini F, Melotti A, Heveker N, Picard L, Alizon M, Mosier D, Kent S, Offord R. Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: development of highly potent HIV entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23 de nov de 2004; 101 (47): 16460-5. Epub 15 de nov de 2004.
6. Hartley O, Dorgham K, Perez-Bercoff D, Cerini F, Heimann A, Gaertner H, Offord RE, Pancino G, Debre P, Gorochov G. Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors selected on living cells from a library of phage chemokines. *J Virol*. jun de 2003; 77 (12): 6637-44.
- 25 7. documento WO 03/022884.
8. Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. CRC Press. 1997. ISBN 0849391423.
9. Benoiton NL. *Chemistry of Peptide Synthesis*. CRC Press. 2005. ISBN 1574444549.
- 30 10. Chan W, White P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. Oxford University Press. 2000. ISBN: 0199637245.
11. Kullmann W. *Enzymatic Peptide Synthesis*. CRC Press. 1987. ISBN 0849368413.
12. Ibba M. Strategies for in vitro and in vivo translation with non-natural amino acids. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996; 13: 197-216.
- 35 13. Proudfoot, A. E., Power, C. A., Hoogewerf, A. J., Montjovent, M. O., Borlat, F., Offord, R. E. y Wells, T. N. *J Biol Chem*. 1996; 271: 2599-2603.
14. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª edición (15 de enero de 2001). ISBN 087969576.
- 40 15. Rao S, Hu S, McHugh L, Lueders K, Henry K, Zhao Q, Fekete RA, Kar S, Adhya S, Hamer DH. Toward a live microbial microbicide for HIV: commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de ago de 2005; 102 (34): 11993-8. Epub 22 de jul de 2005.
16. Chang TL, Chang CH, Simpson DA, Xu Q, Martin PK, Lagenaur LA, Schoolnik GK, Ho DD, Hillier SL, Holodniy M, Lewicki JA, Lee PP. Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 30 de sep de 2003; 100 (20): 11672-7. Epub 12 de sep de 2003.
- 45 17. Lagenaur LA, Berger EA. An anti-HIV microbicide comes alive. *Proc Natl Acad Sci USA*. 30 de ago de 2005; 102 (35): 12294-5. Epub 23 de ago de 2005.

18. página web de la FDA (Administración de EEUU de Alimentos y Fármacos). Inactive Ingredient Guide. 1996. <http://www.fda.gov/cder/drug/iig/default.htm>
19. Ash M y Ash I. Handbook of Pharmaceutical Additives. Synapse Information Resources. 2ª Edición. 2002. ISBN 1890595349
- 5 20. Gennaro AR (ed.). Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott Williams & Wilkins. 21ª edición. 3 de julio de 2005. ISBN 0781763789.
21. Hardman JG, Limbird LE, Alfred G. Gilman AG. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill; 10ª edición. 13 de agosto de 2001. ISBN 0071354697.
- 10 22. Schnolzer M, Alewood P, Jones A, Alewood D, Kent SB. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int J Pept Protein Res.* sep-oct de 1992; 40 (3-4): 180-93.
23. Wilken J, Hoover D, Thompson DA, Barlow PN, McSparron H, Picard L, Wlodawer A, Lubkowski J, Kent SB. Total chemical synthesis and high-resolution crystal structure of the potent anti-HIV protein AOP-RANTES. *Chem Biol.* ene de 1999; 6 (1): 43-51.
- 15 24. Klimkait T, Stauffer F, Lupo E, Sonderegger-Rubli C. Dissecting the mode of action of various HIV-inhibitor classes in a stable cellular system. *Arch Virol.* 1998; 143 (11): 2109-31.
25. Sune C, Brennan L, Stover DR, Klimkait T. Effect of polymorphisms on the replicative capacity of protease inhibitor-resistant HIV-1 variants under drug pressure. *Clin Microbiol Infect.* feb de 2004; 10 (2): 119-26.
- 20 26. Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alizon M. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science.* 20 de jun de 1997; 276 (5320): 1874-8.
27. Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J. Y., Horuk, R. y Schall, T. J. *Cell.* 1993; 72: 415-425
28. Daugherty, B. L., Siciliano, S. J., DeMartino, J. A., Malkowitz, L., Siroтина, A. y Springer, M. S. *J Exp Med.* 1996; 183: 2349-2354
- 25 29. Torre VS, Marozsan AJ, Albright JL, Collins KR, Hartley O, Offord RE, Quinones-Mateu ME, Arts EJ. 2000. Variable sensitivity of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates to inhibition by RANTES analogs. *J Virol* 74: 4868-76
- 30 30. Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober y R. Coico. 1999. Detection and analysis of HIV; isolation and quantitation of HIV in peripheral blood, alternate protocol: assessment of HIV titer using the Reed-Muench accumulative method, pág. 12.2.5. En *Current protocols in immunology*, versión CD-ROM. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, N.Y.
- 35 31. Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober y R. Coico. 1999. Detection and analysis of HIV; detection assays for HIV proteins, basic protocol: assay for HIV reverse transcriptase activity, pág. 12.5.8. En *Current protocols in immunology*, versión CD-ROM. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, N.Y.
32. Lifson JD, Rossio JL, Piatak M, Jr., Parks T, Li L, Kiser R, Coalter V, Fisher B, Flynn BM, Czajak S, Hirsch VM, Reimann KA, Schmitz JE, Ghayeb J, Bischofberger N, Nowak MA, Desrosiers RC, Wodarz D. 2001. Role of CD8 (+) lymphocytes in control of simian immunodeficiency virus infection and resistance to rechallenge after transient early antiretroviral treatment. *J Virol* 75: 10187-99
- 40 33. Lederman MM, Veazey RS, Offord R, Mosier DE, Dufour J, Mefford M, Piatak M, Jr., Lifson JD, Salkowitz JR, Rodriguez B, Blauvelt A, Hartley O. 2004. Prevention of vaginal SHIV transmission in rhesus macaques through inhibition of CCR5. *Science* 306: 485-7

#### LISTA DE SECUENCIAS

- <110> LA FUNDACIÓN MINTAKA PARA LA INVESTIGACIÓN MÉDICA
- 45 <120> Derivados de citocinas
- <130> P043725WO



Gln Gly Pro Pro Leu Met Ala Leu Gln Ser  
 1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 3

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Met Gln Val  
 1 5 10

10 <210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> sintético

<400> 4

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Leu Gln Val  
 1 5 10

<210> 5

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 5

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Thr Gln Ser  
 1 5 10

25 <210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> sintético  
 <400> 6  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Leu Gln Thr  
 1 5 10  
 5  
 <210> 7  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 10  
 <223> sintético  
 <400> 7  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Thr Gln Val  
 1 5 10  
 <210> 8  
 <211> 10  
 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 8  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Met Gln Ser  
 1 5 10  
 20  
 <210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 9  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ala Thr Gln Ser  
 1 5 10  
 <210> 10

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <223> sintético  
 <400> 10  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Leu Gln Ser  
 1 5 10  
 <210> 11  
 <211> 10  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 11  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ala Leu Gln Val  
 1 5 10  
 15 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 12  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Leu Gly Gly  
 1 5 10  
 <210> 13  
 25 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 30 <400> 13

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Arg Gly Ser

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 14

Gln Gly Pro Leu Leu Met Trp Leu Gln Val

1 5 10

10 <210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> sintético

<400> 15

Gln Gly Pro Pro Leu Met Gln Thr Thr Pro

1 5 10

<210> 16

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 16

Gln Gly Pro Pro Gly Asp Thr Val Leu Trp

1 5 10

25 <210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 17

Gln Gly Pro Pro Gly Asp Ile Val Leu Ala

5

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> sintético

<400> 18

Gln Gly Pro Pro Gly Ser Tyr Asp Tyr Ser

1 5 10

<210> 19

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

20

<400> 19

Gln Gly Pro Pro Gly Asp Gly Gly Ser Val

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 20

Gln Gly Pro Leu Ser Gly Gln Ser Thr Pro

1 5 10

<210> 21  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 21  
 Gln Gly Pro Pro Gly Asp Trp Leu Gln Val  
 1 5 10  
 <210> 22  
 10 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 15 <400> 22  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Phe Gln Ser  
 1 5 10  
 <210> 23  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 23  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Thr Gln Ser  
 1 5 10  
 25 <210> 24  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> sintético

<400> 24

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Gln Val  
 1 5 10

<210> 25

<211> 10

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 25

Gly Gly Pro Pro Leu Met Gly Leu Gln Val  
 1 5 10

10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> sintético

<400> 26

Gln Gly Pro Leu Ser Gly Trp Leu Gln Val  
 1 5 10

20

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

25

<400> 27

Gly Gly Pro Pro Leu Met Ser Val Leu Ala  
 1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 5 <400> 28  
 Gln Gly Pro Pro Gly Ser Trp Ser Ser Val  
 1 5 10  
 <210> 29  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 29  
 Gln Gly Pro Pro Leu Gly Ser Met Gly Pro  
 1 5 10  
 15 <210> 30  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 20 <223> sintético  
 <400> 30  
 Gln Gly Pro Pro Leu Ser Trp Leu Gln Val  
 1 5 10  
 <210> 31  
 <211> 10  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 31

Gln Gly Pro Pro Leu Ser Trp Leu Gln Ser  
 1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 32

Gln Gly Pro Pro Gly Gln Trp Ser Gln Val  
 1 5 10

10 <210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> sintético

<400> 33

Gln Gly Pro Pro Met Met Ala Gly Leu Ser  
 1 5 10

<210> 34

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 34

Gln Gly Pro Pro Leu Ser Trp Gln Gln Ser  
 1 5 10

25 <210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 35

5

Gln Gly Pro Pro Gly Met Trp Ser Gln Ser

1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> sintético

<400> 36

Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Arg Gln Ser

1 5 10

<210> 37

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

20

<400> 37

Gln Gly Pro Pro Leu Met Gly Thr Gln Ser

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 38

Gln Gly Pro Pro Leu Met Gln Leu Gln Val

1 5 10

<210> 39  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 39  
 Gln Gly Pro Pro Leu Ser Trp Ser Gln Val  
 1 5 10  
 <210> 40  
 10 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 15 <400> 40  
 Gln Gly Pro Pro Met Ser Trp Ser Gln Ser  
 1 5 10  
 <210> 41  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 41  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Asn Leu Gln Val  
 1 5 10  
 25 <210> 42  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> sintético

<400> 42

Gln Gly Pro Pro Met Ser Ala Tyr Gln Val

1 5 10

<210> 43

<211> 10

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 43

Gln Gly Pro Pro Met Gln Gly Gly Leu Ser

1 5 10

10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> sintético

<400> 44

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Ala Val

1 5 10

20

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

25

<400> 45

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Thr Val

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 46

Gln Gly Pro Leu Ser Gly Trp Ala Gln Val

5            1                            5                            10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10            <220>

<223> sintético

<400> 47

Gln Gly Pro Leu Ser Gln Ser Ser Gln Val

1                            5                            10

<210> 48

15            <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

20            <400> 48

Gln Gly Pro Leu Ser Ser Gln Ser Gln Val

1                            5                            10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

25            <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 49

Gln Gly Pro Leu Gly Gln Gln Gly Gln Val

1                            5                            10

<210> 50  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 50  
 Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Phe Gln Val  
 1 5 10  
 <210> 51  
 10 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 15 <400> 51  
 Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Thr Gln Val  
 1 5 10  
 <210> 52  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 52  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ala Leu Ser Val  
 1 5 10  
 25 <210> 53  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> sintético

<400> 53

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Ser Gln Val

1 5 10

<210> 54

<211> 10

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 54

Gln Gly Pro Pro Gly Gln Trp Gly Gln Val

10

1 5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> sintético

<400> 55

Gln Gly Pro Pro Gly Ser Trp Ser Gln Val

1 5 10

<210> 56

20

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

25

<400> 56

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Ser Gln Ser

1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 57  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Gly Leu Ser Val  
 5 1 5 10  
 <210> 58  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 58  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Thr Leu Gln Val  
 1 5 10  
 <210> 59  
 15 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 20 <400> 59  
 Gln Gly Pro Pro Gly Gln Trp Tyr Gln Ser  
 1 5 10  
 <210> 60  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 60  
 Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Met Gln Ala  
 1 5 10

<210> 61  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 61  
  
 Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Met Gln Val  
 1 5 10  
  
 <210> 62  
 10 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 15 <400> 62  
  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Thr Gln Val  
 1 5 10  
  
 <210> 63  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 <400> 63  
  
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Ser Val  
 1 5 10  
  
 25 <210> 64  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> sintético

<400> 64

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Gln Ser

1 5 10

<210> 65

<211> 10

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 65

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Gln Ala

1 5 10

10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> sintético

<400> 66

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Val Gln Ser

1 5 10

20

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético

25

<400> 67

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Ala Gln Ser

1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

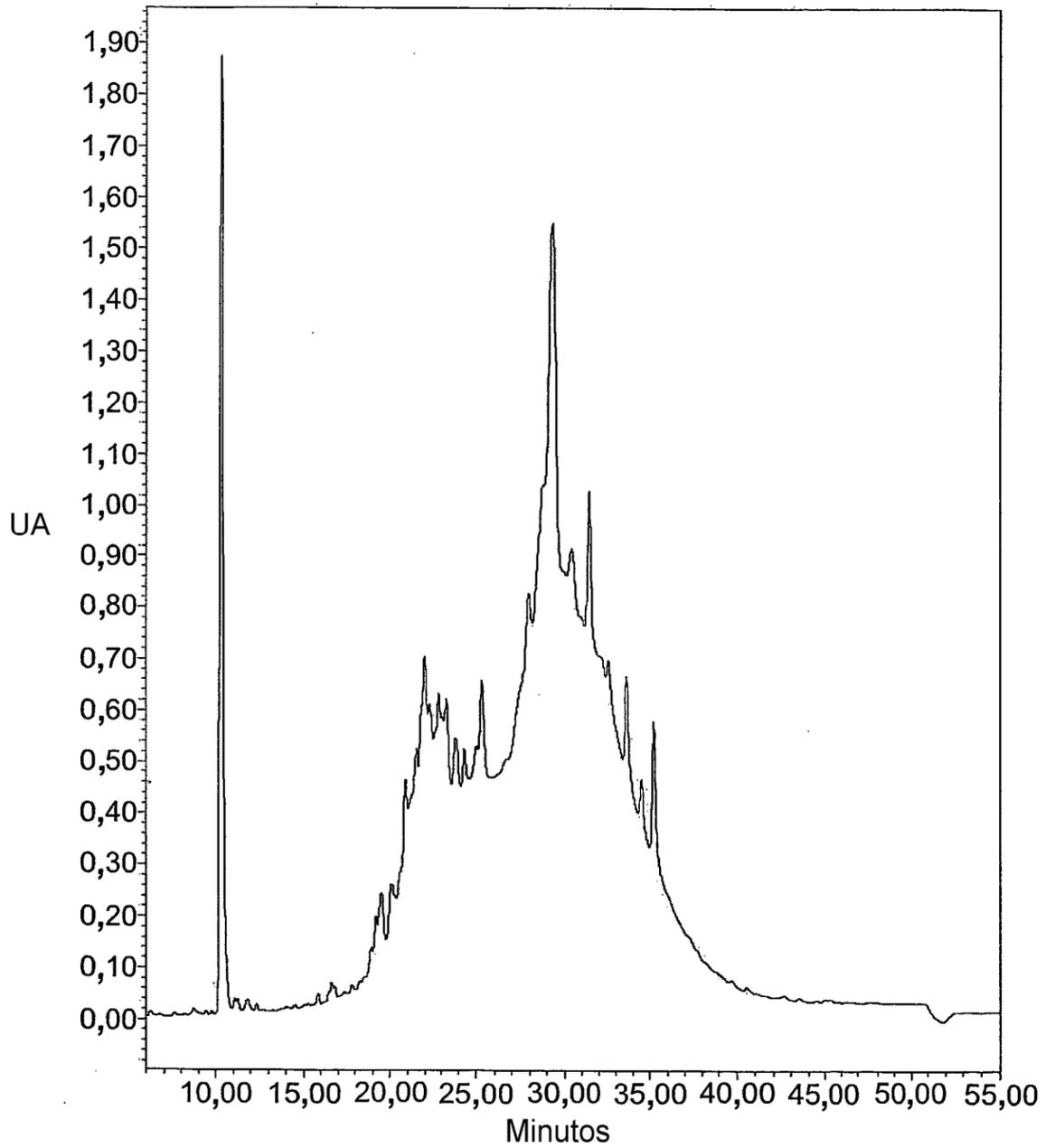


## REIVINDICACIONES

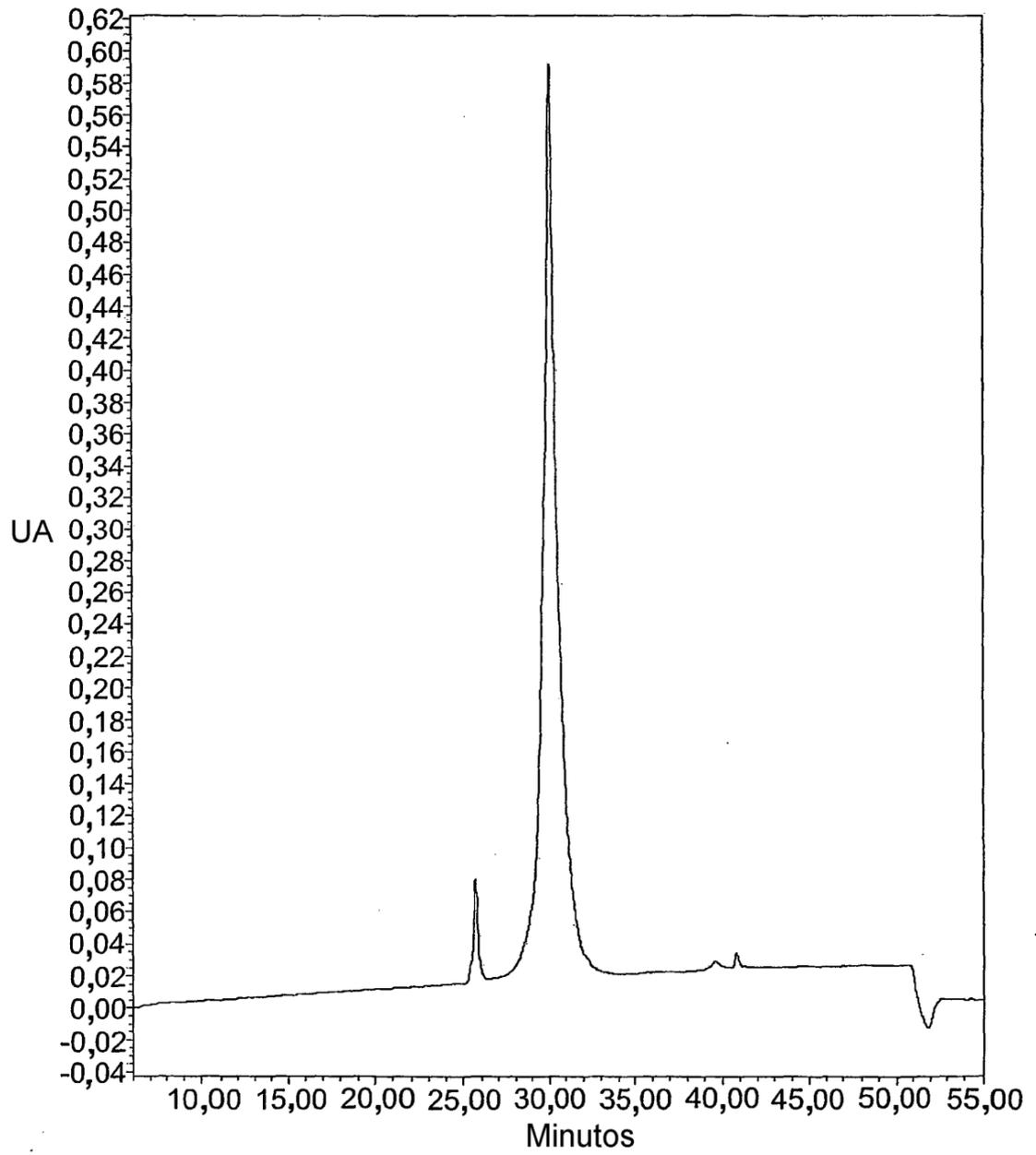
1. Un polipéptido que comprende una parte N-terminal y una parte C-terminal, en el que dicha parte N-terminal comprende la secuencia distintiva QGP[P o L] y la secuencia de aminoácidos de dicha parte C-terminal tiene una identidad de al menos el 70% con la SEC ID N°: 1.
- 5 2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia distintiva es QGP[P o L][L o G o S o M][M o D o S o Q o G].
3. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia distintiva es QGP[P o L][L o G][M o D o S].
- 10 4. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia distintiva es QGP[P o L][L o G o S o M][M o D o S o Q o G]XX[Q o G o L o A o T o S]X, en la que X indica cualquier aminoácido natural o modificado.
5. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia distintiva es QGP[P o L][L o G][M o D o S]XX[Q o G o L]X, en el que X indica cualquier aminoácido natural o modificado.
6. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento.
- 15 7. Una molécula de ácido nucleico que comprende uno o más segmentos/secuencias que codifican los polipéptidos de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento.
- 20 9. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8.
10. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o la célula huésped de la reivindicación 9.
- 25 11. Un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 o una célula huésped como se define en la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones por VIH, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o transmisión del VIH.
- 30 12. Uso de un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 o una célula huésped como se define en la reivindicación 9 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir infecciones por VIH, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o la transmisión del VIH.
- 35 13. Un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 o una célula huésped como se define en reivindicación 9 para su uso en el tratamiento o prevención de inflamación, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infecciones bacterianas y víricas, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, ateroma o arteriosclerosis, asma, rinitis alérgica o dermatitis atópica, el rechazo de órganos, tejidos o células trasplantados, esclerosis múltiple y/u otras enfermedades desmielinizantes, neuropatía periférica, enfermedades malignas, cánceres o cánceres metastatizantes.
- 40 14. Uso de un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 o una célula huésped como se define en la reivindicación 9 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir inflamación, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infecciones bacterianas y víricas, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, ateroma o arteriosclerosis, asma, rinitis alérgica o dermatitis atópica, el rechazo de órganos, tejidos o células trasplantados, esclerosis múltiple y/u otras enfermedades desmielinizantes, neuropatía periférica, enfermedades malignas, cánceres o cánceres metastatizantes.
- 45 15. Kit que comprende un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 o una célula huésped como se define en la reivindicación 9.

50

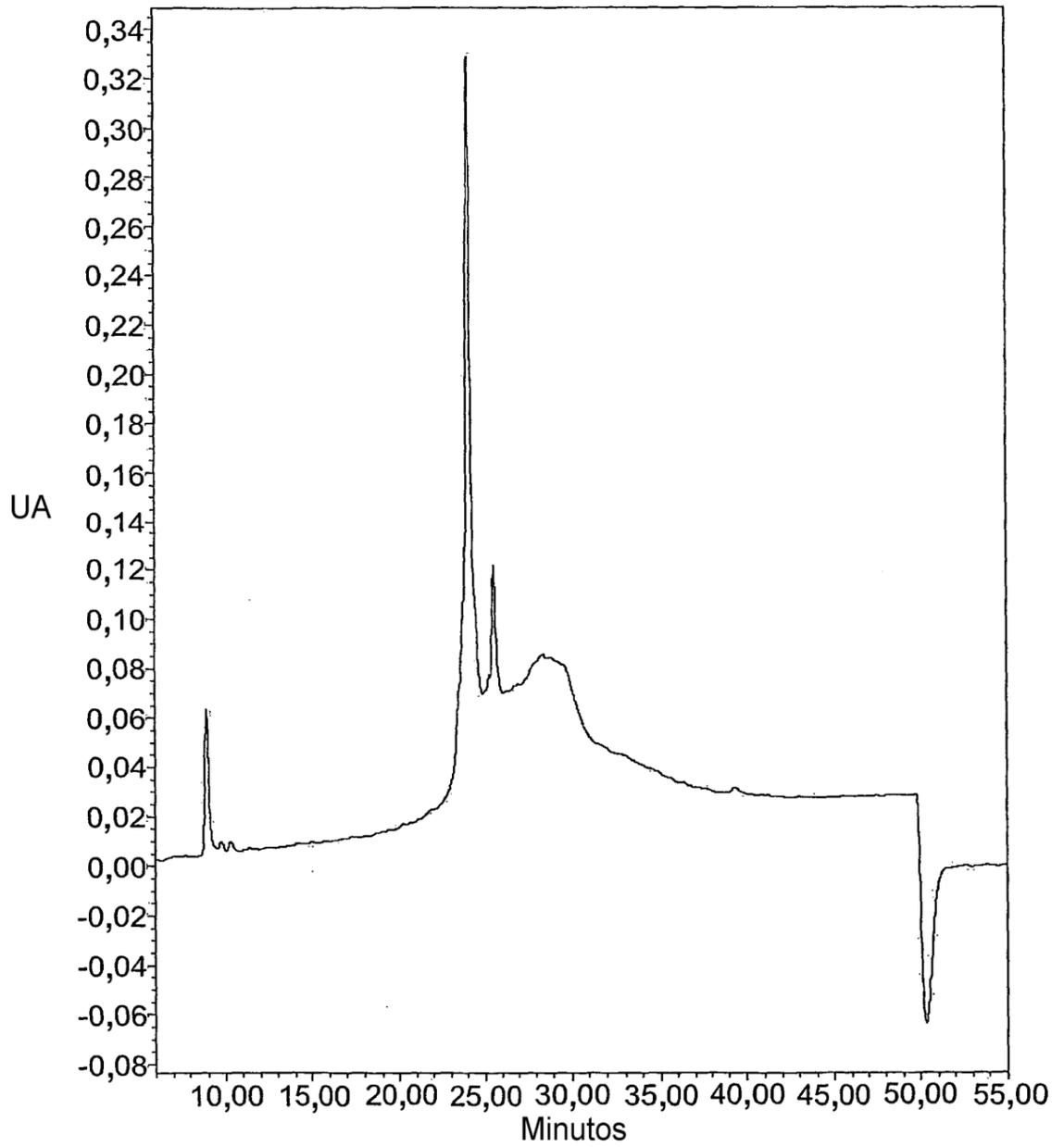
**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



**FIG. 1C**



**FIG. 1D**

