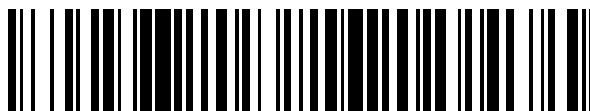


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 142**

51 Int. Cl.:

A61K 38/07 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2007 E 07869233 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2097093**

54 Título: **Péptidos terapéuticos y de diagnóstico**

30 Prioridad:

13.12.2006 US 869865 P

20.09.2007 US 974056 P

12.12.2007 US 955226

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

20.04.2016

73 Titular/es:

SUSAVION BIOSCIENCES, INC. (100.0%)

1615 W. UNIVERSITY DRIVE, SUITE 132

TEMPE, CA 85281, US

72 Inventor/es:

EGGINK, LAURA L. y

HOOBER, J. KENNETH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 567 142 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

Péptidos terapéuticos y de diagnóstico

Antecedentes**1. Campo de la técnica**

- 5 La presente invención se refiere en general al uso de péptidos sintéticos para tratar infecciones, enfermedades proliferativas celulares y trastornos inmunosupresores.

2. Estado de la técnica

- 10 Aproximadamente 40 millones de personas están infectadas por el VIH en todo el mundo y el 10 % de estos individuos morirá anualmente por SIDA. Además, se ha estimado que la cifra anual de nuevas infecciones es de 5 millones y en aumento. Los costes del tratamiento de esta enfermedad son enormes y varían desde 2.500 dólares americanos por paciente en Brasil a más de 10.000 dólares americanos por paciente al año en los países desarrollados. Se han estimado los costes de prevención en más de 120 miles de millones de dólares americanos en los próximos 10 años, aunque el beneficio a largo plazo de la prevención reduciría considerablemente los costes del tratamiento y la asistencia. El grueso de los costes del tratamiento actual es para fármacos antirretrovirales, que son notablemente eficaces pero a menudo dan lugar a resistencia. Adicionalmente, el control a largo plazo de la infección, muy probablemente mediante tratamiento como enfermedad crónica de bajo grado, aumenta la carga económica más allá de lo que es asequible en países con ingresos bajos y medios.

- 20 El VIH-1 entra en las células fijándose primero a uno o más receptores sobre una célula, induciendo de este modo cambios conformacionales y/o estructurales que permiten la inserción del genoma viral en la célula. Una vez dentro de la célula, el genoma viral es libre de replicarse. Las terapias principales contra las infecciones por el VIH son fármacos antirretrovirales, que inhiben la replicación del virus después de su entrada en la célula. Los más usados habitualmente son los inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa y los inhibidores de la proteasa, que bloquean el procesamiento enzimático de productos virales. Estos fármacos inhiben eficazmente la replicación del virus en el interior de una célula infectada y reducen la carga viral en la sangre hasta niveles no detectables.

- 30 Otro abordaje terapéutico usa inhibidores de la fusión, incluyendo proteínas (por ejemplo, anticuerpos monoclonales), péptidos y agentes de molécula pequeña (por ejemplo, fármacos), algunos de los cuales actúan en el exterior de la célula para evitar la fijación del VIH y la infección de la misma. Si el VIH no puede atravesar la membrana de la célula huésped e infectar la célula, el VIH no se puede replicar. Los inhibidores de la fusión bloquean con eficacia la infección por el VIH-1 y reducen significativamente la carga viral sistémica. Las vacunas que producen anticuerpos que inhiben dicha fusión son de interés a este respecto y varias empresas farmacéuticas están trabajando para alcanzar este objetivo.

- 35 Sin embargo, las combinaciones de fármacos de bajo peso molecular logran niveles indetectables del virus VIH en únicamente de aproximadamente el 50 al 60 % de los pacientes tratados. Además, el desarrollo de tratamientos que implican anticuerpos generalmente es costoso y requiere una infraestructura médica considerable. Adicionalmente, aunque el desarrollo de tratamientos profilácticos, tales como vacunas, es un esfuerzo importante, en particular para poblaciones diana susceptibles, también se deben desarrollar protocolos para los ya infectados.

- 40 En contraste con los abordajes terapéuticos dirigidos a la prevención o el control de la enfermedad inhibiendo directamente una etapa en el ciclo de replicación viral, como se ha descrito anteriormente, la reactivación del sistema inmunológico de los pacientes es una terapia alternativa que parece prometedora para restablecer la salud y la productividad para un paciente infectado de un modo práctico y rentable. Como resultado, un interés intenso en inmunoterapias, como indica el desarrollo de los tratamientos con citocinas, por ejemplo, está llevando a productos que pueden estimular o inhibir el sistema inmunológico. Un proyecto en desarrollo de citocinas/inmunomoduladores para el tratamiento del VIH/SIDA ha identificado, por ejemplo, dos péptidos clave derivados de tecnología con la proteína nuclear del timo (TNP) (Viral Genetics, Inc., Azusa, CA). Estos péptidos se producen de forma natural en diversos mamíferos, incluidos los seres humanos.

- 50 El papel de las citocinas en la inhibición de la infectividad del VIH, en particular de la interleucina 16 (IL-16), la interleucina 8 (IL-8) y RANTES (secretada y expresada por linfocitos T normales regulada por activación; también conocida como CCL5), es muy importante. El VIH-1 entra en la célula uniéndose primero a dos componentes moleculares clave sobre la superficie celular, la proteína CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4. Por tanto, las células CD4(-) son insensibles al VIH y la inactivación genética de CCR5 se correlaciona intensamente con la resistencia a la infección por el VIH-1. Las citocinas, tales como IL-16, IL-8 y RANTES, que tienen funciones solapantes y complementarias, pueden actuar atenuando la infección viral a través de la competición con la unión del virus e interfiriendo con la entrada del virus en las células mediante regulación por disminución de los receptores necesarios para la entrada. Otras citocinas, tales como los interferones (por ejemplo, IF- α e IF- γ) actúan reduciendo la carga viral mediante la estimulación de la fagocitosis mediada por anticuerpos.

Las interleucinas (IL) y los interferones (IF) son potentes estimulantes celulares que se liberan desde diversos tipos de células en respuesta a una agresión o lesión. En consecuencia, estas proteínas han atraído un intenso interés como agentes terapéuticos. No obstante, de un modo similar a los estimulantes tales como el lipopolisacárido (LPS), las IL y los IF inducen la liberación de citocinas inflamatorias y, por tanto, cuando se administran a concentraciones más altas de lo normal durante el tratamiento, tienen efectos adversos sustanciales debido a la inflamación, que puede ser potencialmente mortal y puede requerir instalaciones para tratamiento con el paciente hospitalizado. De un modo parecido, los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 se correlacionan directamente con la probabilidad de muerte en los seres humanos. Además, la producción de IL e IF recombinantes y su aplicación son muy costosas e incluso los tratamientos con inmunoestimulantes a dosis más bajas desarrollados para uso ambulatorio tienen índices de éxito menores y no son adecuados en algunas situaciones, tales como, por ejemplo, para extender la remisión por tratamiento para el cáncer o controlar una enfermedad tal como el VIH a nivel crónico.

En general, un estimulante de la liberación de IL-8 y IL-16 parece ser particularmente adecuado para un papel en la potenciación de la defensa del huésped. La liberación selectiva de IL-8 por los monocitos es posible sin la liberación de citocinas inflamatorias, tales como IL-1 β e IL-6. No obstante, un efecto potencialmente adverso de la producción de IL-8 es el reclutamiento potenciado de neutrófilos a las células endoteliales inflamadas y la posterior liberación de factores citotóxicos que producen daños celulares/tisulares, además de la producción continua de IL-8 por las células endoteliales adyacentes (no inflamadas). La consecuencia es un ciclo vicioso de reclutamiento de neutrófilos en respuesta a la IL-8, daños en los tejidos y más producción de IL-8, aunque concentraciones de IL-8 mayores pueden ser beneficiosas cuando conducen a la internalización de receptores y desensibilización de las células. Por tanto, los agentes terapéuticos exógenos, tales como moléculas de citocinas grandes e intactas, no son muy adecuados para uso terapéutico general.

La información relevante a los intentos para abordar uno o más de estos problemas se puede encontrar en las referencias siguientes. La publicación de patente de Estados Unidos n.º 2007/0003542; la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/0269519; la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2004/0248192; la publicación de patente de Estados Unidos n.º 6.193.981 P. W. Latham, 1999; Fätkenheuer et al., 2005; Stover et al., 2006; Cohen, 2007; GlaxoSmithKline, 2005a y GlaxoSmithKline, 2005b. No obstante, cada una de estas referencias sufre una o más de las siguientes desventajas:

1. el tamaño o composición del agente proporciona retos importantes para una síntesis y purificación rentables.
2. el agente es específico para un patógeno y/o tipo celular concretos, lo que los convierte en inadecuados para el uso terapéutico general;
3. el tratamiento con el agente induce efectos secundarios clínicamente perjudiciales que pueden ser potencialmente mortales, tales como inflamación o hepatotoxicidad, y requiere instalaciones para tratamiento con el paciente hospitalizado;
4. tras la finalización del tratamiento se produce poco después un incremento de la carga viral sistémica;
5. la exposición a largo plazo al agente a menudo produce patógenos resistentes al tratamiento;
6. los tratamientos con dosis menores desarrollados para uso ambulatorio tienen índices de éxito menores y no son adecuados en algunas situaciones;
7. el tratamiento es ineficaz, poco práctico e inasequible para una gran proporción de pacientes;
8. el desarrollo de anticuerpos terapéuticos requiere una infraestructura médica considerable;
9. el tratamiento, tales como vacunas, puede ser adecuado para prevenir la infección pero no para tratar a los ya infectados;
10. ausencia de sinergia beneficiosa entre la respuesta inmunogénica inducida y los efectos de otros inmunorreguladores endógenos;
11. el agente inhibe la liberación de citocinas inhibitoras que suprimen la liberación de citocinas beneficiosas, un tratamiento indirecto; y
12. el agente actúa restableciendo los niveles basales de las citocinas para equilibrar las respuestas del sistema inmunológico en lugar de estimular la activación de los fagocitos.

Muchos de estos protocolos terapéuticos también se hacen ineficaces con el tiempo, ya que la mutación del patógeno le permite escapar al tratamiento. Además, cualquier inmunosupresión que acompaña a la enfermedad atenúa la capacidad del sistema inmunológico innato para responder a cambios antigénicos y, de este modo, mantener la infección bajo control. No obstante, aunque el virus puede mutar en uno o unos pocos sitios y, de este modo, escapa a la actividad neutralizante de los anticuerpos, los anticuerpos producidos de forma endógena normalmente son policlonales y todavía pueden unirse a los virus.

El sistema inmunológico en los individuos infectados con un agente patógeno, tal como el VIH, inicia una respuesta de defensa mediante la producción de anticuerpos. La presencia de anticuerpos anti-VIH a menudo se usa como prueba diagnóstica de una infección. Durante la evolución de la enfermedad, el nivel de anticuerpos permanece alto mientras que la capacidad para mantener una carga viral mínima se debilita gradualmente a medida que la población de linfocitos T CD4+ disminuye. Los componentes celulares de la respuesta inmunológica innata se convierten en ausentes o quiescentes. Cuando los mecanismos de defensa inmunológicos alcanzan un nivel lo suficientemente bajo, la replicación viral no se controla y conduce rápidamente a una etapa final de la enfermedad, que se denomina SIDA. No obstante, incluso en esta etapa tardía, se puede rescatar a los pacientes de la muerte mediante un tratamiento antirretroviral agresivo. Por tanto, un agente que reactiva las células del sistema inmunológico, en particular fagocitos, probablemente también restaure una defensa inmunológica contra la progresión de la enfermedad.

A la luz de los tratamientos disponibles para infecciones tales como el SIDA inducido por el VIH, existe un gran número de personas en todo el mundo que necesitan tratamientos alternativos inespecíficos, rentables y prácticos que refuercen directamente el sistema inmunológico de un paciente durante la evolución de la enfermedad si causar efectos secundarios perjudiciales. Idealmente, dichos tratamientos también deberán ser eficaces contra otros tipos de patógenos.

Los agentes terapéuticos que activan/reactivan el sistema inmunológico son particularmente prometedores a este respecto, incluyendo las citocinas y los inmunomoduladores, aunque los tratamientos basados en agentes exógenos, tales como moléculas de citocinas grandes intactas, generalmente no son adecuados para uso terapéutico. No obstante, los péptidos son a menudo agentes terapéuticos más adecuados que los polipéptidos o proteínas grandes. Los péptidos, por ejemplo, se pueden diseñar para inducir uno o más efectos deseados concretos *in vitro* o *in vivo*, a menudo sin inducir de forma concomitante efectos perjudiciales, y normalmente se pueden sintetizar de un modo rentable.

Sumario

La presente invención generalmente se refiere a péptidos y tratamientos que mitigan o anulan los efectos de agentes patógenos mediante la estimulación de la producción de citocinas terapéuticamente beneficiosas. Más particularmente, la invención se refiere a péptidos inmunoestimulantes que, cuando se usan en combinación con anticuerpos contra patógenos humanos, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), eliminan de forma eficaz dichos patógenos. Los péptidos pueden, en combinación con los anticuerpos, usarse como microbicidas y también se pueden usar para tratar enfermedades proliferativas y/o trastornos inmunosupresores.

Los péptidos de la presente invención pueden funcionar sinérgicamente con anticuerpos dirigidos contra patógenos mediante estimulación de las células fagocíticas que digieren el patógeno tras la fagocitosis mediada por anticuerpos. Además, los péptidos y los tratamientos de la presente invención no producen ni sostienen efectos secundarios graves, tales como inflamación.

Por tanto, los péptidos y los tratamientos de la presente invención proporcionan tratamientos rentables prácticos alternativos que pueden ser inespecíficos con respecto al patógeno y al tipo de célula, y, por tanto, tienen una amplia aplicabilidad para tratamiento médico de infecciones mediadas por patógeno.

En una realización específica, el péptido terapéutico es inmunoestimulador y la secuencia se selecciona del grupo que consiste en VGGGS (SEQ ID NO: 1), PSSNA (SEQ ID NO: 2), HPSLK (SEQ ID NO: 3), HPSLG (SEQ ID NO: 4), HPSLL (SEQ ID NO: 5), HPSLA (SEQ ID NO: 6), NPSHPLSG (SEQ ID NO: 7) y NPSHPSLG (SEQ ID NO: 8).

Otra realización de la presente invención es una composición inmunoestimulante que incluye al menos un péptido terapéutico. En un aspecto, el péptido puede ser parte de una construcción de péptido lineal o ramificado. En otro aspecto, en la construcción puede haber de uno a cuatro péptidos. En aún otro aspecto, la construcción incluye una secuencia enlazadora tal como GGGS (SEQ ID NO: 9).

Otra realización más de la invención es el uso del péptido en la fabricación de un medicamento para las infecciones microbianas, enfermedades de proliferación celular y/o trastornos inmunosupresores. En un aspecto adicional, la afección médica que se está tratando puede ser una infección viral, tal como una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y/o una enfermedad proliferativa celular tal como un cáncer. En otro aspecto más, la afección es una infección microbiana y la composición es un microbicida.

La administración de la composición puede estimular la producción de al menos una citocina terapéuticamente beneficiosa y la actividad de al menos un anticuerpo dirigido al patógeno. La composición puede estimular la actividad de al menos un anticuerpo dirigido al patógeno mediante la interacción sinérgica y/o la activación de al menos una célula fagocítica. El anticuerpo dirigido al patógeno puede ser un anticuerpo antiviral, anticanceroso, antibacteriano, antiprotzoos, antifúngico, o una combinación de los mismos. El tratamiento puede incluir la liberación de un patrón específico de moléculas de citocinas en un sujeto y/o la estimulación del sistema inmunológico del sujeto. La composición se puede administrar al sujeto usando uno o más enfoques, tales como mediante inyección, por vía tópica y por vía oral.

Breve descripción de las figuras

- La **figura 1** ilustra un modelo de trabajo de la estructura molecular de una realización de la invención, una construcción peptídica inmunorreguladora multivalente que contiene cuatro péptidos de acuerdo con la invención, cada uno de los cuales está unido a un marco central a través de una secuencia enlazadora;
- 5 La **figura 2A** ilustra la estructura química de una construcción peptídica de acuerdo con una realización de la invención, la construcción peptídica 6B (SynGia™6B) que contiene cuatro copias de la secuencia central HPSLK (SEQ ID NO: 3) unidas a una estructura de marco central ramificada;
- La **figura 2B** ilustra la estructura química de una construcción peptídica de acuerdo con una realización de la invención, la construcción como se muestra en la figura 2A a la que se ha añadido un marcador de dansilo;
- 10 La **figura 3** es un espectro de masas de la construcción peptídica ilustrada en la figura. 2A;
- La **figura 4A** es un gráfico de dispersión que ilustra la inhibición de la replicación del VIH-1 de clado B en células de sangre humana por una realización de la invención, el péptido 6B (SynGia™ 6B), en presencia de antisuero;
- La **figura 4B** es un gráfico de dispersión que ilustra la inhibición de la replicación del VIH-1 de clado B en células de sangre humana por una realización de la invención, el péptido 6B (SynGia™ 6B), en ausencia de antisuero;
- 15 La **figura 4C** es un gráfico de dispersión que ilustra la inhibición de la replicación del VIH-1 de clado C en células de sangre humana por una realización de la invención, el péptido 6B (SynGia™ 6B), en presencia de antisuero;
- La **figura 4D** es un gráfico de dispersión que ilustra la inhibición de la replicación del VIH-1 de clado C en células de sangre humana por una realización de la invención, el péptido 6B (SynGia™ 6B), en ausencia de antisuero;
- 20 La **figura 5A** es un gráfico de barras verticales que ilustra la inhibición sinérgica de la replicación del VIH-1 de clado B (B) o del VIH-1 de clado C (C) en células de sangre humana por cuatro realizaciones de péptidos de la invención (los péptidos 6B, 6C, C2, y H1C) en ausencia (barras cortas) o en presencia (barras largas) de una preparación de anticuerpos que, cuando se analizó por separado, proporcionó solo aproximadamente un 30 % de neutralización (el péptido 6B (SynGia™6B) es una construcción que contiene cuatro copias de la secuencia central HPSLK (SEQ ID NO:3), el péptido 6C (SynGia™6C) es una construcción que contiene cuatro copias de la
- 25 secuencia central PSSNA (SEQ ID NO:2), el péptido C2 (SynGia™C2) es una construcción que contiene cuatro copias de la secuencia central VGGGS (SEQ ID NO:1) y el péptido H1C (SynGia™H1C) es una construcción que contiene cuatro copias de la secuencia central NPSHPLSG (SEQ ID NO:7)); y
- La **figura 5B** es un gráfico de barras verticales que ilustra la inhibición sinérgica de la replicación del VIH-1 de clado C en células de sangre humana por las cuatro realizaciones de la invención descritas en la figura 5A, tanto en ausencia (barras cortas) como en presencia (barras largas) de una preparación de anticuerpos que, cuando se analizó por separado, no proporcionó (aproximadamente 0 %) de neutralización.
- 30

Descripción detallada

Con el fin de proporcionar un agente terapéutico no específico con un frente relativamente amplio, un agente que induce la producción de citocinas beneficiosas debería funcionar en concierto con la actividad fagocítica de las células inmunitarias. Los péptidos de la presente invención pueden alcanzar este objetivo mediante inducción concomitante de la liberación de citocinas beneficiosas y estimulación del sistema inmunológico, incluyendo los fagocitos, para responder a la presencia de anticuerpos dirigidos a patógenos. Por tanto, el tratamiento con los péptidos de la presente invención deberá inducir la activación de las células del sistema inmunológico *in vivo* y proporcionar una elevación endógena sostenida de citocinas beneficiosas, en contraste con la rápida desaparición de estas proteínas cuando se administran de forma exógena.

35

40

Un inductor de la producción endógena de, específicamente, IL-2, IL-8, IL-15 e IL-16, deberá mantener un nivel elevado de citocinas beneficiosas que potencie el mecanismo de defensa global del cuerpo sin alcanzar concentraciones que producen efectos secundarios tóxicos, tales como inflamación. Adicionalmente, la reticulación selectiva de los receptores de la superficie celular mediante una estructura multivalente que incorpora al menos un péptido de la presente invención debería actuar atenuando la infección viral mediante interferencia con la entrada del virus en las células y estimulando la actividad de las células fagocíticas para eliminar las partículas virales, de modo que se potencia el tratamiento minimizando o evitando infecciones adicionales por patógenos activos.

45

Como se usa en el presente documento, con los términos “comprende”, “que comprenden”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”, “que tiene” o cualquier otra variación de los mismos se pretende abarcar una inclusión no exclusiva. Por ejemplo, un proceso, procedimiento, artículo o aparato que comprende una lista de elementos no está necesariamente limitado a únicamente dichos elementos, pero pueden incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho proceso, procedimiento, artículo o aparato. Adicionalmente, a menos que se indique expresamente lo contrario, “o” hace referencia a una inclusión o y no a una exclusión o. Por ejemplo, una condición A o B es satisfecha por una cualquiera o más de los siguientes: A es cierto (o presente) y B es falso (o no presente), A es falso (o no presente) y B es cierto (o presente) y tanto A como B son ciertos (o presentes).

50

55

Asimismo, el uso de “un/uno” o “una” se emplea para describir los elementos y componentes de la invención. Esto se realiza simplemente por comodidad y para proporcionar una idea general de la invención. Esta descripción deberá leerse para incluir uno o al menos uno y el singular incluye también el plural a menos que sea obvio que se entiende lo contrario.

5 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria descriptiva, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en
10 la presente memoria descriptiva se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluidas las definiciones, tendrá prioridad. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.

Las siguientes definiciones se refieren a las realizaciones concretas descritas en el presente documento y no deben considerarse limitantes; la invención incluye los equivalentes de otras realizaciones no descritas.

15 Como se usa en el presente documento, el término "construcción", cuando se refiere a un péptido, se entiende que significa un marco de soporte de uno o más péptidos, incluyendo, sin limitaciones, un marco central de tri-lisina que soporta cuatro secuencias peptídicas idénticas dentro de la misma estructura.

20 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "citocina" es una molécula mensajera que controla la actividad de las células, incluyendo, sin limitaciones, las células del sistema inmunológico. Las citocinas pueden controlar la actividad celular a través de varios mecanismos, incluyendo, sin limitaciones, permitiendo que las células se comuniquen y alteren la función unas de otras. Ejemplos no limitantes de citocinas incluyen proteínas inmunorreguladoras tales como interleucinas e interferones, que son secretadas por las células del sistema inmunológico y pueden afectar a la respuesta inmunitaria.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "inflamación perjudicial" se entiende que significa inflamación clínicamente manifiesta que es perjudicial con respecto al tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "dosis eficaz" significa una cantidad de un péptido que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para lograr una respuesta terapéutica deseable, integral, o de otro modo, satisfactoria, incluyendo, sin limitaciones, una respuesta óptima y una respuesta máxima o casi máxima.

30 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "inmunomodulador" o "inmunomoduladora", cuando se refiere a una sustancia o agente, significa una sustancia o agente que afecta el funcionamiento del sistema inmunológico.

35 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "inmunoestimulador" significa relacionado con una respuesta inmunitaria o que la produce, incluyendo, sin limitaciones, sustancias o agentes inmunogénicos que producen una respuesta inmunitaria.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "inmunorregulador" significa relacionada con la regulación del sistema inmunológico, incluyendo, sin limitaciones, los linfocitos T inmunorreguladores.

40 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "infección" significa un estado o enfermedad clínicamente manifiesta producida por el establecimiento de un agente infeccioso en un sujeto o huésped adecuado.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "estimulante" significa un agente que produce un aumento temporal de la actividad funcional o la eficiencia de un organismo o de cualquiera de sus partes, incluyendo, sin limitaciones, un fármaco sintético o sustancia de origen natural, tal como la adrenalina.

45 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "estimular" o "estimulante" significa que excita la actividad o el crecimiento, o una actividad mayor.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "sujeto" significa uno sobre el que se actúa durante el curso del tratamiento, incluyendo, sin limitaciones, un individuo humano o no humano que está en espera o recibiendo asistencia médica y tratamiento.

50 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "terapéutico", cuando hace referencia a una sustancia o tratamiento, significa una sustancia o tratamiento que se ocupa de proporcionar una curación o ayudar a la misma, o de mejorar los síntomas de una disfunción corporal, tal como la causada por una enfermedad o lesión.

La presente invención se refiere en general a una familia de péptidos sintéticos capaces de inducir la liberación de citocinas beneficiosas y también la estimulación del sistema inmunológico para responder a la presencia de anticuerpos dirigidos a patógenos.

La **figura 1** ilustra un modelo de trabajo de la estructura molecular de una realización de una construcción peptídica inmunorreguladora multivalente **10** de acuerdo con la invención. La construcción **10** puede sintetizarse con dos, tres, cuatro, ocho o más brazos **1**, usando la misma secuencia peptídica central **2** en los cuatro brazos o con dos o más secuencias diferentes. La longitud del espaciador **3** entre el marco central **4** de la construcción y la secuencia peptídica central **2** determina la longitud del brazo **1**. Los brazos **1** se ilustra en la **figura 1**, por ejemplo, puede tener aproximadamente $3 \pm 0,5$ nm de longitud en función de la conformación, o aproximadamente 7 nm a través de la molécula. Los dominios de la superficie celular de las proteínas receptoras conocidas tienen, correspondientemente, aproximadamente 3 a 4 nm de diámetro. Esta distancia se puede ajustar aumentando o disminuyendo la longitud del enlazador. Por lo tanto, la reticulación de los receptores se puede conseguir con una realización de este tipo. La naturaleza multidimensional de la estructura ilustrada en la **figura 1** se obtuvo usando técnicas de modelado molecular estándar.

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño y síntesis de péptidos

Mediante una detección selectiva de las secuencias peptídicas se identificó un conjunto de secuencias de interés. Los péptidos correspondientes se sintetizaron mediante procedimientos en fase sólida usando la protección de la cadena lateral Fmoc estándar. Los péptidos ramificados se construyeron sobre un marco de tri-lisina central, que permite cuatro secuencias idénticas dentro de la misma estructura. Se incluyó una secuencia enlazadora, (Gly)₃-Ser (GGGS, SEQ ID NO: 9), para separar la secuencia activa del marco central. Las distancias entre las secuencias activas se pueden ajustar disminuyendo o aumentando la longitud del enlazador, incluyendo, sin limitaciones, la inclusión de dos enlazadores en tándem (GGGSGGGS, SEQ ID NO: 10), o la inserción de cualquier enlazador inerte, incluyendo, sin limitaciones, un polietilenglicol (PEG) de una longitud variable. La estructura ramificada se diseñó de modo que tuviera una actividad mejorada mediante la agrupación de receptores (reticulación) en la superficie de las células respondedoras.

Los péptidos se sintetizaron sobre resina de PAL-PEG-poliestireno (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando aminoácidos protegidos con Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil) y un sintetizador peptídico de flujo continuo Milligen Biosearch 9050+ (Millipore Corporation, Billerica, MA).

El extremo C del marco central normalmente es un resto de lisina (K). No obstante, el extremo C se puede modificar para incluir aminoácidos adicionales en el extremo C, tales como un resto de cisteína, a la que se pueden añadir marcadores tales como grupos fluorescentes, o un resto de ϵ -biotinil-N-lisina (biotinil-K) útil para los procesos de purificación posteriores. Por consiguiente, la disponibilidad de dichos sitios se puede utilizar con ventaja de muchas formas, incluyendo, sin limitaciones, ayudar en la detección, cuantificación y purificación de los péptidos. Además, se puede insertar un aminoácido tal como β -alanina (β A) o triptófano (W) entre el aminoácido añadido en el extremo y el resto de lisina en el extremo T del marco central a fin de proporcionar un espaciador o un medio para determinar la concentración mediante absorbancia. Ejemplos no limitantes de tales restos de lisina en el extremo C modificados en el marco central incluyen K- β A-C y K-W-biotinil-K, respectivamente. Además, se pueden añadir restos de lisina adicionales a uno o ambos grupos α - y ϵ -amino de una lisina modificada en el extremo C sobre el marco central para dar, por ejemplo, (K)₂K, (K)₂K- β A-C o (K)₂K-W-biotinil-K, de modo que forman estructuras ramificadas en las que los grupos α - y ϵ -amino están disponibles para la extensión.

Los restos de lisina utilizados en los puntos de ramificación se pueden incorporar con protección Fmoc sobre los grupos α - y ϵ -amino, de modo que ambos pasan a estar disponibles para la formación del enlace amida después de la reacción de desprotección estándar con piperidina. En algunas realizaciones, por ejemplo, se puede incorporar un marcador fluorescente adecuado, incluyendo, sin limitaciones, un grupo dansilo incorporado mediante reacción con el grupo tiol sobre la cisteína en el extremo C usando ácido 5-(((2-yodoacetil)amino)etil)amino)naftalen-1-sulfónico (1,5-IAEDANS) tras un protocolo estándar para sondas reactivas con tiol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Del mismo modo, en estas u otras realizaciones, la biotina puede estar unida a la lisina a través de un enlace amida al grupo amino de la cadena lateral que, debido a su alta afinidad con la estreptavidina, proporciona un medio para recuperar el péptido con las proteínas asociadas a partir de mezclas de reacción con el fin de estudiar la interacción del péptido con los componentes celulares.

Tras la escisión del lecho de la resina, el producto se puede purificar mediante HPLC en una columna preparativa Jupiter Proteo C12 (21,2 mm x 250 mm) (Phenomenex, Inc., Torrance, CA) usando un gradiente de 8 % a 18 % de acetonitrilo en agua que contiene ácido trifluoroacético (TFA) 10 mM. La pureza del producto peptídico final se confirmó mediante espectroscopia de masas realizada utilizando un espectrómetro de masas Voyager DE STR (Applied Biosystems, Foster City, CA). El péptido purificado mediante HPLC se puede secar al vacío, se disuelven en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) a pH 7,2 y se pasa a través de una columna de filtración en gel de Sephadex G-15 o G-25 (1 x 48 cm para muestras pequeñas) para separar el TFA del péptido. Después, la columna se puede eluir con PNS estéril.

Como alternativa, el producto puede purificarse mediante otras técnicas, incluyendo, sin limitaciones, el uso de una cromatografía de intercambio iónico de cartucho de fase inversa C₁₈ y cromatografía de filtración en gel para eliminar

los productos secundarios de la síntesis. La concentración puede determinarse mediante las absorbancias del fluoróforo (por ejemplo, el grupo dansilo, coeficiente de extinción, $\epsilon_{mM} = 5,7 \text{ cm}^{-1}$ a 336 nm), la absorbancia del enlace peptídico a 210 nm ($\epsilon_{mg/ml} \approx 31 \text{ cm}^{-1}$), la absorbancia de los aminoácidos aromáticos (por ejemplo, triptófano, $\epsilon_{mM} = 5,6 \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm) en el péptido (cuando está presente) y/o la absorbancia del reactivo de ácido bicinónico (Pierce). Las soluciones peptídicas se pueden ajustar a la concentración deseada y esterilizar mediante filtración antes de su uso.

Las **figuras 2A-2B** ilustran las estructuras químicas de dos formas de realizaciones de la presente invención que se sintetizaron y se purificaron de acuerdo con los métodos y procedimientos descritos anteriormente. Las construcciones peptídicas ilustradas contienen cuatro secuencias idénticas, cada una de las cuales está conectada a un marco central ramificado de tri-lisina a través de una secuencia enlazadora de (Gly)₃-Ser (GGGS, SEQ ID NO: 9). La **figura 2A** ilustra una construcción peptídica **20** de acuerdo con una realización la presente invención, el péptido 6B (SynGia™6B) que contiene cuatro copias de la secuencia central que contiene el péptido HPSSLK (SEQ ID NO: 3) **22**. El péptido **22** tiene una masa molecular de 3.685,2 Daltons. La **figura 2B** ilustra otro tipo de construcción **20** que consiste en la construcción **20** mostrada en la **figura 2A**, el péptido 6B (SynGia™6B), al que se ha añadido covalentemente un marcador de dansilo **25** a la β -alanina en el extremo C y los restos de cisteína. La masa molecular del péptido dansilado es de 4.165,8 Daltons.

La **figura 3** ilustra un espectro de masas de ionización desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS) de la construcción peptídica 6B (SynGia™6B) purificada **20** cuya estructura se muestra en la **figura 2A**. El componente de 3.707 Dalton es un aducto de sodio de la construcción peptídica que se genera durante el análisis mediante espectroscopia de masas. El espectro de masas se registró usando un espectrómetro de masas Voyager DE STR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Aunque estos datos indican que los péptidos aislados eran esencialmente puros, los péptidos sustancialmente o algo menos purificados también pueden ser adecuados para su uso como agentes terapéuticos.

Los péptidos ilustrados en las **figuras 2A-B** son ejemplos no limitantes de una familia de péptidos terapéuticos de acuerdo con la presente invención que normalmente tienen en común una o más de las siguientes propiedades:

- la capacidad para actuar sinérgicamente con los anticuerpos para neutralizar el VIH;
- el aminoácido en el extremo N normalmente es hidrofóbico y/o neutro;
- las composiciones son ricas en prolina (P), serina (S), treonina (T) y asparagina (N);
- el orden de estos aminoácidos en las secuencias no es rígido y puede variar;
- una secuencia común es XPSX, en la que X puede ser cualquier aminoácido;
- las secuencias varían de longitud de 4 a 8 aminoácidos;
- el aminoácido en el extremo C puede variar (por ejemplo, HPSSLK (SEQ ID NO:3), HPSLG (SEQ ID NO:4), HPSLL (SEQ ID NO:5), HPSLA (SEQ ID NO:6), etc.); y
- las secuencias de aminoácido internas pueden variar (por ejemplo, NPSHPLSG (SEQ ID NO: 7), NPSHPSLG (SEQ ID NO: 8), etc.).

Ejemplo 2

Sinergia entre anticuerpos y péptidos

La capacidad de los péptidos para inhibir la replicación del VIH, solos y en combinación con anticuerpos, se analizó del siguiente modo. Aproximadamente 3 millones de células de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas congeladas obtenidas del sistema del California Blood Bank se descongelan a 37 °C y se transfieren a un tubo cónico de 50 ml en el que lentamente se añaden 8 ml de medio de lavado. Después, se añaden 8 ml adicionales de medio de lavado y se agita para mezclar. Después, las células se centrifugan a 330 g durante 10 minutos, se retira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 10 ml de medio de lavado y se centrifuga como se ha indicado anteriormente. A continuación, las células lavadas se resuspenden en medio RPMI-B que contiene 10 % de FBS, se añade fitohemaglutinina a to 5 $\mu\text{g/ml}$ y las células se incuban a 37 °C durante 24 horas en 5 % de CO₂ humidificado. Las células se lavan, se resuspenden hasta aproximadamente 6 millones de células por ml y se añaden 50 μl (aproximadamente 250.000 células viables) a cada pocillo de ensayo. Después se añaden 100 μl del péptido de ensayo a una concentración suficiente para proporcionar la concentración final deseada, seguidos de 100 μl de suspensión del virus (100 medianas de la dosis infecciosa de cultivo tisular (DICT₅₀)). La placa de ensayo se incubó 3 días a 37 °C, después se lava 3 veces para eliminar los virus unidos y las células se suspenden de nuevo en 250 μl de medio. Después de 24 horas adicionales de incubación, las células se lisan con Triton X-100 y cada muestra se analiza mediante un inmunoensayo ligado a enzimas para la proteína p24 para cuantificar la neutralización del virus. En otro conjunto de muestras, también se añaden preparaciones de anticuerpo a una concentración deseada (es decir, además del péptido).

Las **figuras 4A-4D** son gráficos de dispersión que ilustran la inhibición de la replicación del VIH (neutralización) en PBMC mediante la construcción peptídica SynGia™6B (Péptido 6B) que contiene cuatro copias del péptido central HPSLK (SEQ ID NO: 3) unido a una estructura de marco central ramificada (Susavion Biosciences Inc., AZ). El péptido 6B se analizó para determinar la actividad con dos cepas del VIH, clado B (cepa SF162) y clado C (cepa 97ZA009), ambos proporcionados por el Departamento de Salud Pública de California (Richmond, CA). El clado B del VIH-1 es la cepa principal en América del Norte y el clado C del VIH-1 es la cepa principal en el centro y sur de África, la India y China. El péptido se analizó solo (-) o en combinación con suero de individuos infectados por el VIH (+), como se indica a continuación.

Figura	Cepa del VIH	Péptido	Suero
4A	Clado B	HPSLK (SEQ ID NO:3)	+
4B	Clado B	HPSLK (SEQ ID NO:3)	-
4C	Clado C	HPSLK (SEQ ID NO:3)	+
4D	Clado C	HPSLK (SEQ ID NO:3)	-

10 En ausencia de péptido, la preparación de anticuerpos (suero) proporcionó solo aproximadamente un 30 % de neutralización a la misma dilución (datos no mostrados).

15 Los datos mostrados en las **figuras 4A-4D** indican que los péptidos tienen actividad inhibitoria sustancial cuando se analizan solos. El péptido 6B, la construcción que contiene cuatro copias de la secuencia central HPSLK(SEQ ID NO: 3), muestra una actividad inhibitoria particularmente fuerte a las concentraciones más altas. No obstante, incluso a concentraciones bajas (picomolares) del péptido, los péptidos alcanzaron esencialmente una inhibición completa de la replicación viral en presencia de anticuerpos (suero), como se muestra en las **figuras 4A y 4C**. Por lo tanto, los péptidos solos a concentraciones picomolares y nanomolares consiguen la inhibición de la replicación (de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 %) y los anticuerpos solos dieron únicamente una modesta o mínima atenuación de la replicación viral (aproximadamente 30 %).

20 Por el contrario, los péptidos alcanzaron una inhibición casi cuantitativa de la replicación viral cuando se usaron en combinación con los anticuerpos, en particular con los anticuerpos de individuos infectados. Para los ensayos en los que se combinaron los anticuerpos contra el VIH con los péptidos, se logró una inhibición esencialmente completa de la replicación. Además, se obtuvo una extensión máxima de neutralización con la menor concentración de péptido probada, lo que indica que los péptidos son activos en el intervalo de concentración nanomolar. Los anticuerpos los proporcionó como suero de pacientes infectados por el VIH por el Departamento de Salud Pública (Richmond, CA) California y se diluyeron a una concentración que, en ausencia de los péptidos (datos no mostrados), solo proporcionaron una neutralización de aproximadamente un 30 %.

30 La **figura 5A** y la **figura 5B** son gráficos de barras verticales que ilustran la inhibición sinérgica de la replicación del clado B del VIH-1 (B) y del clado C del VIH-1 (C) en células de sangre humana por cuatro realizaciones peptídicas diferentes de la presente invención, las construcciones del péptido 6B (SynGia™6B) que contiene cuatro copias de la secuencia central HPSLK (SEQ ID NO:3), el péptido 6C (SynGia™6C) que contiene cuatro copias de la secuencia central PSSNA (SEQ ID NO:2), el péptido C2 (SynGia™C2) que contiene cuatro copias de la secuencia central VGGGS (SEQ ID NO:1) y el péptido H1C (SynGia™H1C) que contiene cuatro copias de la secuencia central NPSHPLSG (SEQ ID NO:7) (Susavion Biosciences Inc., AZ). Las barras cortas representan la neutralización por el péptido solo. Las barras largas representan la neutralización cuando se añadió suero combinado de pacientes positivos para el VIH junto con el péptido. Las barras representan los promedios de dos experimentos, cada uno realizado por cuadruplicado. En un conjunto de experimentos, cada péptido se analizó a 10 nM para determinar la capacidad para inhibir la replicación. En ausencia de péptido, la preparación de anticuerpos (suero) proporcionó solo aproximadamente un 30 % de neutralización (inhibición) a la misma dilución (datos no mostrados). Los resultados de este primer conjunto de ensayos se muestran en la **figura 5A**. En un segundo conjunto de experimentos, se añadió péptido a 10 nM solo o en presencia de una preparación de anticuerpos anti-VIH-1 (regalado por el Dr. Tsafir Mor, The Biodesign Institute en la Arizona State University, Tempe, AZ) que, en ausencia del péptido, no proporcionó neutralización (datos no mostrados). Los resultados de este segundo conjunto de ensayos se muestran en la **figura 5B**. Los datos mostrados en las **figuras 5A y 5B** indican que los cuatro péptidos mostraban una actividad inhibitoria sustancial cuando se analizan solos, que el nivel de inhibición mejoraba mediante la adición de anticuerpos y que el péptido 6B que contiene cuatro copias de HPSLK, (SEQ ID NO: 3) mostraba la inhibición más fuerte de los cuatro péptidos analizados.

50 Los datos mostrados en las **figuras 4A-D** y las **figuras 5A-B** indican que los péptidos actúan de forma sinérgica con los anticuerpos en el suero. La sinergia entre los péptidos y los anticuerpos se demuestra de manera espectacular en la **figura 5B**, que ilustra los resultados de un ensayo con un péptido añadido solo (barras cortas) o en combinación con una preparación de anticuerpos que por sí sola no proporcionó neutralización alguna (barras largas). En combinación con el péptido, se consiguió una inhibición de la replicación del 80 % al 90 %.

En otro experimento, la adición de un péptido a cultivos de una línea de células T (MT2) inhibió la replicación del VIH del 10 % al 25 %, dependiendo del péptido. La adición de antisuero en estos experimentos no mostró un efecto sinérgico (datos no mostrados).

- 5 Por lo tanto, la sinergia demostrada en las **figuras 4A-D** y las **figuras 5A-B** indica un papel del péptido que puede ser separado de su potencial de acción sobre los linfocitos. Claramente, el efecto de los péptidos puede ser más que un simple efecto aditivo del péptido más anticuerpos, y muy probablemente sea el resultado de la activación de los fagocitos. Sin tal activación, no se esperaría que el complejo virus-anticuerpo sea eliminado de forma eficaz mediante fagocitosis mediada por Fc por estas células.

Ejemplo 3

10 Inducción de la liberación de citocinas

Para determinar si la inhibición de la replicación del VIH por el péptido puede ser el resultado de la inducción de la liberación de citocinas, PBMC cultivadas se trataron con una realización del péptido de la presente invención y, después de 4 horas de incubación, se recogió el medio y se analizaron los cambios en el cantidades de 40 citocinas diferentes. La construcción peptídica HPSLK (SEQ ID NO: 3) **28** mostrada en la **figura 2B** se añadió a una concentración de 100 nM en cada uno de los ensayos. Los cultivos de PBMC se establecieron como se describe en el ejemplo 1 con células de Cellular Technologies, Ltd. (Shaker Heights, OH). Aproximadamente 3 millones de células de PBMC humanas congeladas se descongelaron a 37 °C y se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml, en el que lentamente se añaden 8 ml de medio de lavado. Después, se añaden 8 ml adicionales de medio de lavado y se agita para mezclar. Después, las células se centrifugan a 330 g durante 10 minutos, se retira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 10 ml de medio de lavado y se centrifuga como se ha indicado anteriormente. A continuación, las células lavadas se resuspenden en medio RPMI-1640 que contiene 10 % de FBS a aproximadamente 6 millones de células por ml y se añaden 100 µl de la suspensión en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incuban durante la noche a 37 °C en CO₂ humidificado al 5 %. Después de 24 horas, el medio se reemplaza con 200 µl de medio RPMI-1640 recién preparado que contiene 10 % de FBS y se incubaba a 37 °C en CO₂ humidificado al 5 % durante 2 días. Para los datos mostrados en la Tabla 1, a continuación, se añadió la parte alícuota de péptido a las muestras por duplicado a una concentración final de 100 nM y se incubó a 37 °C en CO₂ humidificado al 5 % durante 4 horas. Para otros experimentos (datos no incluidos), la incubación se continuó durante 24 horas. A continuación se retira el medio y se almacena a -80 °C. Las muestras se analizan para determinar la producción de citocinas. Un conjunto de células control no se trata con un agente experimental. Un segundo conjunto de células control se trata con LPS, un agente de uso habitual para inducir la producción de diversas citocinas inflamatorias. El control positivo para la inflamación es esencial para asegurar que los péptidos no producen una respuesta inflamatoria no regulada.

El medio de cultivo se retira para el análisis de los niveles de citocinas con procedimientos desarrollados por RayBiotech, Inc. (Norcross, GA). En esta tecnología, las matrices de membrana de los anticuerpos contra citocinas se incuban con muestras de medios. Después del lavado, se incubaba la matriz con un cóctel de todos los anticuerpos marcados con biotina. Después, se eliminan de la membrana los anticuerpos no unidos mediante lavado y se incuban con estreptavidina marcada con un colorante fluorescente. Después de un lavado final, las matrices de membrana se leen en un detector de fluorescencia.

Los péptidos no produjeron citotoxicidad, tal como se analizó mediante un procedimiento de doble colorante en el que el naranja de acridina brilla de color verde en las células viables y el bromuro de etidio brilla en rojo en las células muertas. La toxicidad del péptido *in vivo* se analiza mediante la inyección de un péptido en animales. Los péptidos se pueden administrar de varias formas, incluyendo, sin limitaciones, mediante inyección (por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal), tópica (transmucosa, transbucal o transdérmica) y/o por vía oral (líquido, comprimido o cápsula). En estudios preliminares con ratones no se han observado efectos adversos del péptido (datos no mostrados). Por el contrario, los animales tratados parecen exhibir mayor bienestar, lo que podría ser un efecto secundario beneficioso de la inmunidad mejorada en sujetos por lo demás sanos.

La **tabla 1** contiene datos que muestran las citocinas que se liberan a una velocidad significativamente más alta durante una incubación de 4 horas de PBMC con la construcción peptídica ramificada **28** en presencia de suero; que la construcción **28**, cuya estructura se ilustra en la figura **2B**, contenía la secuencia del péptido central HPSLK (SEQ ID NO: 3) (SynGia™6B). Entre estas citocinas se encuentran la IL-2, la IL-4, la IL-16, la IL-17, el TNF-β y el TIMP-2. Varias citocinas, en particular la IL-16, la IL-17, el TNF-β y el TIMP-2, muestran incrementos de más de dos sobre las muestras control no tratadas.

TABLA 1

Concentración relativa de citocinas tras la incubación de PBMC en suero con la construcción peptídica SynGia™6B que contiene la secuencia central HPSLK (SEQ ID NO:3)			
Citocina	HPSLK (SEQ ID NO:3)	Sin tratar	LPS
<u>Aumentada:</u>			
Eotaxina-2	562	194	221
ICAM-1	87	57	53
I-309	101	26	39
IL -2	131	86	80
IL -3	168	130	132
IL -4	64	30	49
IL -6	202	98	4375
IL -16	10	1	2
IL -17	27	5	11
TNF-β	117	38	95
TIMP-2	230	58	92
sTNF RI	83	42	58
sTNF RII	30	9	27
<u>Disminuida:</u>			
IL-1a	169	225	246
IL -13	105	138	126
IL -11	0	17	27
IL-12p40	17	108	46
IL-12p70	32	90	89

Como se muestra en el ejemplo en la **tabla 1**, el péptido estimuló la liberación de varias citocinas importantes. La IL-2 activa los linfocitos T, B y las células citolíticas naturales y se usa terapéuticamente. La IL-4 estimula la proliferación y la diferenciación de los linfocitos B e inhibe la producción de citocinas inflamatorias, tales como la IL-1, la IL-6 y el TNF-α, y debería atenuar la secreción del TNF-α a medida que el tratamiento continúa. Adicionalmente, la estimulación de la secreción del sTNF RI y el sTNF RII, las formas solubles del receptor del TNF-α, una citocina inflamatoria, debería mitigar sus efectos perjudiciales. Por lo tanto, puede producirse una respuesta inflamatoria al tratamiento con el péptido, aunque transitoria. La estimulación de la liberación de citocinas altamente inflamatorias, tales como la IL-1β y la IL-6, fue mínima. Por ejemplo, en el experimento mostrado en la **Tabla 1**, la liberación de IL-6 fue de 202 (unidades arbitrarias) en la muestra experimental, 98 en la muestra no tratada, pero 4.375 en la muestra tratada con LPS. La IL-16 es secretada por los linfocitos CD8 (+), es un ligando natural del CD4 y suprime la replicación del VIH. La IL-17 es producida por los linfocitos T CD4 activados (+), aumenta la expresión de ICAM-1, IL-6, IL-8 y G-CSF, y es un mediador de la angiogénesis.

Es de particular importancia el hecho de que el péptido no estimuló la liberación de IL-10, una citocina correlacionada con la supresión del sistema inmunológico TH1 en los individuos infectados por el VIH.

Este patrón de liberación de citocinas, con la indicación de la activación de macrófagos, ofrece la promesa real de que los péptidos de la presente invención serán particularmente adecuados para el tratamiento de infecciones por VIH y otras enfermedades infecciosas. En otras realizaciones de la invención se puede estimular la liberación de otras citocinas beneficiosas, tales como la IL-8 y la IL-15 por las PBMC. En una realización se pueden estimular, por ejemplo, las citocinas IL-8, IL-15, IL-16, RANTES o combinaciones de las mismas.

5 Por lo tanto, la mezcla de citocinas liberadas por las PBMC en respuesta a los péptidos descritos en la presente memoria debería proporcionar, de forma aislada o en combinación con otros tratamientos, una terapia efectiva contra las infecciones por el VIH. El tratamiento con los péptidos de la presente invención deberá inducir la activación de las células del sistema inmunológico *in vivo* y proporcionar una elevación endógena sostenida de citocinas beneficiosas, en contraste con la rápida desaparición de estas proteínas cuando se administran de forma exógena. Además, los péptidos de la presente invención también pueden estimular la liberación de TNF- α , un marcador de la activación de los macrófagos de tipo TH2. Aunque la IL-8 y el TNF- α son inflamatorios, su secreción es una función normal de la actividad de los monocitos/macrófagos y se puede calibrar por la cantidad de péptido administrado.

10 Otra aplicación importante de la presente invención puede ser el uso de los péptidos como los microbicidas, que son preparaciones que se pueden formular para la administración transmucosa, incluyendo, sin limitaciones, cremas, películas o supositorios que se pueden aplicar en diversas combinaciones dentro de la vagina o del recto para proteger contra infecciones de transmisión sexual, incluido el VIH. Entre las infecciones microbianas adecuadas para el tratamiento según la invención se incluyen, sin limitaciones, infecciones bacterianas, virales, por protozoos y fúngicas.

15 Además de su potencial terapéutico para el tratamiento, la tecnología de la presente invención se puede utilizar para otras aplicaciones, incluyendo la aplicación como un ensayo preliminar *in vitro* antes de la terapia. El sistema inmunológico de una persona infectada por el VIH aparentemente es incapaz de mantener una defensa a largo plazo contra la infección. Las causas de escape del virus del sistema inmunológico podría ser (1) el resultado de mutaciones en el genoma viral que hacen que el virus carezca de epítipo y, por lo tanto, no sea susceptible a la unión por un anticuerpo, o (2) las células fagocíticas que son responsables de la eliminación del complejo virus-anticuerpo son quiescentes. Para discriminar entre estas posibilidades, las muestras de sangre de un individuo infectado con un virus como el VIH podrían incubarse con y sin la adición de un péptido de la presente invención. En el primer caso, la actividad sinérgica de los péptidos no se logrará cuando los epítipos virales a los que se unen los anticuerpos no están presentes. Sin embargo, en este último caso, los péptidos podrían activar los fagocitos y lograr la eliminación del virus. De cualquier manera, de este modo se dispondría de los resultados para permitir la decisión de si proceder o no con el tratamiento y los resultados descritos en este documento demuestran la viabilidad de este ensayo.

Listado de secuencias

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Susavion Biosciences, Inc.
 <120> PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS Y DIAGNÓSTICOS
 <130> SUSA-12036
 10 <140> Sin asignar
 <141> 12-12-2007
 <150> 60/869.865
 15 <151> 13-12-2006
 <150> 60/974.056
 <151> 20-09-2007
 20 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 25 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia sintética
 <400> 1
Val Gly Gly Leu Ser
1 5
 35 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 2
 45 **Pro Ser Ser Asn Ala**
1 5
 <210> 3
 <211> 5
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 55 <400> 3
His Pro Ser Leu Lys
1 5

5
<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

10
<400> 4

His Pro Ser Leu Gly
1 5

15
<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 5

His Pro Ser Leu Leu
1 5

25
<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 6

His Pro Ser Leu Ala
1 5

35

40
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

45
<400> 7

Asn Pro Ser His Pro Leu Ser Gly
1 5

50
<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55
<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 8

Asn Pro Ser His Pro Ser Leu Gly
1 5

5 <210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia enlazadora
<400> 9

Gly Gly Gly Ser
1

15 <210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia enlazadora
<400> 10

25 **Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser**
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido terapéutico que consiste en una construcción y en al menos dos o más brazos, teniendo la construcción un marco central y consistiendo cada brazo en una secuencia unida al marco central a través de una secuencia enlazadora, en el que cada secuencia es la misma o diferente y se selecciona del grupo que consiste en: VGGGS (SEQ ID NO:1), PSSNA (SEQ ID NO:2), HPSLK (SEQ ID NO:3), HPSLG (SEQ ID NO:4), HPSLL (SEQ ID NO:5), HPSLA (SEQ ID NO:6), NPSHPLSG (SEQ ID NO:7) y NPSHPSLG (SEQ ID NO:8).
2. Un péptido terapéutico seleccionado del grupo que consiste en VGGGS (SEQ ID NO: 1), PSSNA (SEQ ID NO: 2), HPSLK (SEQ ID NO: 3), HPSLG (SEQ ID NO: 4), HPSLL (SEQ ID NO: 5), HPSLA (SEQ ID NO: 6), NPSHPLSG (SEQ ID NO: 7) y NPSHPSLG (SEQ ID NO: 8).
- 10 3. El péptido terapéutico de la reivindicación 1, en el que el marco central es un marco de tri-lisina y la secuencia enlazadora es GGGG (SEQ ID NO: 9) o GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10).
4. El péptido terapéutico de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende tres o cuatro brazos, consistiendo los brazos en la misma secuencia unida al marco central a través de la secuencia enlazadora, estando el péptido ramificado.
- 15 5. El péptido terapéutico de la reivindicación 1 o 4, en el que la secuencia es PSSNA (SEQ ID NO: 2) o HPSLK (SEQ ID NO: 3) y la secuencia enlazadora es GGGG (SEQ ID NO: 9) o GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10).
6. Una composición inmunoestimuladora que comprende un péptido terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 y un vehículo farmacéutico.
- 20 7. Uso del péptido terapéutico de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección microbiana, una infección viral o una enfermedad proliferativa celular.
8. Uso del péptido terapéutico de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana.
9. Uso del péptido terapéutico de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 25 10. Un péptido terapéutico de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 para su uso en el tratamiento de una infección microbiana, una infección viral o una enfermedad proliferativa celular.
11. Un péptido terapéutico de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 para su uso en el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana.
12. Un péptido terapéutico de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 para su uso en el tratamiento del cáncer.

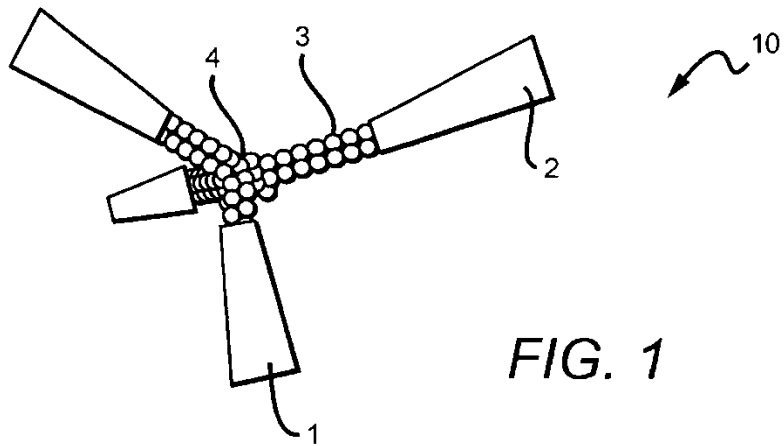


FIG. 1

FIG. 2A

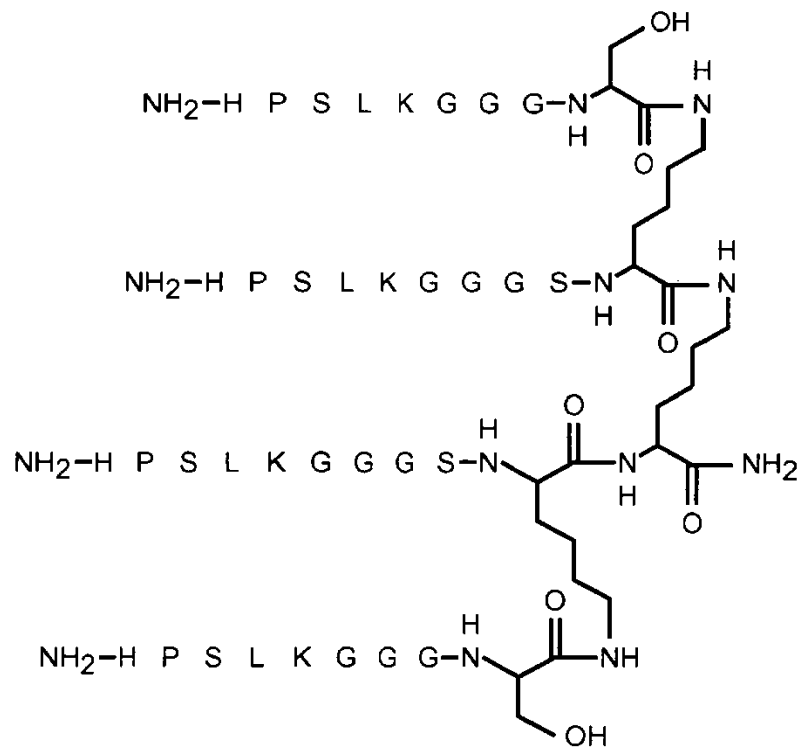
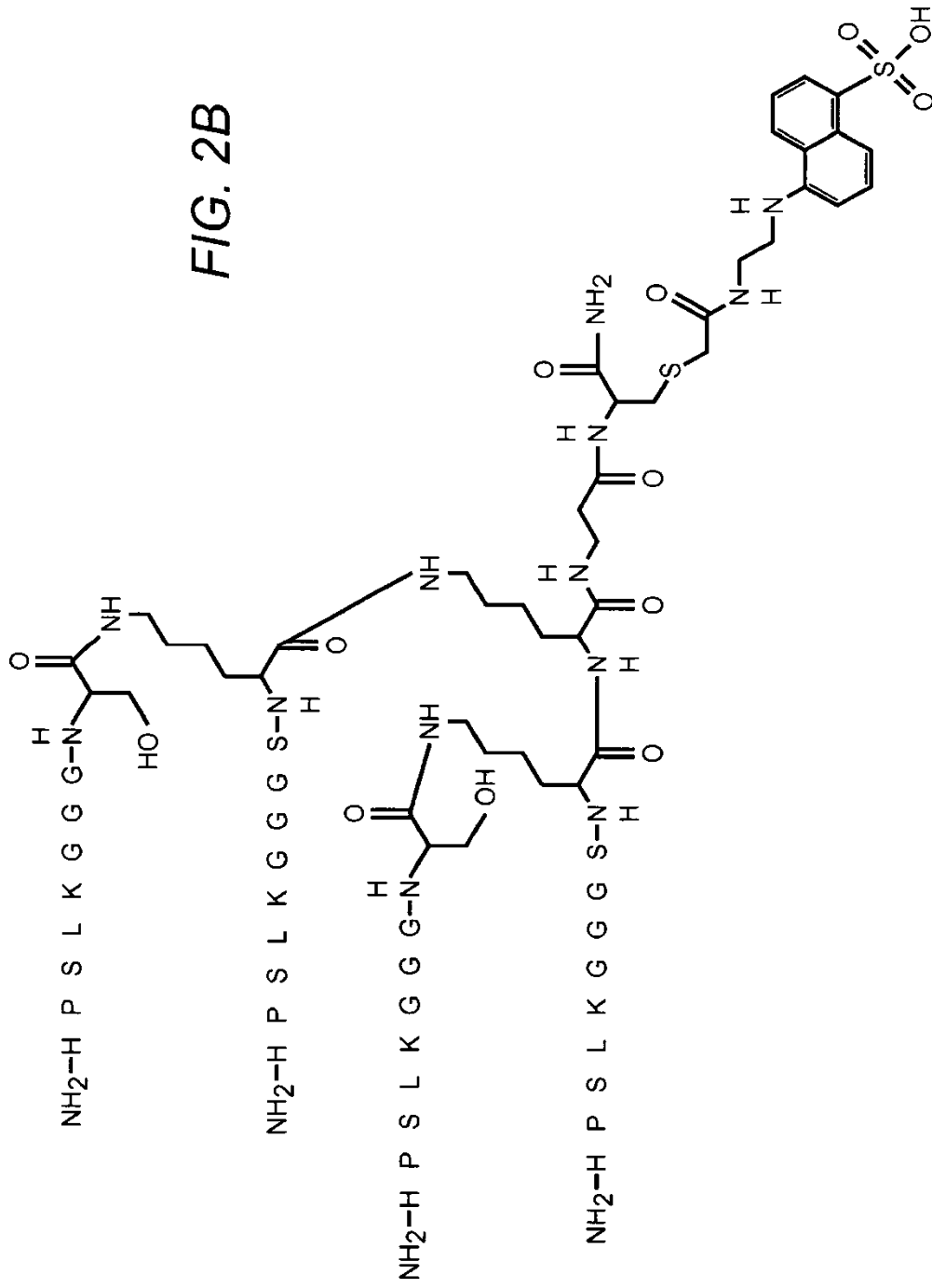


FIG. 2B



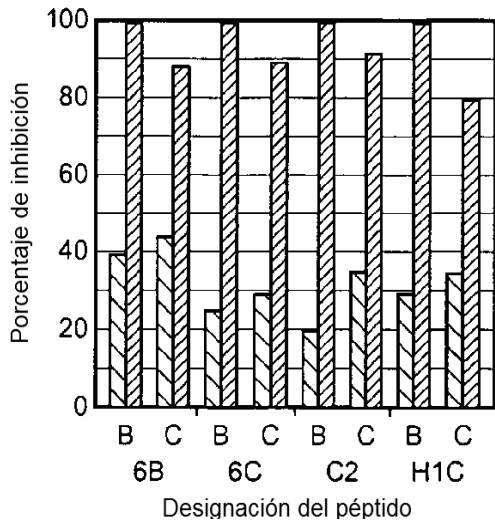
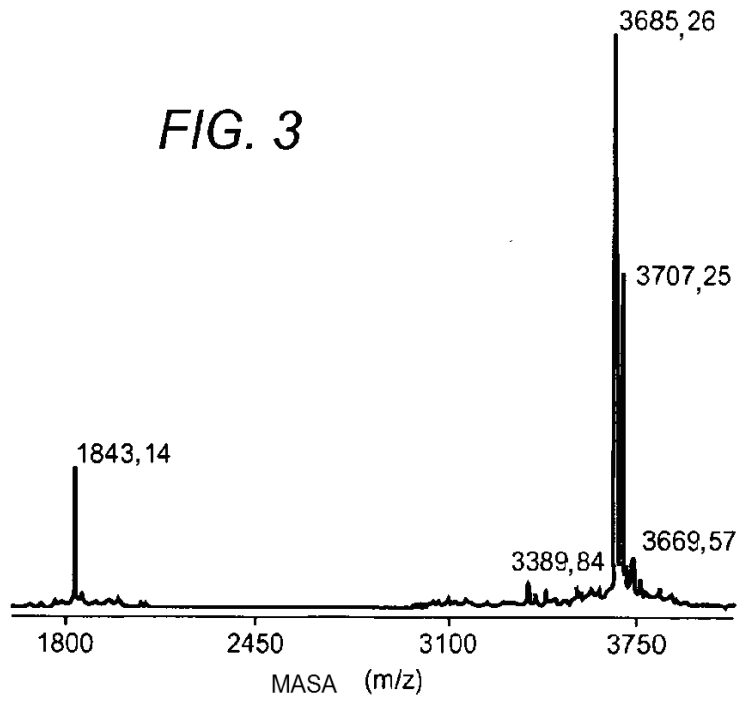


FIG. 5A

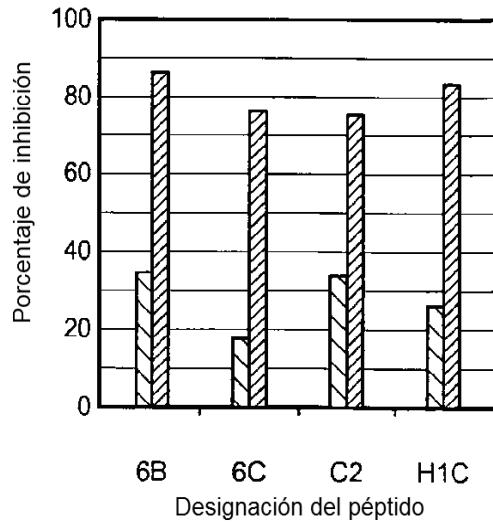


FIG. 5B

FIG. 4A

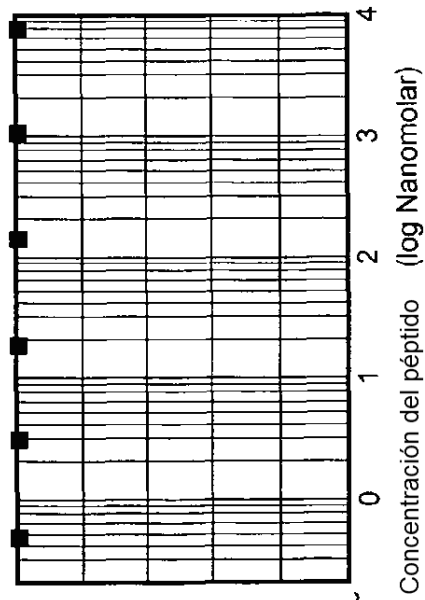


FIG. 4C

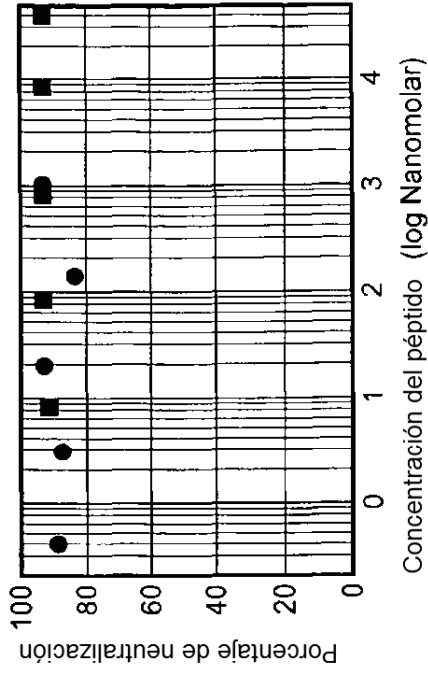


FIG. 4B

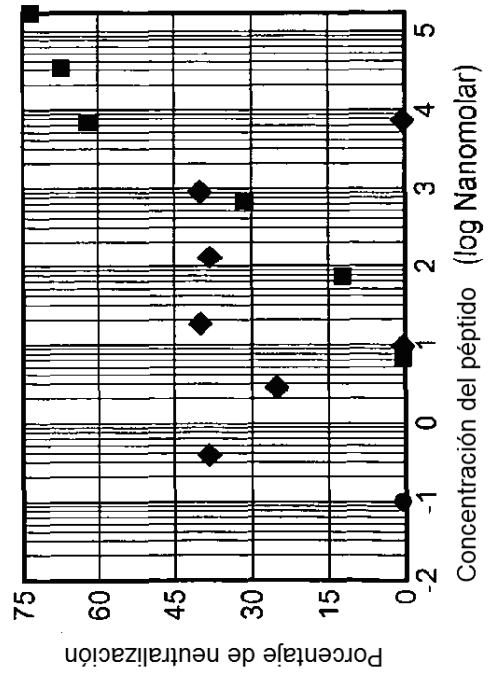


FIG. 4D

