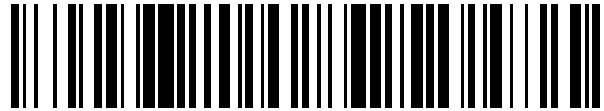


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 094**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2006 E 10181077 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2363412**

54 Título: **Antagonistas contra la interacción de PF4 y RANTES**

30 Prioridad:

**14.10.2005 DE 102005049637**

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

**18.09.2015**

73 Titular/es:

**RWTH AACHEN (100.0%)  
Templergraben 55  
52056 Aachen, DE**

72 Inventor/es:

**WEBER, CHRISTIAN;  
VON HUNDELSHAUSEN, PHILIPP y  
KOENEN, RORY**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 546 094 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**

Antagonistas contra la interacción de PF4 y RANTES

5 La invención se refiere a polipéptidos, a sus sales, derivados farmacéuticamente aceptables y/o conjugados, a su uso para la preparación de un fármaco, así como a un fármaco. Los polipéptidos son adecuados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con un reclutamiento de monocitos.

10 La arteriosclerosis de vasos arteriales constituye el trasfondo morfológico de las enfermedades cardiovasculares. A este respecto, el reclutamiento inicial de monocitos tiene una importancia decisiva para la génesis de la lesión temprana arteriosclerótica. La adhesión de los monocitos al endotelio, la denominada detención de monocitos, está en el inicio de la patogénesis de enfermedades cardiovasculares tales como arteriosclerosis, estenosis y trombosis. Se conoce que las quimiocinas, tales como RANTES (regulada por activación, expresada y secretada por células T normales) están conectadas como moléculas señalizadoras con estos acontecimientos.

15 La prevención primaria y secundaria conocidas en el estado de la técnica son, sobre todo, un tratamiento que disminuye los lípidos así como la inhibición de la agregación y la activación de trombocitos mediante medicamentos tales como aspirina o clopidogrel. La desventaja del tratamiento con estos medicamentos es, por un lado, que estos muestran sólo una especificidad reducida y, por otro lado, que estos medicamentos conllevan efectos secundarios graves tales como miopatías y un mayor riesgo de hemorragia.

20 Además se conoce en el estado de la técnica el uso de antagonistas peptídicos de RANTES. Por ejemplo, el documento DE 100 14 516 A1 da a conocer el uso de metRANTES como antagonista contra el receptor de RANTES CCR1. Con el uso de estos antagonistas es desventajoso que las quimiocinas participen como moléculas señalizadoras en un gran número de procesos fisiológicos, de modo que mediante el uso de un antagonista de este tipo se influye en un número indefinido de procesos fisiológicos y pueden aparecer numerosos efectos secundarios y secuelas.

30 El objetivo de la presente invención consistió en poner a disposición medios que superaran al menos una de las desventajas del estado de la técnica. En particular, el objetivo de la presente invención consistió en poner a disposición medios que presentaran una especificidad mejorada.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona un polipéptido, que consiste en la secuencia CKEYFYTSSKSSNLAVFVTRC indicada según la reivindicación 1.

De manera ventajosa, los polipéptidos según la invención son adecuados como antagonistas contra la interacción entre RANTES y el factor plaquetario 4.

40 Por el término "antagonista contra la interacción entre RANTES y el factor plaquetario 4" se entienden en el sentido de la presente invención péptidos, proteínas u otros compuestos que pueden funcionar como antagonistas contra la interacción entre las quimiocinas RANTES y el factor plaquetario 4.

45 Se encontró de manera sorprendente que los polipéptidos según la invención pueden presentar una acción específica sobre el reclutamiento de monocitos mediado por la interacción de la quimiocina RANTES y el factor plaquetario 4 (PF4). A este respecto es especialmente ventajoso que los polipéptidos según la invención no muestren ningún efecto, o sólo un efecto reducido, sobre las numerosas funciones de las quimiocinas. En particular es ventajoso que pueda provocarse un bloqueo selectivo del reclutamiento de monocitos, por ejemplo en el endotelio.

50 El término "reclutamiento de monocitos" comprende, en el sentido de la presente invención, el significado de una migración de monocitos a través del endotelio, su adhesión así como propagación por ejemplo en intersticios endoteliales. La adhesión de los monocitos se denomina igualmente adhesión de monocitos, o detención de monocitos cuando la adhesión se produce en flujo cortante tal como en condiciones fisiológicas, por ejemplo en capilares sanguíneos, en lechos capilares microvasculares o arteriales.

55 Es sumamente ventajoso que los polipéptidos según la invención puedan poner a disposición una alta especificidad, y que no muestren efectos secundarios, o sólo efectos secundarios reducidos, sobre los numerosos procesos metabólicos mediados por las quimiocinas RANTES y el PF4, por ejemplo del sistema inmunitario o de coagulación. En particular mediante la administración de los polipéptidos según la invención puede evitarse un riesgo de coagulación como con los medicamentos convencionales en enfermedades cardiovasculares.

60 "C" significa en el presente documento, según el código de una letra habitual de los aminoácidos utilizado en este caso, el aminoácido cisteína, y de manera correspondiente "Y" significa tirosina, "F" fenilalanina, "T" treonina y "S" serina.

65

El polipéptido según la invención presenta en el extremo amino-terminal y en el carboxilo-terminal en cada caso un resto cisteína, que pueden poner a disposición una ciclación del polipéptido. Es especialmente ventajoso que un polipéptido ciclado presente una estabilidad mejorada. El polipéptido según la invención puede presentar una eficacia más prolongada y puede usarse de manera correspondiente en menor cantidad.

Por el término "polipéptido" se entienden en el sentido de la presente invención compuestos peptídicos sintéticos o no sintéticos, al igual que fragmentos purificados y modificados de proteínas naturales, formas nativas o péptidos o proteínas recombinantes. Igualmente, el término "polipéptido" comprende en el sentido de la presente invención sales farmacéuticamente aceptables, derivados farmacéuticamente aceptables y/o conjugados del polipéptido correspondiente.

Derivados farmacéuticamente aceptables preferidos son, por ejemplo, éster, amidas, derivados de N-acilo y/u O-acilo, polipéptidos carboxilados, acetilados, fosforilados y/o glicosilados. Conjugados preferidos son, por ejemplo, conjugados de azúcar o polietilenglicol, polipéptidos biotinilados, radioactivos o marcados por fluorescencia.

En particular es sorprendente que una secuencia de aminoácidos de esta longitud pueda provocar una inhibición de la detención de monocitos.

De la manera más especialmente preferible, el polipéptido presenta 22 aminoácidos. El término "número de aminoácidos" comprende en el sentido de la invención evidentemente también el significado de longitud de la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Una ventaja del polipéptido radica, en formas de realización preferidas, en que estos polipéptidos presentan preferiblemente una estabilidad mejorada. Esto posibilita que los polipéptidos puedan alcanzar en mayor medida su sitio de acción y puedan experimentar interacciones estables con proteínas o compuestos peptídicos. En particular, una mayor estabilidad del polipéptido posibilita que éste pueda usarse *in vivo* e *in vitro*. Una ventaja adicional del polipéptido radica, en formas de realización preferidas, en que el polipéptido presenta una solubilidad mejorada en agua. Una solubilidad aumentada puede conducir en particular a que el polipéptido pueda aplicarse más fácilmente y de manera más sencilla.

Además puede estar previsto que los respectivos aminoácidos L se sustituyan por aminoácidos D. De este modo puede conseguirse un aumento adicional de la estabilidad.

Los polipéptidos pueden prepararse según métodos habituales de la síntesis de péptidos.

De manera ventajosa, los polipéptidos según la invención son adecuados como antagonistas contra la interacción entre RANTES y el factor plaquetario 4. En particular, los polipéptidos según la invención pueden provocar una inhibición de la interacción entre RANTES y el factor plaquetario 4.

Los polipéptidos según la invención, sus sales, derivados farmacéuticamente aceptables y/o conjugados, pueden usarse como antagonistas contra la interacción entre RANTES y el factor plaquetario 4.

Debido a sus propiedades ventajosas, los polipéptidos según la invención son adecuados para su uso como fármaco.

Un objeto adicional de la invención se refiere al uso de los polipéptidos según la invención, en particular de las formas de realización preferidas, para la preparación de un fármaco.

Los polipéptidos según la invención pueden administrarse conforme a métodos habituales, es preferible una administración parental, por ejemplo una administración oral, administración dérmica, administración subcutánea y/o administración intravenosa. Por ejemplo, los polipéptidos pueden administrarse por medio de aplicaciones *ex vivo*, por ejemplo antes de implantaciones de un injerto vascular, o por medio de aplicación intravascular, por ejemplo antes o después de una intervención con catéter o una implantación de una endoprotésis.

Para una aplicación de este tipo es sumamente ventajosa una solubilidad preferiblemente buena de los polipéptidos en agua.

Además de una terapia limitada en el tiempo o aguda, también puede ser preferible además que los polipéptidos según la invención se administren a lo largo de un periodo de tiempo más largo. Los polipéptidos según la invención pueden administrarse igualmente en forma de liberación prolongada o retardada, por ejemplo en forma de inyecciones de acción retardada o bombeo osmótico.

El polipéptido según la invención puede administrarse igualmente en forma de un ácido nucleico que codifica para el respectivo polipéptido. En este caso, la molécula de ácido nucleico puede estar contenida en vectores habituales. Preferiblemente se administra una secuencia de ADN que codifica para el respectivo polipéptido. Igualmente puede estar previsto administrar el ARN que codifica para un polipéptido según la invención.

Además se conoce que pueden existir variaciones en la secuencia de los ácidos nucleicos, por ejemplo por una degeneración del código genético.

5 Las dosificaciones preferidas de los polipéptidos según la invención se sitúan, para la administración en humanos, en el intervalo de desde  $\geq 10$  mg/día/75 kg de peso corporal hasta  $\leq 1000$  mg/día/75 kg de peso corporal, preferiblemente en el intervalo de desde  $\geq 50$  mg/día/75 kg de peso corporal hasta  $\leq 200$  mg/día/75 kg de peso corporal, preferiblemente en el intervalo de desde 150 mg/día/75 kg de peso corporal.

10 Los polipéptidos según la invención, sus sales, derivados farmacéuticamente aceptables y/o conjugados y/o ácidos nucleicos pueden usarse en particular para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico, el diagnóstico y/o la terapia de enfermedades relacionadas con un reclutamiento de monocitos. Entre estas enfermedades se encuentran, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares y/o inflamatorias, en particular arteriosclerosis, estenosis, hipertensión y/o reacciones de rechazo de trasplantes.

15 En particular, los polipéptidos y/o ácidos nucleicos según la invención pueden usarse para el tratamiento de mamíferos, en particular de seres humanos.

20 Los polipéptidos según la invención pueden influir positivamente en la adhesión de monocitos al endotelio. En particular se encontró de manera sorprendente que formas de realización particularmente preferidas de los polipéptidos según la invención pueden inhibir la intensificación de una detención de monocitos de este tipo mediado por la interacción heterófila de RANTES y PF4. Ventajosamente, formas de realización particularmente preferidas de los polipéptidos según la invención pueden mostrar en experimentos una inhibición mejorada de la intensificación de la detención de monocitos mediado por la interacción heterófila de RANTES y PF4, en comparación con compuestos proteicos o peptídicos conocidos hasta la fecha.

25 Una ventaja particular de los polipéptidos según la invención puede materializarse en que, mediante la administración de los polipéptidos, puede reducirse o evitarse la formación de una arteriosclerosis, reestenosis posoperatoria o posintervención, por ejemplo tras una dilatación de un balón, aterectomía u operaciones de derivación. Es especialmente ventajoso que los polipéptidos según la invención también puedan evitar o reducir, en el caso de una enfermedad avanzada o clínica o de variaciones arterioscleróticas morfológicas, un reclutamiento adicional de monocitos en el endotelio activado.

30 Es especialmente ventajoso que los polipéptidos según la invención puedan usarse en particular para el tratamiento profiláctico, por ejemplo en pacientes con riesgo de hipertensión. Un uso profiláctico de este tipo resulta posible ventajosamente en particular porque los polipéptidos según la invención no muestran efectos, o sólo efectos reducidos, sobre procesos generales mediados por quimioquinas.

35 Otro objeto de la invención se refiere de manera correspondiente al uso de los polipéptidos según la invención, sus sales, derivados farmacéuticamente aceptables y/o conjugados, para la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades seleccionadas del grupo que comprende:

40 - enfermedades relacionadas con un reclutamiento de monocitos, tales como enfermedades cardiovasculares y/o inflamatorias, en particular arteriosclerosis, aterosclerosis, placas inestables, estenosis, reestenosis, hipertensión, artritis, miocarditis, enfermedades autoinmunitarias incluyendo encefalomiélitis, enteropatías inflamatorias, daños por reperfusión tras infartos, por ejemplo infartos de miocardio o cerebrovasculares, rechazo de trasplantes y/o dermatitis tales como psoriasis, y/o

45 - enfermedades relacionadas con un reclutamiento dependiente de RANTES de otras poblaciones de leucocitos, tales como eosinofilia, en particular en el caso de enfermedades alérgicas como asma o neumonitis.

50 En particular en el caso del tratamiento de alteraciones ateroscleróticas del ser humano puede conseguirse, mediante un uso de los polipéptidos según la invención, un efecto ventajoso sobre el curso de la enfermedad. En particular puede reducirse una intensificación de las alteraciones arterioscleróticas por detención de monocitos. Una ventaja adicional de los polipéptidos según la invención puede resultar del hecho de que estas reacciones de rechazo tras el trasplante de órganos y/o tejidos pueden reducirse o incluso evitarse.

55 Es especialmente ventajoso a este respecto que los polipéptidos según la invención preferiblemente no provocan ningún efecto secundario, o sólo efectos secundarios reducidos. Esto posibilita que los polipéptidos según la invención puedan administrarse de manera profiláctica. Además es especialmente ventajoso que por la especificidad de los polipéptidos según la invención pueda evitarse influir en otros procesos metabólicos, de modo que resulta posible una administración profiláctica por ejemplo en pacientes con riesgo de hipertensión o en el caso de la profilaxis de alteraciones arterioscleróticas.

60 Los fármacos que comprenden polipéptidos según la invención pueden usarse en particular para el tratamiento *in vivo* por ejemplo de seres humanos. Un uso preferido de los fármacos que comprenden polipéptidos según la

invención son el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades relacionadas con un reclutamiento de monocitos, tales como enfermedades cardiovasculares y/o inflamatorias, en particular arteriosclerosis, aterosclerosis, placas inestables, estenosis, reestenosis, hipertensión, artritis, miocarditis, enfermedades autoinmunitarias incluyendo encefalomiелitis, enteropatías inflamatorias, daños por reperfusión tras infartos, por ejemplo infartos de miocardio o cerebrovasculares, rechazo de trasplantes y/o dermatitis tales como psoriasis, y/o enfermedades relacionadas con un reclutamiento dependiente de RANTES de otras poblaciones de leucocitos, como por ejemplo eosinofilia, en particular en el caso de enfermedades alérgicas como asma o neumonitis.

Igualmente son objeto de la invención los fármacos que comprenden ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos según la invención. A este respecto, la molécula de ácido nucleico puede estar contenida en vectores habituales.

El término "medios contra la detención de monocitos" tiene en el sentido de esta invención el significado de que el medio puede influir positivamente en enfermedades relacionadas con una detención de monocito, la adhesión de monocitos por ejemplo al endotelio. En particular puede reducirse o incluso evitarse la formación de placas arterioscleróticas. Preferiblemente, el uso de los polipéptidos según la invención puede conducir a que el reclutamiento de monocitos y/o su adhesión al endotelio activado, en particular también a placas arterioscleróticas o neoíntima, puede reducirse y/o puede evitarse por completo o casi por completo. A continuación se indican ejemplos que sirven para ilustrar la presente invención.

#### Material y métodos

##### Cultivo celular

Se cultivaron células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*, PromoCell, Heidelberg) en medio de crecimiento de células endoteliales (*Endothelial Cell Growth Medium*) (PromoCell, Heidelberg) y se utilizaron tras de 2 a 4 pases.

Se cultivaron células Mono Mac 6 monocitarias (MM6, DSMZ) en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories, Pasching, Austria) con la adición del 10% de suero de ternera fetal, L-glutamina 2 mM (Biowhittaker), piruvato de sodio 1 mM, gentamicina 50 µg/ml e insulina 9 µg/ml (medio MM6). Se sembraron las células con una densidad de  $2 \times 10^5$ /ml en 2 ml de medio MM6 en placas de 24 pocillos y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humedecida con el 5% de CO<sub>2</sub> durante de 3 a 4 días, antes de utilizarse para los experimentos.

##### Polipéptidos

Se sintetizaron químicamente polipéptidos de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3), su ortólogo de ratón según la secuencia SEQ ID NO: 15 según la fórmula (15) así como un polipéptido de control de secuencia SEQ ID NO: 14 según la fórmula (14) por medio de síntesis de péptidos en fase sólida basada en t-Boc usando resina de 4-metilbenzidrilamina, se purificaron por medio de HPLC de fase inversa y dado el caso se ciclaron en guanidina-HCl/tris 6 M, pH 8. Se determinó la masa molecular por medio de espectrometría de masas por Electrospray (Dawson PE, Kent SB. (2000) *Annu Rev Biochem.* 69: 923-960, Hackeng TM, Griffin JH, Dawson PE. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol 96, S. 10068-10073).

##### Ejemplo 1 (no según la invención)

Estudios de resonancia de plasmones para el análisis del efecto inhibitorio del polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3) sobre la formación de heteroagregados de RANTES y PF4

Los estudios de resonancia de plasmones se realizaron usando tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005%, pH 7,4).

Se activaron dos células de flujo de un chip C1 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) mediante inyección de 50 µl de etil(dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxi-succinimida (0,2 M/0,05 M, Firma Pierce) y a continuación se perfundieron 20 µl de estreptavidina (0,2 mg/ml, Sigma-Aldrich) sobre la superficie activada. A continuación se inactivó la superficie mediante cuatro inyecciones consecutivas de 20 µl de etilendiamina (1 M, pH8, Sigma-Aldrich).

En el extremo N-terminal se sintetizó químicamente PF4 humano biotinilado (bPF4) por medio de síntesis de péptidos en fase sólida basada en t-Boc y ligación química nativa de PF4 (Dawson PE, Kent SB. (2000) *Annu Rev Biochem.* 69: 923-960, Hackeng TM, Griffin JH, Dawson PE. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol 96, S. 10068-10073). El bPF4 se inmovilizó sobre la superficie de dextrano de un chip sensor C1, inyectando bPF4 200 µg/ml en HBS-EP a través de una de las cámaras de flujo y se detectaron 240 unidades de resonancia (RU). La segunda cámara de flujo no se trató con bPF4 y sirvió como referencia.

Se determinó la unión de RANTES (0,5 µM, RANTES humano recombinante, Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.) o

RANTES (0,5  $\mu$ M) preincubado con diferentes concentraciones, 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, del polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3) en tampón HBS-EP durante la noche a temperatura ambiente, a bPF4 por medio de inyección de 15  $\mu$ l de la respectiva mezcla péptido/RANTES y observación de la unión durante 180 segundos. La evolución del acoplamiento y las mediciones se realizaron en un dispositivo Biacore 2000 (Biacore AB) a una velocidad de flujo de 5  $\mu$ l/min. Se corrigieron sensogramas de la unión de RANTES por medio del software BIAevaluation 3.0 (Biacore AB) en cuanto a señales de fondo no específicas y para cada inyección se determinaron las unidades de resonancia (RU) de equilibrio.

Esto mostró que el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3) pudo provocar una inhibición de la interacción de RANTES y PF4 en función de la concentración, reduciéndose la unión de RANTES a PF4 inmovilizado hasta en 35% en presencia del péptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3) a una concentración de 100  $\mu$ M.

#### Ejemplo 2 no según la invención

Estudios de resonancia de plasmones para el análisis del efecto inhibitorio del polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3), SEQ ID NO: 2 según la fórmula (2) y de un péptido de control sobre la formación de heteroagregados de RANTES y PF4.

En un ensayo adicional se investigó, en condiciones tales como las descritas en el ejemplo 1, la unión de RANTES (0,5  $\mu$ M) o RANTES (0,5  $\mu$ M) preincubado con 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M del polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3), SEQ ID NO: 2 según la fórmula (2) o de un péptido de control de secuencia SEQ ID NO: 14 según la fórmula (14) tal como se indica a continuación:

KEYFYTSGK (14) (SEQ ID NO: 14).

En estos ensayos se mostró que a una concentración de 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3) podía inhibir la interacción de RANTES y PF4 de manera claramente más eficaz que el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 2 según la fórmula (2). El péptido de control de secuencia SEQ ID NO: 14 según la fórmula (14) no mostró ninguna inhibición comprobable a una concentración de 100  $\mu$ M.

#### Ejemplo 3 (no según la invención)

Inhibición de la detención de monocitos sobre el endotelio activado

Se investigó la interacción de células Mono Mac 6 monocitarias sobre células endoteliales activadas.

Se introdujeron placas de Petri con capas de células HUVEC confluentes, activadas con IL-1 $\beta$  (Interleucina 1 $\beta$ , Peprotech, 10 ng/ml, 12 horas), en una cámara de flujo. Se resuspendieron células Mono Mac 6 (0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml) en solución de Hank equilibrada (HBSS con Hepes 10 mM (Gibco BRL), pH 7,3, albúmina sérica bovina al 0,5 % (Serva)) y se mantuvieron sobre hielo. Cinco minutos antes del experimento, se añadieron a las células MM6 monocitarias Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> hasta una concentración final en cada caso de 1 mM y 60 nM de las quimiocinas RANTES (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.) y PF4 (ChromaTec, Greifswald) y en cada caso 6  $\mu$ M de los polipéptidos de secuencia SEQ ID NO: 2 según la fórmula (2), de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3) o un péptido de control de secuencia SEQ ID NO: 14 según la fórmula (14) y se calentaron hasta 37°C. Se perfundieron las células así pretratadas a continuación a 1,5 dyn/cm<sup>2</sup> sobre un microscopio de tipo IX 50 de la empresa Olympus a través de las células endoteliales. Se determinó el número de monocitos que se adhirieron por interacción con las células endoteliales, tras 4 minutos en diferentes campos, por medio de análisis de imágenes de tomas de una videocámara (3CCD, JVC) y grabadora. Se evaluaron los datos como promedio (n = 5) +- desviación estándar (p < 0,02) frente a un control.

Pudo establecerse que la intensificación de la detención de monocitos por la interacción heterófila de RANTES y PF4 mediante el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3) pudo inhibirse de manera significativa, por ejemplo hasta el 80%, mientras que la inhibición mediante el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 2 según la fórmula (2) fue más débil. El péptido de control de secuencia SEQ ID NO: 14 según la fórmula (14) no mostró en cambio inhibición alguna.

#### Ejemplo 4

Investigaciones *in vivo* en un modelo de ratón de la aterosclerosis

Como modelo de la aterosclerosis se usaron ratones ApoE<sup>-/-</sup> compañeros de camada, hembra, de 9 a 12 de semanas de edad (The Jackson Lab, Bar Harbor, Maine, EE.UU.). Se alimentaron durante 12 semanas con una dieta rica en grasa (21% de grasa; Altromin® C1061). Durante este tiempo, dos grupos de ratones recibieron tres veces por semana inyecciones intraperitoneales de 50  $\mu$ g del polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 15 según la

fórmula (15) tal como se indica a continuación:

CKEYFYTSSKSSNLAVFVTRC (15) (SEQ ID NO: 15)

5 (n = 12 ratones) o de un péptido de control de secuencia SEQ ID NO: 14 según la fórmula (14) tal como se indica a continuación:

KEYFYTSGK (14) (SEQ ID NO: 14)

10 (n = 7 ratones) en solución salina. Un grupo no tratado de ratones (n=12) sirvió como control adicional.

Los ratones se sacrificaron para investigaciones histológicas. Durante la duración de los ensayos los ratones estuvieron sanos y no mostraron signos de enfermedad. Se tomaron muestras de sangre al comienzo y tras finalizar la alimentación experimental. Se determinó el número de leucocitos de manera hemocitométrica, y se recogieron los sueros y se determinó el nivel de colesterol por medio del kit de colesterol Infinity (Thermo Electron, Melbourne, Australia).

Se determinó la magnitud de la aterosclerosis en raíces de aorta y aortas toracoabdominales, teniendo depósitos de lípidos por medio de tinción con rojo al aceite O (Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, Mach F. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res.* 2004; 94:253-61) y se cuantificaron por medio de análisis de imágenes computarizadas (Diskus software, Hilgers, Aachen). Se determinaron zonas con lesiones ateroscleróticas en secciones transversales de 5 µm a través del corazón y la raíz de la aorta. La determinación se realizó para cada raíz de la aorta por medio de zonas de lípidos teñidos de 6 secciones, separadas 50 µm unas de otras. Las zonas con lesiones ateroscleróticas se dividieron entre toda la superficie de la válvula de cada sección. La aorta toracoabdominal se abrió a lo largo de la línea central ventral y se teñieron las zonas de las lesiones en una preparación "en face" por medio de tinción con rojo al aceite O. Se calculó el porcentaje de depósito de lípidos dividiendo la zona teñida entre toda la superficie toracoabdominal.

Pudo establecerse que los ratones tratados con el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 15 según la fórmula (15), el ortólogo de ratón del polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3), mostraron, en comparación con los ratones que recibieron el péptido de control, una reducción significativa del desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Además pudo establecerse que la zona de la raíz de la aorta, que mostró placas, en relación con toda la superficie de la válvula se redujo igualmente de manera significativa en los ratones tratados. Igualmente pudo establecerse que el contenido en macrófagos en las lesiones se redujo de manera significativa.

Por tanto pudo mostrarse que mediante el ortólogo de ratón del polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 según la fórmula (3) pudo ralentizarse el desarrollo de una aterosclerosis *in vivo*, y los polipéptidos según la invención pueden por tanto encontrar aplicación terapéutica.

40 **Lista de secuencias**

<110> RWTH Aachen

45 <120> Antagonistas contra la interacción de PF4 y RANTES

<130> UD 40022 / SAM

<160> 15

50 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

55 <213> Artificial

<220>

<223> Antagonista

60 <220>

<221> misc\_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca de manera natural

65 <220>

<221> misc\_feature

ES 2 546 094 T3

<222> (9)..(21)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca de manera natural

<400> 1

Cys Xaa Xaa Tyr Phe Tyr Thr Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys  
20

5

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Antagonista

15 <400> 2

Cys Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val  
1 5 10 15

Val Phe Val Thr Arg Cys  
20

<210> 3

<211> 22

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antagonista

25 <400> 3

Cys Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Ser Ser Asn Pro Gly Ile  
1 5 10 15

Val Phe Ile Thr Arg Cys  
20

<210> 4

30 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Antagonista

<400> 4

Cys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Ser Ser Asn Pro Gly Ile Val  
1 5 10 15

Phe Ile Thr Cys  
20

40 <210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> Antagonista



<400> 5

Cys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Ser Ser Asn Tyr Gly Ile Val  
 1 5 10 15

Phe Ile Thr Cys  
 20

<210> 6

5 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

10 <223> Antagonista

<400> 6

Cys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Ser Lys Ser Ser Asn Tyr Gly Ile Val  
 1 5 10 15

Phe Ile Thr Cys  
 20

<210> 7

15 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

20 <223> Antagonista

<400> 7

Cys Tyr Phe Tyr Thr Ser Ser Lys Ser Ser Asn Pro Gly Ile Val Phe  
 1 5 10 15

Ile Thr Cys

25 <210> 8  
 <211> 66  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>

30 <223> Secuencia que codifica para el antagonista

<400> 8

**tgcaaggaat atttctacac ttccgggaaa tcctccaatc ctggaattgt gttcatcact 60**

**agatgt 66**

<210> 9

35 <211> 66  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>

40 <223> Secuencia que codifica para el antagonista

<400> 9

**tgcaaggaat atttctacac ttccgggaaa tgttccaatc ctgccgtggt gttcgtcact 60**

**agatgt 66**

<210> 10  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia que codifica para el antagonista  
 <400> 10  
 10 **tgCGAATATT tctacacttc cgggAAATCC tccaatcctg gaattgtgtt catcacttgt** 60  
 <210> 11  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia que codifica para el antagonista  
 20 <400> 11  
**tgCGAATATT tctacacttc cgggAAATCC tccaattacg gaattgtgtt catcacttgt** 60  
 <210> 12  
 <211> 60  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia que codifica para el antagonista  
 30 <400> 12  
**tgCGAATATT tctacacttc ctctaaatcc tccaattacg gaattgtgtt catcacttgt** 60  
 <210> 13  
 <211> 57  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> Secuencia que codifica para el antagonista  
 <400> 13  
**tgctatttct acacttcctc taaatcctcc aatcctggaa ttgtgttcat cacttgt** 57  
 45 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> Péptido de control  
 <400> 14  
**Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys**  
**1 5**  
 55 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 60 <220>

<223> Antagonista

<400> 15

Cys Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Ser Lys Ser Ser Asn Leu Ala Val  
1 5 10 15

Val Phe Val Thr Arg Cys  
20

5

**REIVINDICACIONES**

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos CKEYFYTSSNLAVVFTRC.