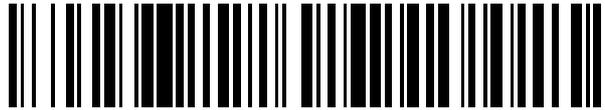


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 243**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2007.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2016 PCT/US2016/034956**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16196429**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2016 E 16804201 (8)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3302527**

54 Título: **Un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado modificado por ingeniería**

30 Prioridad:

**03.06.2015 US 201562170347 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.07.2020**

73 Titular/es:

**THE MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN, INC.  
(100.0%)  
8701 Watertown Plank Road  
Milwaukee, WI 53226, US**

72 Inventor/es:

**VOLKMAN, BRIAN, F.;  
GETSCHMAN, ANTHONY, E.;  
HWANG, SAM, T.;  
IMAI, YASUTOMO y  
PETERSON, FRANCIS, C.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 776 243 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**

Un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado modificado por ingeniería

**5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de patente de Estados Unidos N.º 62/170.347 presentada el 3 de junio de 2015.

**10 Declaración con respecto a la investigación o desarrollo con fondos federales**

La presente invención se realizó con apoyo del Gobierno con el AI058072, otorgado por el National Institute of Health. El gobierno posee determinados derechos sobre la presente invención.

**15 Campo de la invención**

La invención se refiere en general a un nuevo polipéptido de dímero CCL20 bloqueado, composiciones farmacéuticas del mismo, y al polipéptido de dímero CCL20 bloqueado para su uso en un método de tratamiento de psoriasis y otras enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.

**20 Antecedentes**

Las quimiocinas son una superfamilia de proteínas citocinas quimioatrayentes que sirven principalmente para regular una variedad de respuestas biológicas y promueven el reclutamiento y la migración de múltiples linajes de leucocitos y linfocitos a un tejido de órganos del cuerpo. Las quimiocinas se clasifican en cuatro familias según la posición relativa de los dos primeros restos de cisteína en la proteína. En una familia, las dos primeras cisteínas están separadas por un resto de aminoácido (las quimiocinas CXC) y en otra familia las dos primeras cisteínas son adyacentes (las quimiocinas CC). En una tercera familia, las dos primeras cisteínas están separadas por tres aminoácidos (quimiocinas CX<sub>3</sub>C). En una cuarta familia solo hay una cisteína en el extremo amino (quimiocinas C).

El par quimiocina-receptor de CCL20/CCR6 regula el tráfico de las células dendríticas y de linfocitos T a sitios de lesión o infección mediante el establecimiento de gradientes de concentración *in vivo* (Liao et al., 1999). Durante la respuesta inflamatoria general, las células linfoides secretan la quimiocina de ~ 8 kDa en la matriz extracelular donde se une y activa su único receptor acoplado a la proteína G transmembrana (GPCR), CCR6 expresado en la superficie de las células migratorias (Baba et al., 1997).

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que afecta al 2-3 % de la población mundial (Kurd y Gelfand, 2009) caracterizada por la infiltración de células Th17 en la piel en respuesta a lesiones o autoantígenos. Los linfocitos T, incluyendo aquellos con baja expresión del receptor de linfocitos T gamma-delta, son reclutados a la dermis y epidermis por varias quimiocinas, incluyendo CCL20. Junto con su receptor CCR6, CCL20 desempeña un papel crítico en el desarrollo de dermatitis psoriasiforme en modelos de ratón.

Los tratamientos actuales para la psoriasis que se dirigen a las citocinas de la vía Th17 y al factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pueden ser altamente eficaces en el tratamiento de seres humanos con psoriasis (Langley et al., 2014). Sin embargo, un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-CCL20 redujo la inflamación similar a la psoriasis, lo que sugiere que la inhibición del reclutamiento de linfocitos T mediada por CCL20/CCR6 también puede ser una estrategia terapéutica útil (Mabuchi et al., 2011).

Las quimiocinas ocupan sus receptores a través de una extensa interfaz proteína-proteína que abarca dominios en la superficie extracelular y un compartimento profundo dentro del dominio transmembrana (el sitio ortostérico) que está ocupado por el extremo N de la quimiocina (Kufareva et al., 2014). Las quimiocinas naturales son generalmente agonistas del GPCR completos y equilibrados que desencadenan respuestas celulares características, incluida la liberación de calcio intracelular desde el retículo endoplasmático y la migración celular. Los antagonistas de los receptores de quimiocinas, tales como moléculas pequeñas, péptidos o quimiocinas mutadas, generalmente bloquean la señalización de GPCR al prevenir la activación en el sitio ortostérico (Crump et al., 1997; Hassan et al., 2011; Rosenkilde et al., 2004).

Los agonistas parciales o sesgados de los receptores de quimiocinas se caracterizan por una pérdida selectiva de eficacia, tal como AOP-Rantes, que induce la señalización de calcio mediada por CCR5 pero carece de señalización promigratoria y ha alterado el reciclaje del receptor (Rodríguez-Frade et al., 1999). De manera adicional, Zadir y sus colegas demostraron que el agonismo sesgado de CCR7 por sus dos quimiocinas ligandos, CCL21 y CCL19, da como resultado diferentes patrones de reclutamiento de GPCR cinasa, pero no hay diferencia en la señalización  $G_{i/o}$  (Zidar et al., 2009). Si bien las modificaciones N-terminales pueden alterar las propiedades farmacológicas de una quimiocina al interrumpir los contactos del sitio ortostérico, la manipulación del estado oligomérico de la quimiocina también puede cambiar su perfil de señalización de maneras potencialmente útiles.

Las quimiocinas generalmente se unen y activan sus GPCR afines en el estado monomérico, pero la asociación es importante para la unión a los glucosaminoglicanos de la superficie celular y, por lo tanto, para la función *in vivo* de las quimiocinas (Campanella et al., 2006). Los miembros de las subfamilias de quimiocinas CXC y CC generalmente adoptan distintas estructuras cuaternarias que utilizan bien la cadena  $\beta$ 1 (CXC) o restos cerca del extremo N (CC) para la interfaz del dímero (Jansma et al., 2009). Los cambios en el estado oligomérico de una quimiocina pueden alterar la unión del receptor, la activación y la señalización cadena abajo. La dimerización de la mayoría de las quimiocinas CC ocluye los epítomos clave de unión al receptor, haciéndolas no funcionales como ligandos de GPCR (Tan et al., 2013). Sin embargo, algunas quimiocinas CXC que se han modificado para ser constitutivamente dimerizadas son competentes para unirse a sus receptores y pueden funcionar como agonistas e inhibidores parciales (Veldkamp et al., 2008). Entre las quimiocinas CC para las que se han resuelto las estructuras, CCL20 es única en el sentido de que adoptó un dímero tipo CXC en dos estructuras cristalinas de alta resolución sin evidencia del dímero CC canónico (Hoover et al., 2002; Malik y Tack, 2006).

En consecuencia, existe una necesidad actual de agentes farmacéuticos y métodos de tratamiento rentables para tratar la psoriasis y otros trastornos autoinmunitarios o inflamatorios.

### Sumario de la invención

Los inventores han modificado por ingeniería un nuevo polipéptido de dímero CCL20 bloqueado que comprende dos monómeros unidos entre sí. En particular, la invención proporciona un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado, en donde el dímero comprende dos monómeros unidos covalentemente entre sí, en donde los dos monómeros tienen cada uno la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1. El dímero es útil en el tratamiento de diversas afecciones que incluyen cáncer, trastornos autoinmunitarios y trastornos de inflamación.

La SEQ ID NO: 1 tiene la secuencia de aminoácidos ASNFDCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSV-CANPKQTWVKYIVR LLCKKVKNM. La secuencia de CCL20TS está disponible públicamente.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[Eliminado]

[Eliminado]

En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno antiinmunitario en un sujeto.

En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno inflamatorio en un sujeto.

En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención, un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable y material de instrucción.

### Breve descripción de las figuras

El presente documento contiene al menos un dibujo realizado a color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

**Figura 1A.** Una CCL20 unida por disulfuro es un dímero establemente plegado. La secuencia de aminoácidos de CCL20 con enlaces disulfuro naturales (cian) y no naturales (rojo) resaltados.

**Figura 1B.** Un modelo de CCL20S64C que muestra la conformación del dímero CXC (cadena  $\beta$ ) y el enlace disulfuro intermolecular (rojo) en la posición 64.

**Figura 1C.** Se inyectaron conjuntamente CCL20TS y CCL20S64C en una HPLC de fase inversa C18 y se espaciaron los tiempos de elución en  $\sim 5$  minutos.

**Figura 1D.** Análisis de espectrometría de masas de CCL20S64C (Masa esperada = 16080,4 kDa).

**Figura 1E.** Superposición de espectros de coherencia cuántica simple heteronuclear de CCL20TS (naranja) y CCL20S64C (azul).

**Figura 1F.** SDS-PAGE de CCL20TS y CCL20S64C en presencia y ausencia de un agente reductor,  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Figura 2A.** CCL20 S64C es un ligando específico de CCR6 que bloquea la migración celular dependiente de CCL20TS y hBD2. El flujo de calcio en células Jurkat CCR6<sup>+</sup> se midió en respuesta a CCL20TS ( $CE_{50} = 76 \pm 11$  nM) y CCL20S64C ( $CE_{50} = 700 \pm 72$  nM). Los puntos de datos son la media  $\pm$  EEM de seis réplicas en dos días separados.

**Figura 2B.** Migración de células Jurkat CCR6<sup>+</sup> medida en respuesta a cantidades crecientes de CCL20TS ( $CE_{50} \sim 15$  nM) y CCL20S64C. Los puntos de datos son la media  $\pm$  EEM de cuatro réplicas en dos días separados.

**Figura 2C.** Inhibición de la migración de células Jurkat CCR6<sup>+</sup> por CCL20S64C en presencia de CCL20TS 30 nM.

Los puntos de datos son la media  $\pm$  EEM de cuatro réplicas en dos días separados.

**Figura 2D.** Medición de la inhibición por CCL20 S64C de la migración de células Jurkat CCR6<sup>+</sup> dependientes de hBD2 (100 nM). Los puntos de datos son la media  $\pm$  EEM de cuatro réplicas en dos días separados.

**Figura 2E.** Inhibición por CCL20S64C de la migración de células THP-1 dependiente de CCL2TS (1 nM) o CXCL12TS (10 nM). Los puntos de datos son la media  $\pm$  EEM de cuatro réplicas de dos días separados.

**Figura 3A.** El dímero CCL20 bloqueado es un agente terapéutico preventivo para la psoriasis inducida por IL-23. Curso temporal de la hinchazón de la oreja. Los ratones fueron inyectados cada dos días con IL-23 sola o administrada conjuntamente con CCL20TS o CCL20S64C. Se trazan los valores de la hinchazón de la oreja, las diferencias en el grosor de la oreja desde el día 0 en cada punto de tiempo. Los datos se expresan como medias  $\pm$  EEM (n = 6). \*P < 0,05. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.

**Figura 3B.** Después del tratamiento con IL-23 sola o administrada conjuntamente con CCL20TS o CCL20S64C durante 6 días, se tomaron muestras de las pieles y las muestras de piel se tiñeron con hematoxilina y eosina. Barra = 100  $\mu$ m. Los datos son representativos de al menos tres ratones. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

**Figura 3C.** Las suspensiones de células epidérmicas de cada oreja de ratón se tiñeron con AcM contra  $\gamma\delta$ -TCR para citometría de flujo. Los números indican la proporción de dispersión lateral de linfocitos T<sup>med $\delta$ low</sup>GDL. Se muestra un resultado representativo. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

**Figura 3D.** Se contaron los números totales de linfocitos T GDL por oreja de cada grupo. Los datos se expresan como medias  $\pm$  EEM (n = 3). \*P < 0,05 frente a grupos con IL-23 sola. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.

**Figura 3E.** Las suspensiones de células epidérmicas de cada oreja de ratón se procesaron para la extracción de ARN para PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR).

**Figura 3F.** Los factores de cambio se calcularon para ARNm *Il17a* y *Il22* normalizados para ARNm de *Gapdh* frente a la piel de control no tratada. Los datos se expresan como medias  $\pm$  EEM (n = 3). \*P < 0,05 frente a grupos con IL-23 sola. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.

**Figura 4A.** La estructura cristalina de CCL20 S64C muestra una conformación de dímero de CXC. Se observan dos monómeros de CCL20 en la unidad cristalina asimétrica y cada hélice  $\alpha$  está conectada a través de un enlace disulfuro intermolecular.

**Figura 4B.** La estructura cristalina que muestra la densidad electrónica completa (malla gris) se observa en toda la longitud del enlace disulfuro no natural.

**Figura 4C.** La estructura cristalina que muestra las interacciones del péptido de la cadena principal estabiliza la interfaz del dímero de tipo  $\beta 1$ - $\beta 1$  CXC primario que forma la lámina  $\beta$ .

**Figura 4D.** La estructura cristalina que representa los epítopos de unión al receptor se conserva estructuralmente entre la estructura de monómero de CCL20 (código PDB: 2JYO) (púrpura) y el dímero CCL20 bloqueado (trigo).

**Figura 5A.** Gráfico que representa la caracterización bioquímica de la activación por CCL20 S64C de CCR6. La unión de las proteínas CCL20 se observó mediante el desplazamiento <sup>125</sup>I\_CCL20 TS de las células COS-7 CCR6<sup>+</sup> transfectadas. El valor de K<sub>d</sub> para la unión de CCL20 TS y S64C a CCR6 se calculó como 7,6 nM y 74,4 nM, respectivamente, a partir del valor del logCE<sub>50</sub> correspondiente de -8,12 [-8,542, -7,698] y -7,128 [-7,245, -7,012],

**Figura 5B.** Gráfico que muestra que la administración de CCL20 TS y S64C en células Jurkat CCR6<sup>+</sup> promovió la liberación intracelular de calcio con valores de EC<sub>50</sub> de 75,0 nM y 715,3 nM, respectivamente, a partir de los valores del logCE<sub>50</sub> de -7,125 [-7,251, -6,999] y -6,145 [-6,234, -6,057],

**Figura 5C.** El gráfico que muestra la acumulación de <sup>3</sup>H-IP<sub>3</sub> se determinó mediante mediciones radioactivas en células COS-7 CCR6<sup>+</sup> transfectadas en respuesta a CCL20 TS y S64C con valores de CE<sub>50</sub> resultantes de 0,4 nM y 41,3 nM, respectivamente, a partir de los valores del logCE<sub>50</sub> de -9,368 [-9,903, -8,833] y -7,384 [-7,625, -7,144],

**Figura 5D.** El tratamiento dependiente de la dosis de células U2OS con CCL20 TS y S64C promovió el reclutamiento con  $\beta$ -arrestina-2 de CCR6 con valores de CE<sub>50</sub> de 1,1 nM y 86,2 nM, respectivamente, a partir de los valores del logCE<sub>50</sub> de -8,954 [-9,349, -8,558] y -7,065 [-7,419, -6,711], (e) El tratamiento con CCL20 S64C no redujo la expresión de la superficie celular de CCR6 (\* P < 0,05).

## 50 Descripción detallada de la invención

### I. EN GENERAL

[Eliminado]

Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una" y "el/la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, los términos "un" (o "uno/una"), "uno/a o más" y "al menos uno/a" se pueden usar indistintamente en el presente documento. También debe entenderse que los términos "que comprende/n", "que incluye/n" y "que tiene/n" se pueden usar indistintamente.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que el experto en la materia a la que pertenece la presente invención entiende comúnmente. Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las referencias citadas en la presente memoria descriptiva deben tomarse como indicativas del nivel de habilidad en la

técnica. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de una invención anterior.

## II. LA INVENCION

5 **Polipéptido de Dímero CCL20 bloqueado.** En una realización, la invención proporciona un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado, en donde el dímero comprende dos monómeros unidos covalentemente entre sí, en donde los dos monómeros tienen cada uno la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1. Ambos monómeros tienen la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

10 Por "bloqueado" queremos decir que los componentes monoméricos del polipéptido están unidos entre sí a través de al menos un enlace covalente. Las expresiones "bloqueado", "ligado", "unido" y "unidos covalentemente" o "ligados covalentemente" se usan indistintamente, y se usan para indicar la unión covalente de los componentes monoméricos para formar el dímero. Un enlace covalente preferido es un enlace disulfuro. Las formas de monómero y dímero no se interconvierten. En una realización preferida, S64 se reemplaza con restos de cisteína para crear al menos un enlace disulfuro intermolecular simétrico entre hélices  $\alpha$  opuestas. Las expresiones "dímero CCL20 bloqueado" y "polipéptido de dímero CCL20 bloqueado" se usan indistintamente en el presente documento.

20 [Eliminado]

[Eliminado]

Los métodos adicionales para fabricar dímeros bloqueados de CCL20 también podrían incluir otros tipos de ligamientos covalentes además de enlaces disulfuro que incluyen, pero sin limitación, reactivos químicos de reticulación.

25 En una realización preferida, el dímero bloqueado de la presente invención comprende una preparación sustancialmente pura. Por "sustancialmente pura" nos referimos a una preparación en la que más del 90 %, por ejemplo, el 95 %, el 98 % o el 99 % de la preparación es la del dímero bloqueado.

30 [Eliminado]

El dímero CCL20 bloqueado también podría incorporarse en una proteína más grande o fijarse a una proteína de fusión que puede funcionar para aumentar la semivida del dímero *in vivo* o usarse como un mecanismo de liberación gradual y/o suministro local (solicitud de patente de EE. UU. N.º 20060088510).

35 En otra realización, la invención proporciona un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado como se describe anteriormente. Por "aislado" los presentes inventores se refrieren a una secuencia del ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos un componente o contaminante con el que se asocia habitualmente. El ácido nucleico aislado está presente en una forma o situación diferente de aquella en que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los ácidos nucleicos no aislados tales como ADN y ARN se encuentran en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula hospedadora cerca de genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con otros numerosos ARNm que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, un ácido nucleico aislado que codifica una proteína dada incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en las células que normalmente expresan la proteína dada donde el ácido nucleico se encuentra en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales, o está flanqueado, de otra manera, por una secuencia del ácido nucleico diferente de la encontrada en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando se va a utilizar un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la cadena en sentido o codificante (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener ambas cadenas en sentido y antisentido (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser bicatenario).

40 El polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la presente invención puede prepararse mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica. El componente peptídico de CCL20 está compuesto, al menos en parte, de un péptido, que puede sintetizarse utilizando técnicas convencionales como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant, G. A. (ed.). Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Están disponibles comercialmente sintetizadores peptídicos automatizados (por ejemplo, Advanced ChemTech Modelo 396; Milligen/Biosearch 9600). De manera adicional, uno o más grupos moduladores pueden fijarse mediante métodos convencionales, tal como mediante el uso de métodos para la reacción a través de un grupo amino (por ejemplo, el grupo alfa-amino en el extremo amino de un péptido), un grupo carboxilo (por ejemplo, en el extremo carboxi de un péptido), un grupo hidroxilo (por ejemplo, en un resto de tirosina, serina o treonina) u otro grupo reactivo adecuado en una cadena lateral de aminoácidos (véase, por ejemplo, Greene, T. W. y Wuts, P. G. M. Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York (1991)).

65 Los péptidos de la invención pueden sintetizarse químicamente usando técnicas convencionales como las descritas

en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant, G. A. (ed.). Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, Nueva York, (1992)

5 En otro aspecto de la invención, los péptidos pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales de ADN recombinante usando una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido. Una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido puede determinarse usando el código genético y puede sintetizarse una molécula oligonucleotídica que tiene esta secuencia de nucleótidos mediante métodos de síntesis de ADN convencionales (por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado). Alternativamente, una molécula de ADN que codifica un compuesto peptídico puede derivar del gen de la proteína precursora natural o ADNc (por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o la digestión con enzimas de restricción) de acuerdo con las técnicas convencionales de biología molecular.

15 En otras realizaciones de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento. También se proporcionan células hospedadoras que comprenden cualquiera de estos vectores. A modo de ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células CHO, *E. coli*, células SP9 de insecto o levadura. Además, se proporciona un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento y comprende cultivar células hospedadoras que comprenden un vector que codifica el polipéptido en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

20 **Composiciones Farmacéuticas de Polipéptido de Dímero CCL20 Bloqueado.** En otra realización, la invención proporciona una composición sustancialmente pura que comprende un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención y un transportador farmacéuticamente aceptable. Por "transportador farmacéuticamente aceptable" los presentes inventores se refieren a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. En una realización, el transportador puede ser adecuado para administración parenteral. Alternativamente, el transportador puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual u oral. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

35 Generalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, nanopartícula de membrana u otra estructura ordenada adecuada para altas concentraciones de fármacos. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, tal como, sales de monoestearato y gelatina.

45 Por otra parte, el polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la presente invención se puede administrar en una formulación de liberación gradual, tal como en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con transportadores que protegerán al compuesto contra su rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros polilácticos, poliglicólicos (PLG). Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia.

55 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (por ejemplo, antagonista de CXCR4) en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y criodesecado, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizado por filtración. El polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la presente invención también puede formularse con uno o más compuestos adicionales que potencian la solubilidad del polipéptido de dímero CCL20 bloqueado.

65 **Administración.** El polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la presente invención, que comprende opcionalmente

5 otros compuestos farmacéuticamente activos, puede administrarse a un paciente por vía oral, rectal, parenteral, (por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea) intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravesical, local (por ejemplo, polvos, pomadas o gotas) o como un aerosol bucal o nasal. Otras formulaciones contempladas incluyen nanopartículas proyectadas, preparaciones liposómicas, eritrocitos rebloqueados que contienen el principio activo y formulaciones de base inmunitaria.

10 La administración parenteral de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la ruptura física de un tejido de un ser humano y la administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido. La administración parenteral incluye, por lo tanto, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, la administración parenteral incluye inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular o intraesternal y técnicas de infusión intravenosa, intraarterial o de diálisis renal.

15 Las composiciones adecuadas para inyección parenteral comprenden el dímero CCL20 bloqueado de la invención combinado con un transportador farmacéuticamente aceptable tal como soluciones acuosas o no acuosas estériles, dispersiones, suspensiones o emulsiones fisiológicamente aceptables, o pueden comprender polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de transportadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, solución salina isotónica, etanol, polioles (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas adecuadas de los mismos, triglicéridos, incluyendo aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. Dichas formulaciones pueden prepararse, envasarse o venderse en una forma adecuada para administración en bolo o para administración continua. Las formulaciones inyectables pueden prepararse, envasarse o venderse en forma de dosis unitaria, tal como en ampollas, en envases multidosis que contienen un conservante, o en dispositivos de un solo uso para autoinyección o inyección por parte de un médico.

30 Las formulaciones líquidas para la administración parenteral incluyen suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones de liberación sostenida o biodegradables implantables. Dichas formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales que incluyen agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una realización de una formulación para administración parenteral, el polipéptido de dímero CCL20 bloqueado se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o venderse en forma de una suspensión o solución acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión o solución puede formularse de acuerdo con la técnica conocida. Dichas formulaciones inyectables estériles se pueden preparar usando un diluyente y/o disolvente no tóxico aceptable para vía parenteral, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónica y/o aceites fijados tales como mono o di-glicéridos sintéticos. Otras formulaciones administrables de forma parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación lisosómica o como un componente de un sistema de polímeros biodegradables. Las composiciones para la liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble y una sal soluble en pequeñas cantidades.

50 El polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la presente invención también puede contener adyuvantes tal como agentes de suspensión, conservación, humectación, emulsión y/o dispersión, incluyendo, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de las composiciones farmacéuticas inyectables se puede lograr mediante el uso de agentes capaces de retrasar la absorción, tales como monoestearato de aluminio y/o gelatina.

55 Las formas de dosificación pueden incluir implantes o depósitos sólidos o inyectables. En realizaciones preferidas, el implante comprende una cantidad eficaz del polipéptido dímero  $\alpha_2$  bloqueado y un polímero biodegradable. En realizaciones preferidas, un polímero biodegradable adecuado puede seleccionarse del grupo que consiste en poliaspartato, poliglutamato, poli (L-lactida), un poli (D, L-lactida), un poli (lactida-co-glicólido), una poli ( $\epsilon$ -caprolactona), un polianhídrido, un poli (beta-hidroxi butirato), un poli (orto éster) y un polifosfaceno. En otras realizaciones, el implante comprende una cantidad eficaz del polipéptido de dímero CCL20 bloqueado y un polímero silástico. El implante proporciona la liberación de una cantidad eficaz de polipéptido de dímero CCL20 bloqueado durante un período prolongado que varía de aproximadamente una semana a varios años.

65 Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el polipéptido de dímero CCL20 bloqueado se mezcla con al menos un excipiente (o transportador) inerte habitual, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico o (a) rellenos o extensores, como, por

ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, manitol o ácido silícico; (b) aglutinantes, como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa o goma arábiga; (c) humectantes, como, por ejemplo, glicerol; (d) agentes disgregantes, como, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, determinados silicatos complejos o carbonato de sodio; (e) retardadores de solución, como, por ejemplo, parafina; (f) aceleradores de la absorción, como, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes, como, por ejemplo, alcohol cetílico o monoestearato de glicerol; (h) adsorbentes, como, por ejemplo, caolín o betonita; y/o (i) lubricantes, como, por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas y comprimidos, las formas farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes.

Un comprimido que comprende el principio activo puede, por ejemplo, prepararse comprimiendo o moldeando el principio activo, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Los comprimidos que se han comprimido se pueden preparar comprimiendo, en un dispositivo adecuado, el principio activo en una forma de flujo libre tal como preparación en polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con uno o más de un aglutinante, un lubricante, un excipiente, un agente tensioactivo y un agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando, en un dispositivo adecuado, una mezcla del principio activo, un transportador farmacéuticamente aceptable y al menos líquido suficiente para humedecer la mezcla.

Los comprimidos pueden fabricarse con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes de granulación y disgregación, agentes aglutinantes y agentes lubricantes. Los agentes dispersantes conocidos incluyen almidón de patata y almidón glicolato de sodio. Los agentes tensioactivos conocidos incluyen lauril sulfato de sodio. Los diluyentes conocidos incluyen carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio, hidrogenofosfato de calcio y fosfato de sodio. Los agentes de granulación y disgregación conocidos incluyen almidón de maíz y ácido alginico. Los agentes aglutinantes conocidos incluyen gelatina, goma arábiga, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona e hidroxipropil metilcelulosa. Los agentes lubricantes incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, sílice y talco.

Los comprimidos pueden estar no recubiertos o recubrirse usando métodos conocidos para lograr la disgregación retardada en el tracto gastrointestinal de un ser humano, proporcionando de este modo una liberación sostenida o la absorción del principio activo. A modo de ejemplo, se puede usar un material tal como monoestearato de glicerilo y/o diestearato de glicerilo para recubrir los comprimidos. Además, a modo de ejemplo, los comprimidos pueden recubrirse usando los métodos descritos en las Patentes de EE.UU. N.º 4.256.108; 4.160.452; y 4.265.874 para formar comprimidos de liberación osmóticamente controlada. Los comprimidos pueden comprender adicionalmente un agente edulcorante, un agente aromatizante, un agente colorante, un conservante o alguna combinación de estos con el fin de proporcionar una preparación farmacéuticamente elegante y apetitosa.

Se pueden preparar formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, grageas, cápsulas y gránulos con recubrimientos o cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica. También pueden contener agentes opacificantes, y también pueden ser de tal composición que liberen el compuesto o compuestos activos de manera retardada. Ejemplos de composiciones inclusorias que pueden usarse son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente mencionados.

También pueden usarse composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina de relleno blando o duro usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las cápsulas duras que comprenden el principio activo pueden prepararse usando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Dichas cápsulas duras comprenden el principio activo, y pueden comprender además ingredientes adicionales que incluyen, por ejemplo, un diluyente sólido inerte tal como carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. Las cápsulas de gelatina blandas que comprenden el principio activo pueden prepararse usando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Dichas cápsulas blandas comprenden el principio activo, que se puede mezclar con agua o un medio oleoso como el aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

**Requisitos de Dosis.** En realizaciones particulares, un intervalo preferido para cantidades terapéuticamente o profilácticamente eficaces de polipéptido de dímero CCL20 bloqueado puede ser 0,1 nM-0,1M, particularmente 0,1 nM-0,05M, más particularmente 0,05 nM-15 mM y lo más particularmente 0,01 nM-10 mM. Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar, especialmente con la esclerosis múltiple. Además, hay que entender que, para cualquier sujeto concreto, deben ajustarse las pautas posológicas específicas con el paso del tiempo según las necesidades del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

La cantidad de polipéptido de dímero CCL20 bloqueado en la composición puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las

exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosis unitaria de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr y de (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos como el compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

**El polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención para su uso en métodos.** La invención también proporciona los métodos correspondientes, incluyendo los métodos de tratamiento médico, en los que una dosis terapéuticamente eficaz de un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención, se administra en una formulación farmacológicamente aceptable. En consecuencia, la invención también proporciona composiciones terapéuticas que comprenden un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención y un excipiente o transportador farmacológicamente aceptable, tal como se describe anteriormente. La composición terapéutica puede ser ventajosamente soluble en una solución acuosa a un pH fisiológicamente aceptable.

En una realización, la invención proporciona un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención para su uso en un método para tratar psoriasis, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener psoriasis.

Por "psoriasis" o "psoriasis vulgar" nos referimos a la enfermedad sistémica mediada por el sistema inmunitario común, crónica, recurrente o remitente, caracterizada por lesiones cutáneas que incluyen parches rojos, escamosos, pápulas y placas, que generalmente pican. Las lesiones cutáneas observadas en la psoriasis pueden variar en gravedad desde parches localizados menores hasta completar la cobertura corporal. Los cinco tipos principales de psoriasis son en placas, guttata, inversa, pustulosa, y eritrodérmica. La psoriasis en placas, la forma más común, generalmente se manifiesta como parches escamosos rojos y blancos en la capa superior de la piel. Las células de la piel se acumulan rápidamente en estos sitios de placa y crean una apariencia blanca plateada.

En una realización, la invención proporciona un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención para su uso en un método para tratar enfermedades inflamatorias, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad inflamatoria. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado.

Por "enfermedad inflamatoria" los presentes inventores se refieren a cualquier afección crónica o aguda causada por inflamación, incluyendo, por ejemplo, eccema, periodontitis, aterosclerosis y artritis reumatoide. Por "inflamación" los presentes inventores se refieren a la respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares a estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas o irritantes. Es un intento de protección por parte del organismo para eliminar los estímulos nocivos, así como para iniciar el proceso de curación del tejido. Por ejemplo, la composición y los métodos de la presente invención pueden utilizarse para tratar la inflamación asociada con una enfermedad alérgica tal como asma, ronchas, urticaria, alergia al polen, alergia a los ácaros del polvo, alergia al veneno, alergia a los cosméticos, alergia al látex, alergia química, alergia a fármacos, alergia a las picaduras de insectos, alergia a la caspa animal, alergia a plantas punzantes, alergia a la hiedra venenosa y alergia alimentaria; una enfermedad neurodegenerativa; una enfermedad cardiovascular; una enfermedad gastrointestinal; choque séptico; choque anafiláctico; síndrome de choque tóxico; caquexia; necrosis; gangrena; menstruación; una úlcera tal como una úlcera de la piel, una úlcera por presión, una úlcera gástrica, una úlcera péptica, una úlcera bucal, una úlcera nasofaríngea, una úlcera esofágica, una úlcera duodenal y una úlcera gastrointestinal; una lesión como una abrasión, un moretón, un corte, una herida punzante, una laceración, una herida por impacto, una conmoción cerebral, una contusión, una quemadura térmica, congelación, una quemadura química, una quemadura solar, una desecación, una quemadura por radiación, una quemadura por radiactividad, inhalación de humo, un músculo desgarrado, una distensión muscular, un tendón desgarrado, una distensión de tendón, una distensión de ligamento, un ligamento desgarrado, una hiperextensión, un cartílago desgarrado, una fractura ósea, un nervio pellizcado y una herida de bala; una inflamación musculoesquelética tal como una inflamación muscular, miositis, una inflamación de tendón, tendinitis, inflamación de ligamento, inflamación del cartílago, inflamación de las articulaciones, inflamación sinovial, síndrome del túnel carpiano e inflamación ósea. CCL20 ha estado implicado en una variedad de cánceres y está particularmente involucrado en el desarrollo del cáncer colorrectal.

En una realización, la invención proporciona un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad autoinmunitaria. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado.

Por "enfermedad autoinmunitaria" los presentes inventores se refieren a enfermedades generalmente entendidas como causadas por la sobreproducción de citocinas, linfotóxicas y anticuerpos por los glóbulos blancos, incluidos en concreto los linfocitos T. Dichas enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, Esclerosis Múltiple (EM), síndrome de Guillain-Barre, Esclerosis Lateral Amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, Diabetes tipo I, gota, lupus y cualquier otra enfermedad humana en la que los linfocitos T desempeñan un papel importante, tal como rechazo de injerto de tejido. Además, las enfermedades que implican la degradación de la matriz extracelular incluyen, pero sin limitación, artritis psoriásica, artritis juvenil, artritis temprana, artritis reactiva, osteoartritis, espondilitis anquilosante, osteoporosis, enfermedades de los músculos esqueléticos como tendinitis y enfermedad periodontal, metástasis cancerosa, enfermedades de las vías aéreas (EPOC, asma u otras enfermedades reactivas de las vías aéreas), fibrosis renal y hepática, enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis e insuficiencia cardíaca, y enfermedades neurológicas como la neuroinflamación y la esclerosis múltiple. Las enfermedades que implican principalmente la degeneración articular incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis juvenil, artritis temprana, artritis reactiva, osteoartritis, espondilitis anquilosante. Las enfermedades que implican el ojo incluyen, pero sin limitación, uveítis autoinmunitaria y uveoconjuntivitis y síndrome del ojo seco. Enfermedades que implican complicaciones posteriores a infecciones de enfermedades virales o bacterianas tal como glomerulonefritis, vasculitis, meningoencefalitis. Las enfermedades que implican el sistema gastrointestinal incluyen, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias del intestino.

Por "sujeto" los presentes inventores se refieren a mamíferos y no mamíferos. "Mamíferos" significa cualquier miembro de la clase de los Mammalia incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos, tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja, tales como vacas, caballos, ovejas, cabras y cerdos; animales domésticos, tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratas, ratones y cobayas; y similares. Los ejemplos de animales que no son mamíferos incluyen, pero sin limitación, aves, peces y similares. El término "sujeto" no indica una edad o género en particular.

Por "tratar" los presentes inventores se refieren a la gestión y el cuidado de un sujeto con el fin de combatir la enfermedad, afección o trastorno. Los términos abarcan tratamientos tanto preventivos, es decir, profilácticos como paliativos. Tratar incluye la administración de un compuesto de la presente invención para prevenir, mitigar y/o mejorar la aparición de los síntomas o complicaciones, aliviar los síntomas o complicaciones o eliminar la enfermedad, afección o trastorno.

Por "mitigar", "mejoría", "mejora" o similares, los presentes inventores se refieren a una mejora detectable o un cambio detectable consistente con la mejora que se produce en un sujeto o en al menos una minoría de sujetos, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 2 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 %, el 100 %, o en un intervalo aproximadamente entre cualquiera de estos dos valores. Dicha mejora o cambio se puede observar en sujetos tratados en comparación con sujetos no tratados con el dímero bloqueado de la presente invención, donde los sujetos no tratados tienen, o son susceptibles de desarrollar, la misma o similar enfermedad, afección, síntoma o similar. La mejoría de una enfermedad, afección, síntoma o parámetro de ensayo puede determinarse subjetiva u objetivamente, por ejemplo, por la autoevaluación por un sujeto o sujetos, mediante la evaluación de un médico o mediante la realización de un ensayo o medición adecuada, incluyendo, por ejemplo, una evaluación de la calidad de vida, una progresión lenta de una o más enfermedades o afecciones, una gravedad reducida de una o más enfermedades o afecciones, o uno o más ensayos adecuados para el nivel o actividad o actividades de una o más biomoléculas, células o mediante la detección de migración celular dentro de un sujeto. La mejoría puede ser transitoria, prolongada o permanente, o puede ser variable en momentos relevantes durante o después de administrar el dímero bloqueado de la presente invención a un sujeto, o se usa en un ensayo u otro método descrito en el presente documento o una referencia citada, por ejemplo, dentro de aproximadamente 1 hora de la administración o uso del dímero bloqueado de la presente invención a aproximadamente 3, 6, 9 meses o más después de que un sujeto o sujetos hayan recibido el dímero bloqueado de la presente invención.

Por "modulación" de, por ejemplo, un síntoma, nivel o actividad biológica de una molécula, la replicación de un patógeno, la respuesta celular, la actividad celular o similares significa que el nivel o actividad celular aumenta o disminuye de manera detectable. Tal aumento o disminución se puede observar en sujetos tratados en comparación con sujetos no tratados con el dímero bloqueado de la presente invención, donde los sujetos no tratados tienen, o son susceptibles de desarrollar, la misma o similar enfermedad, afección, síntoma o similar. Dichos aumentos o disminuciones pueden ser al menos aproximadamente del 2 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 %, el 100 %, el 150 %, el 200 %, el 250 %, el 300 %, el 400 %, el 500 %, el 1000 % o más o aproximadamente dentro de cualquier intervalo aproximadamente entre cualquiera de estos dos valores. La modulación puede determinarse subjetiva u objetivamente, por ejemplo, mediante la autoevaluación del sujeto, mediante la evaluación de un médico o mediante la realización de un ensayo o medición adecuada, incluyendo, por ejemplo, evaluaciones de calidad de vida o ensayos adecuados para el nivel o actividad de las moléculas, células o migración celular dentro de un sujeto. La modulación puede ser transitoria, prolongada o permanente, o puede ser variable en momentos relevantes durante o después de administrar el dímero bloqueado de la presente invención a un sujeto, o se usa en un ensayo u otro método descrito en el presente documento o una referencia citada, por ejemplo, dentro de aproximadamente 1 hora de la administración o uso del dímero bloqueado de la presente invención a aproximadamente 3, 6, 9 meses o más después de que un

sujeto o sujetos hayan recibido el dímero bloqueado de la presente invención.

5 Por "administración" los presentes inventores se refieren a cualquier medio para introducir el polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la presente invención en el cuerpo, preferentemente en la circulación sistémica. Ejemplos incluyen, pero sin limitación, oral, bucal, sublingual, pulmonar, transdérmica, transmucosa, así como inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa e intramuscular.

10 Por "cantidad terapéuticamente eficaz" los presentes inventores se refieren a una cantidad eficaz, en dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado, tales como la reducción o reversión de la angiogénesis en el caso de cánceres, o la reducción o inhibición de los linfocitos T en enfermedades autoinmunitarias. Una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de dímero CCL20 bloqueado puede variar dependiendo de factores, tales como la patología, edad, sexo y peso del sujeto, y la capacidad del polipéptido de dímero CCL20 bloqueado para desencadenar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del polipéptido de dímero CCL20 bloqueado se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

20 Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado, tales como prevenir o inhibir la tasa de metástasis de un tumor o la aparición de ataques o episodios de esclerosis múltiple. Se puede determinar una cantidad profilácticamente eficaz como se describió anteriormente para la cantidad terapéuticamente eficaz. Generalmente, debido a que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

25 **Kits.** En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención y material de instrucción. Por "material de instrucción" los presentes inventores se refieren a una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que se utiliza para comunicar la utilidad de la composición farmacéutica de la invención para uno de los fines establecidos en el presente documento en un ser humano. El material de instrucción puede también, por ejemplo, describir una dosis apropiada de la composición farmacéutica de la invención. El material de instrucción del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene una composición farmacéutica de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene la composición farmacéutica. Alternativamente, el material de instrucción puede enviarse por separado del envase con la intención de que el material de instrucción y la composición farmacéutica sean utilizados de manera cooperativa por el destinatario.

35 La invención también puede comprender además un dispositivo de suministro para suministrar la composición a un sujeto. A modo de ejemplo, el dispositivo de suministro puede ser una botella de pulverizador exprimible, una botella de pulverizador de dosis medida, un dispositivo pulverizador de aerosol, un atomizador, un dispositivo de suministro de polvo seco, un dispositivo de dispositivo dispensador de disolvente/polvo autopropulsado, una jeringa, una aguja, un tampón o un envase para medir la dosis.

Listado de secuencias: Las siguientes son secuencias polipeptídicas de monómeros.

SEQ ID NO:1 (S64C)  
(ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPKQTWVKYIV  
RLLCKKVKNM)

45 SEQ ID NO:2 (V21C/T24C)  
(ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVCGFCRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPKQTWVKYIV  
RLLSKKVKNM)

SEQ ID NO:3 (G22C/T24C)  
(ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVCFCRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPKQTWVKYIV  
RLLSKKVKNM)

SEQ ID NO:4 (F23C)  
(ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGCTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPKQTWVKYIV  
RLLSKKVKNM)

SEQ ID NO:5 (V60C)

(ASNFDCCGLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPKQTWVKYIC  
RLLSKKVKNM)

SEQ ID NO:6 (V67C)

(ASNFDCCGLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPKQTWVKYIV  
RLLSKKCKNM)

### III. Ejemplos

5

Los siguientes ejemplos que describen materiales y metodología se ofrecen solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

10

**Construcción de la variante CCL20 S64C.** La dimerización es esencial para la función *in vivo* de las quimiocinas y, como resultado, se han utilizado monómeros y dímeros de diversas quimiocinas CC y CXC modificados por ingeniería para probar sus respectivos papeles en la señalización de las quimiocinas (Proudfoot et al., 2003). El dímero tipo CXC observado en dos estructuras cristalinas de rayos X de CCL20 diferentes es inusual para un miembro de la familia de quimiocinas CC, y los estudios de RMN indican que la autoasociación de CCL20 es relativamente débil y dependiente del pH (Chan et al., 2008). Para probar la actividad funcional del dímero CCL20 cristalográfico, se diseñó un dímero reticulado usando Disulfide by Design para predecir enlaces disulfuro intermoleculares usando una de las estructuras cristalinas de rayos X (código PDB 2HCI) (Dombkowski, 2003). A partir de la inspección visual de una lista de candidatos, se generaron dos variantes de CCL20 por sustitución de cisteína simple y tres por cisteína doble para pruebas experimentales. Estas variantes de cisteína contenían sustituciones en la 1ª cadena  $\beta$  (V21C/T24C, G22C/T24C y F23C) y en la hélice  $\alpha$  (V60C/V67C y S64C). Cada variante se purificó, se replegó y analizó por HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF. Solamente una variante, CCL20 S64C, que se predice que formará un enlace disulfuro intermolecular simétrico entre las hélices  $\alpha$  opuestas (Fig. 1A-B), produjo suficiente proteína pura plegada adecuada para un análisis posterior.

15

20

25

La inyección conjunta de las proteínas CCL20 TS y S64C en HPLC de fase inversa produjo un cromatograma con dos máximos distintos (Fig. 1C). La inyección de CCL20 TS o CCL20 S64C solo reveló que los tiempos de retención para cada proteína coincidían con aquellos de la inyección conjunta y que no se observaron especies monoméricas en la muestra de dímeros. Se usó espectrometría de masas cuadrupolo-Orbitrap para confirmar el peso molecular de 16080,4 kDa para la variante CCL20 unida por disulfuro (Fig. 1D). El espectro de coherencia cuántica simple heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (HSQC) de CCL20 S64C muestra 79 máximos bien dispersos consistentes con una proteína plegada homogénea que es distinta de CCL20 de tipo silvestre (Fig. 1E). El estado oligomérico de CCL20 S64C se confirmó por SDS-PAGE de muestras reducidas con disulfuro y no reducidas, que migraron a -10 y 20 kDa, respectivamente (Fig. 1E). Basándose en los datos biofísicos, los presentes inventores llegaron a la conclusión de que el reemplazo de Ser 64 con cisteína produjo un homodímero CCL20 simétrico unido por disulfuro.

30

35

40

**Prueba *in vitro* de CCL20 S64C.** Algunos dímeros de quimiocinas CXC pueden unirse y activar sus receptores, pero la dimerización de las quimiocinas CC generalmente bloquea la unión al receptor, haciéndolos no funcionales como agonistas de GPCR (Ravindran et al., 2013; Tan et al., 2012). Los presentes inventores compararon la actividad agonista de CCR6 de las proteínas recombinantes CCL20 TS y CCL20 S64C en los análisis de flujo de calcio y quimiotaxis celular utilizando células Jurkat CCR6<sup>+</sup> transfectadas. Ambas moléculas indujeron un flujo de calcio intracelular mediado por CCR6 a concentraciones nanomolares con CCL20 S64C ~ 9 veces menos potente que la no modificada (Fig. 2A). En un ensayo de migración basado en filtro, CCL20 indujo la migración de células Jurkat CCR6<sup>+</sup> con dependencia de la concentración bifásica atípica y una respuesta máxima observada a 100 nM ( $CE_{50}$  ~ 15 nM) (Fig. 2B). Por el contrario, la exposición a CCL20 S64C en el mismo ensayo no produjo una migración celular significativa (Fig. 2B). Estos resultados sugieren que el dímero CCL20 unido por disulfuro conserva la capacidad de unirse a CCR6 e inducir la señalización de la proteína G, pero deja de estimular otras vías de señalización inducidas por CCL20 necesarias para la quimiotaxis celular.

45

50

55

Los presentes inventores monitorizaron el efecto de CCL20 S64C en el bloqueo de la migración de células Jurkat CCR6<sup>+</sup> inducida por CCL20 TS 30 nM. CCL20 S64C inhibió la quimiotaxis dependiente de la dosis con una  $CI_{50}$  ~ 100 nM (Fig. 2C). CCL20 S64C también bloqueó la quimiotaxis en respuesta a la beta defensina 2 humana (hBD2), otra proteína secretada que se une a CCR6 y promueve la migración celular (Fig. 2D). Cabe destacar que, CCL20 S64C no inhibió la migración de células THP-1 mediada por CXCR4 y CCR2, los receptores afines para las quimiocinas CXCL12 y CCL2, respectivamente. En presencia de CXCL12 10 nM y CCL2 1 nM, la variante CCL20 S64C no mostró efectos inhibitorios sobre la migración de células THP-1 tras el tratamiento con una u otra quimiocina, sugiriendo que CCL20 S64C bloqueó selectivamente la quimiotaxis mediada por CCR6. Tomado en conjunto, estos resultados indicaron que CCL20 S64C inhibe la quimiotaxis inducida por CCL20 al unirse específicamente al receptor CCR6 en lugar de interactuar directamente con CCL20 o al bloquear otras vías de señalización de migración celular cadena abajo.

**Actividad antiinflamatoria de CCL20 S64C en la psoriasis inducida por IL-23.** Basándose en su capacidad para bloquear la migración celular mediada por CCL20 *in vitro* de una manera específica de CCR6, los presentes inventores especularon que CCL20 S64C podría atenuar la inflamación asociada con la dermatitis psoriasiforme *in vivo*. Para identificar un posible papel terapéutico de CCL20 S64C *in vivo*, los presentes inventores utilizaron un modelo de dermatitis psoriasiforme inducida por IL-23. Se sabe que la exposición a IL-23 conduce a los linfocitos T hacia la diferenciación a Th17 y estimula la migración de otras células inflamatorias a la epidermis, dando como resultado una inflamación dérmica que se puede medir con un micrómetro a lo largo del tiempo (Hedrick et al., 2009). Los presentes inventores inyectaron IL-23 con CCL20 S64C, IL-23 con CCL20 TS o IL-23 sola en la piel de la oreja de los ratones y se midió el grosor de la oreja cada dos días durante cinco días. Como cabía esperar, los ratones inyectados con IL-23 y CCL20 TS o IL-23 sola mostraron hinchazón reproducible de la oreja. La adición de CCL20 S64C con IL-23 dio como resultado una reducción significativa en el grosor de la oreja en comparación con los otros grupos (Fig. 3A). La falta de prevención por cantidades equimolares de CCL20 TS indica que los efectos observados se deben a la conformación dimérica unida por disulfuro de CCL20 S64C y no al aumento de los niveles de CCL20 en general.

Además de la medición del engrosamiento de la oreja, los presentes inventores examinaron el efecto de CCL20 S64C en el modelo IL-23 a nivel histológico. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) se utilizó para caracterizar la infiltración de células inmunitarias a la epidermis. La inyección con IL23 sola (o con la proteína CCL20 TS) dio como resultado una marcada hiperplasia epidérmica y una mezcla densa de infiltrado inflamatorio mononuclear (Fig. 3B). Por el contrario, los ratones tratados con IL-23 y CCL20 S64C mostraron una hiperplasia epidérmica reducida y una infiltración celular inflamatoria disminuida, que fue comparable al control con PBS (Fig. 3B). Por lo tanto, el tratamiento con CCL20 S64C redujo notablemente la hiperplasia epidérmica y la inflamación dérmica, dos firmas clave de la dermatitis psoriasiforme.

A continuación, los presentes inventores evaluaron los efectos específicos de los tratamientos con CCL20 sobre el tráfico de linfocitos T y la expresión de biomarcadores en la epidermis. Las suspensiones de células epidérmicas se tiñeron con anticuerpos monoclonales contra el receptor de linfocitos T  $\gamma\delta$ . En la piel murina, se reconocen dos poblaciones distintas de linfocitos T  $\gamma\delta$  que expresan  $\gamma\delta$ -TCR alto o bajo en la piel no inflamada, donde los niveles de linfocitos T  $\gamma\delta$ -altos epidérmicos (también llamados linfocitos T epidérmicos dendríticos) están presentes en números mucho mayores en comparación con los linfocitos T  $\gamma\delta$ -bajos (Girardi, 2006). En la piel tratada con IL-23, los linfocitos T  $\gamma\delta$ -bajos aumentan notablemente en la dermis y la epidermis (Mabuchi et al., 2011). Además, los linfocitos T GDL reclutados expresan altos niveles de IL-17A e IL-22, que sugieren la diferenciación de Th17. De manera similar a los informes anteriores, los ratones tratados con IL-23 sola mostraron un aumento en las poblaciones de linfocitos T GDL epidérmicos en comparación con el control con PBS ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3C y 3E). Cuando se inyectó CCL20TS 100 nM en la oreja, no se observó una reducción significativa en las poblaciones de linfocitos T GDL. De manera destacable, los ratones tratados con CCL20 S64C mostraron una carencia significativa de una población de linfocitos T GDL en la epidermis (Fig. 3C y 3E). Estos resultados confirmaron la hipótesis de los presentes inventores de que CCL20 S64C, pero no CCL20 de tipo silvestre, puede bloquear el tráfico de linfocitos T GDL a la epidermis.

Para examinar adicionalmente los niveles de expresión de biomarcadores de psoriasis, los presentes inventores realizaron un análisis RT-PCR de IL-17A e IL-22, que se sabe que están elevados con el aumento de los linfocitos T GDL (Sutton et al., 2009). Las suspensiones de células epidérmicas de orejas tratadas con CCL20 S64C mostraron una reducción significativa en la expresión del ARNm de IL-22 e IL-17A en comparación con orejas tratadas con IL-23 sola (Fig. 3F). Sin embargo, las células epidérmicas de las orejas tratadas con CCL20 de tipo silvestre mostraron mayores niveles de ARNm de IL-22 e IL-17A que fueron comparables a los tratamientos con IL-23 sola. Por lo tanto, CCL20 S64C bloqueó la acumulación de linfocitos T GDL en la epidermis y redujo la expresión del ARNm de IL-22 e IL-17A en la epidermis de ratones tratados.

Algunos dímeros de quimiocinas bloqueados, aunque adoptan el pliegue terciario adecuado, no pueden unirse a sus GPCR afines, como en el caso de CCL2 que pierde su capacidad de unirse a CCR2 como un dímero capturado con disulfuro (Tan et al., 2012). Por el contrario, el dímero preferencial CXCL1 mantiene la capacidad agonista total como un dímero CXC (Ravindran et al., 2013). La variante de los presentes inventores modificada por ingeniería es el primer dímero CCL20 unido por disulfuro que es capaz de interactuar con CCR6 y desencadenar la liberación intracelular de calcio, aunque con una potencia casi diez veces más débil. Chan et. al. realizaron simulaciones de dinámica molecular sobre las estructuras cristalinas diméricas y la estructura monomérica de CCL20 por RMN y descubrieron que el surco de unión al receptor formado por el bucle N y la 3ª cadena B es  $\sim 1 \text{ \AA}$  más estrecho en el dímero en comparación con el monómero. El surco estrecho del dímero podría producir interacciones menos favorables entre la quimiocina y el receptor y explicar la disminución de la potencia del dímero CCL20 S64C. Chan et. al. y otros también han notado que la estructura cristalina de CCL20 (2HCI) muestra restos del extremo N de la quimiocina en un monómero (Ser3 y Asn4) entrando en contacto en el monómero opuesto (Lys43). La variante CCL20 S64C probablemente favorecería estas interacciones debido al estado bloqueado y puede colocar el extremo N de la quimiocina en una orientación diferente en el compartimento ortostérico de CCR6, conduciendo a una señalización específica de oligómero. Se necesitan más estudios estructurales de CCL20 de tipo silvestre y de la variante S64C para determinar las interacciones clave entre CCL20 y CCR6 que imparten las diferencias oligoméricas observadas.

En este estudio, los presentes inventores demostraron que la variante CCL20 S64C previno la dermatitis psoriasiforme

y bloqueó el reclutamiento de linfocitos T GDL a la epidermis, aumentando la posibilidad de que neutralizar la vía CCL20/CCR6 pueda ser terapéuticamente útil en enfermedades psoriásicas humanas. De hecho, los datos clínicos humanos recientes respaldan la importancia de CCR6 y de los linfocitos T GDL en la psoriasis. El trabajo inicial caracterizó a CCL20 como la quimiocina más altamente regulada en lesiones psoriásicas humanas (Homey et al., 2000). De manera adicional, se ha informado que los pacientes psoriásicos tienen los niveles circulantes de células IL-17A<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> en la sangre aumentados y que los linfocitos T  $\gamma\delta$  IL-17A<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> están presentes en mayor número en las lesiones psoriásicas en comparación con la piel normal (Kagami et al., 2010; Laggner et al., 2011). El papel de CCR6 en la función activada de los linfocitos T resalta el potencial terapéutico de la variante CCL20 S64C no solo en la psoriasis sino también en otras enfermedades que utilizan vías mediadas por Th17.

El dímero CCL20 bloqueado se administraría a intervalos regulares a un paciente con lesiones cutáneas psoriásicas activas por vía sistémica, incluida la administración intravenosa.

**Generación de plásmido de dímero CCL20 bloqueado.** El plásmido CCL20S64C se generó mediante mutagénesis dirigida al sitio usando cebadores complementarios usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikCange (Stratagene). El plásmido mutante se confirmó por secuenciación de ADN.

**Purificación de proteínas.** Las proteínas CCL20S64C, CCL20TS y hBD2 se expresaron y purificaron como se describió previamente (Takekoshi et al., 2012). Brevemente, las células de *E. coli* se lisaron mediante French Press y se centrifugaron durante 20 minutos a 15.000 rpm. La fracción insoluble se resuspendió en un tampón de guanidina 6 M y se purificó por cromatografía con níquel. Las eluciones de CCL20S64C se agruparon y se replegaron gota a gota en un tampón de cisteína 20 mM, cistina 0,5 mM, Tris 100 mM (pH 8,0). Las eluciones de CCL20TS y hBD2 se replegaron en un tampón de cisteína 10 mM, cistina 0,5 mM, Tris 100 mM (pH 8,0). Las proteínas CCL20 y hBD2 replegadas se escindieron con ULP1 recombinante y la etiqueta SUMO-6XHIS y se separaron de la proteína recombinante mediante cromatografía de intercambio catiónico. Después de la cromatografía de intercambio, las eluciones se purificaron por HPLC y se liofilizaron. La pureza y los pesos moleculares se confirmaron mediante SDS-PAGE y espectrometría MALDI-TOF.

**Cromatografía HPLC.** Aproximadamente 100 mg de proteínas recombinantes CCL20S64C y CCL20TS se resuspendieron en H<sub>2</sub>O y se inyectaron en una HPLC Shimadzu equipada con columna C18 (Vydac). Se usó un gradiente de 50 - 80 % de acetonitrilo al 70 % (Sigma) y TFA al 0,1 % (Sigma) para eluir las proteínas.

**Espectrometría de Masas.** El CCL20S64C purificado se diluyó a 1 mM en acetonitrilo al 70 % que contenía ácido fórmico al 0,1 %. La proteína se analizó mediante infusión directa usando un espectrómetro de masas Híbrido Cuadrupolo-Orbitrap Q Exactive™ (ThermoFisher Scientific). El análisis se realizó con un poder de resolución establecido en 140.000. Los datos se deconvolucionaron y desisotiparon usando Xtract y Xcalibur™ en QualBrowser (ThermoFisher Scientific).

**SDS-PAGE Reducida/Oxidada.** Aproximadamente se resuspendieron 3 mg de CCL20S64C o CCL20TS en un tampón SDS bien en ausencia o presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Espectroscopia de RMN.** Se resuspendieron [U-<sup>15</sup>N] -CCL20S64C y CCL20TS en H<sub>2</sub>O y se diluyeron a 50 mM en un tampón de MES deuterado 25 mM (pH 6,8), D<sub>2</sub>O al 10 % (v/v) y NaN<sub>3</sub> al 0,02 % (p/v). Los experimentos de coherencia cuántica simple heteronuclear con <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance de 500 MHz equipado con una criosonda TCI a 298K.

**Ensayo de Flujo de Calcio.** Las células Jurkat CCR6<sup>+</sup> transfectadas se lavaron dos veces en una solución salina tamponada con Hanks (HBSS), HEPES 25 mM (pH 7,4) y tampón BSA al 0,2 % (p/v) y se incubaron 2 3 1 0<sup>5</sup> células/pocillo con tinte FLIPR Calcium 4 a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 1 hora en una placa HTS de 384 pocillos (Greiner bio-one). Las diluciones de quimiocinas se realizaron en tampón y se añadieron a la placa después de una lectura de referencia de 20 s. Se observó fluorescencia a 515 nm usando un Flexstation 3 (Molecular Devices) durante 80 segundos adicionales. Se midió la señal fluorescente total y se midieron cuatro réplicas de dos días separados y se presentan como la media  $\pm$  EEM. Los valores de CE<sub>50</sub> se calcularon mediante un ajuste no lineal a una función de cuatro parámetros.

**Ensayo de quimiotaxis.** Las diluciones de quimiocinas y hBD2 se prepararon como se indica en un RPMI 1640, tampón HEPES 25 mM (pH 7,4) y BSA al 0,2 % y se añadieron al pocillo inferior de una placa de 96 pocillos Corning HTS Transwell® (tamaño de poro de 5 mm). Las células Jurkat CCR6<sup>+</sup> transfectadas se lavaron en tampón y se añadieron 3,6 3 10<sup>4</sup> células al pocillo superior y se dejaron incubar a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 2 horas. Las células migradas en el pozo inferior se cuantificaron en un citómetro de flujo BD™ LSR II. El número total de células es el promedio de cuatro réplicas de dos días separados y se presenta como la media  $\pm$  EEM. Significación determinada por una prueba T de Student de dos colas, sin emparejamiento.

**Ratones.** Los ratones C57BL/6J se adquirieron de The Jackson Laboratory. Todos los ratones se usaron a las 8-12 semanas de edad. Los protocolos con animales fueron aprobados por los Comités de Cuidado y Uso de Animales del Medical College of Wisconsin.

- 5 **Inyecciones de citocinas en las orejas de los ratones.** Se realizaron inyecciones intradérmicas de 500 ng de IL-23 de ratón recombinante (BioLegend) en 20 ml de PBS en ambas orejas de ratones anestesiados cada dos días durante 6 días como se describió anteriormente (Mabuchi et al., 2011). De una manera similar, los presentes inventores administraron una inyección intradérmica de 20 ml de PBS que contiene 32 ng (0,1 mM) de CCL20S64C recombinante mezclado con 500 ng de IL-23 recombinante de ratón, 20 ml de PBS que contiene 16 ng (0,1 mM) de CCL20TS recombinante mezclado con 500 ng de IL-23 de ratón recombinante. El grosor de la oreja se midió antes de cada inyección usando un medidor de grosor de cuadrante (Ozaki).
- 10 **Procesamiento de células epidérmicas de orejas de los ratones.** Después de la recuperación de las orejas de los ratones, las láminas de piel se separaron del cartílago y se incubaron en PBS que contenía tripsina al 0,5 % (Affymetrix) durante 40 minutos a 37 grados centígrados para separar las láminas epidérmicas de las láminas dérmicas. Para obtener suspensiones celulares, las láminas epidérmicas se trataron en DMEM (Invitrogen) que contenía DNasa I al 0,05 % (Sigma-Aldrich) como se describe (Mabuchi et al., 2013).
- 15 **Citometría de Flujo.** Se adquirieron anti- $\gamma\delta$ -TCR de ratón (clon: GL3) de BioLegend. Las células de la epidermis de ratón se examinaron usando un Accuri C6 (BD Biosciences). Los datos de la citometría de flujo se analizaron utilizando el programa informático FlowJo versión 10.0.7 (Tree Star).
- 20 **PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR).** La extracción de ARN y el posterior análisis de la expresión del ARNm de las citocinas indicadas de la epidermis se realizó como se describe (Mabuchi et al., 2011). En resumen, el ARN total de la epidermis de ratón se preparó utilizando un kit de tejido fibroso RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la RT-PCR se realizó a través del sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems).
- 25 **Análisis Histopatológico.** Se tomaron muestras de la piel, se fijaron con formaldehído al 10 % y se embebieron en parafina. Esos tejidos se seccionaron a 4 mm de espesor y las secciones desparafinizadas se tiñeron con H&E.
- 30 **Estadísticas.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM. Los valores de  $CE_{50}$  y  $Cl_{50}$  de flujo de calcio y quimiotaxis se analizaron usando ProFit 6 y en archivo de procesamiento por lotes internos. Los datos *in vivo* se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 6 (GraphPad Software). Se realizaron comparaciones simples de medias y EEM de los datos mediante la prueba *t* de Student de ambos lados y se realizaron comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey. Un valor de *P* menor de 0,05 se considera estadísticamente significativo.
- 35 **Uso del dímero CCL20 bloqueado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.** En una realización, el dímero bloqueado de la presente invención puede usarse como un agonista o un antagonista en combinación con otras terapias antiinflamatorias conocidas. Por "agonista" los presentes inventores se refieren a un ligando que estimula el receptor al que se une el ligando en el sentido más amplio. Un "agonista" o un "antagonista" es un compuesto o composición que, respectivamente, aumenta o disminuye de manera detectable la actividad de un receptor, una enzima u otra molécula biológica, que puede conducir a niveles de transcripción o de ARNm aumentados o disminuidos de un gen regulado u otro efecto medible, tal como el nivel alterado de actividad del producto génico o proteína. El aumento o disminución en la actividad de un receptor o enzima será un aumento o una disminución de al menos aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, o un intervalo aproximadamente entre cualquiera de estos dos valores, para una o más actividades medibles. Los receptores, sus factores accesorios y los factores de transcripción asociados pueden modular la transcripción de su(s) gen(es) diana aumentando o disminuyendo de manera detectable los niveles de transcripción o de ARNm. Las actividades biológicas de los receptores también pueden incluir respuestas biológicas moduladoras tal como la transducción de señales dentro de una célula o el flujo iónico, por ejemplo, sodio, potasio o calcio, a través de las membranas celulares o de los orgánulos, por ejemplo, a través de las mitocondrias.
- 40 50 La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención se puede determinar usando diversos modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica descritos en Crofford L. J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty et al. (eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). También se pueden usar modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunitarias para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención.
- 55 Los principales modelos animales para la artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente usados incluyen: modelos de rata con artritis inducida por adyuvantes, modelos de rata y ratón con artritis inducida por colágeno y modelos de rata, conejo y hámster con artritis inducida por antígeno, descritos en su totalidad en Crofford L. J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty et al. (eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993).
- 60 65 La actividad antiinflamatoria de la invención puede evaluarse usando un modelo de rata con artritis inducida por carragenanos. La artritis inducida por carragenanos también se ha usado en conejo, perro y cerdo en estudios de artritis o inflamación crónicas. Para determinar la eficacia terapéutica se usa la evaluación histomorfométrica

cuantitativa. Los métodos para usar dicho modelo de artritis inducida por carragenanos se describen en Hansra P. et al., "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat", *Inflammation*, 24(2): 141-155, (2000). También se usan comúnmente modelos animales de inflamación inducida por zimosano como se sabe y se describe en la técnica.

5 La actividad antiinflamatoria de la invención también se puede evaluar midiendo la inhibición del edema de la pata inducido por carragenanos en la rata, utilizando una modificación del método descrito en Winter C. A. et al., "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547, (1962). Este ensayo se ha usado como exploración *in vivo* primaria para determinar la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera predictivo de la eficacia en seres humanos. La actividad antiinflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos de prueba se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento del peso de la pata trasera del grupo de prueba con respecto al grupo de control dosificado con vehículo. De manera adicional, también pueden usarse modelos animales para la enfermedad inflamatoria intestinal para evaluar la eficacia de las terapias de combinación de la invención.

15 También se pueden usar modelos animales para asma para evaluar la eficacia de las terapias de combinación de la invención. Un ejemplo de uno de estos modelos es el modelo de transferencia adoptiva murina en el que la provocación por aeroalérgenos de los ratones receptores TH1 o TH2 da como resultado la migración de células efectoras TH a las vías respiratorias y se asocia con una respuesta inflamatoria de la mucosa pulmonar neutrofílica (TH1) y eosinofílica (TH2) intensa. (Cohn et al., 1997, *J. Exp. Med.* 186,1737-1747).

20 **El dímero CCL20 bloqueado para su uso en métodos para tratar enfermedades autoinmunitarias.** El dímero CCL20 bloqueado de la presente invención sería beneficioso en la enfermedad autoinmunitaria en la que la expresión de CCR6 es una característica destacada de los linfocitos T que se infiltran en el tejido afectado. El tratamiento consistiría en administrar el fármaco sistémicamente al paciente con enfermedad activa. También se pueden usar modelos animales para trastornos autoinmunitarios para evaluar la eficacia de las terapias de combinación de la invención. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunitarios tales como diabetes de tipo 1, autoinmunidad de la tiroides, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis. Adicionalmente, se puede usar cualquiera de los ensayos conocidos por los expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinadas desveladas en el presente documento para enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias.

25 También se pueden usar modelos animales para inflamación autoinmunitaria y/o intestinal para probar la eficacia de las terapias de combinación de la invención. Un ejemplo de uno de estos modelos es el modelo de colitis murina por dextrano sulfato de sodio como se describe en Wirtz S. et al., "Chemically induced mouse models of intestinal inflammations" *Nature Protocols* 2, 541-546, (2007).

#### **Estructura cristalina por rayos X de CCL20 S64C**

40 Algunas quimiocinas forman estructuras de orden superior que muestran particularidades características de dímero compartidas con otras clases de quimiocinas. Para validar la conformación de dímero de tipo CXC de CCL20 en solución, los presentes inventores resolvieron la estructura cristalina de rayos X de CCL20 S64C mediante reemplazo molecular. La proteína cristalizó en un tampón de acetato de amonio y se empaquetó en el grupo de espacio hexagonal (P6<sub>1</sub>) para dar una resolución de estructura final de 2,0 Å. Dos moléculas CCL20 están en la unidad asimétrica, formando el dímero de tipo CXC esperado. La estructura de la subunidad monomérica es similar a otras quimiocinas previamente resueltas, donde una región N-terminal no estructurada está seguida de dos enlaces disulfuro *intramoleculares*, una región de bucle N y tres cadenas β. Las hélices α C-terminales en ambas subunidades entran en contacto con las hebras bucle/β de 30 subunidades opuestas y están conectadas a través de un enlace disulfuro *intemolecular*, con una densidad de electrones bien definida en todo el enlace (Fig. 4a, b).

50 La estructura del dímero bloqueado muestra una gran similitud con otras estructuras de CCL20. El extremo N es extremadamente flexible, con densidades de electrones observadas que comienzan en D5, precediendo, el aminoácido, al primer enlace disulfuro, en ambas subunidades. La estructura tiene densidad de electrones completa a través de M70 en ambas cadenas de monómeros debido al enlace de hidrógeno entre el oxígeno de la cadena principal de M70 y el N K de K52; el resto terminal no se observa en ninguna otra estructura cristalina de CCL20. CCL20 S64C se autoasocia a lo largo de las cadenas β1 y forma un patrón característico de enlaces de hidrógeno entre los átomos de la cadena principal de V21, F23 y R25 (Fig. 4c). De manera adicional, el dímero se estabiliza mediante contactos hidrófobos entre cada hélice α y las cadenas β de la subunidad opuesta, como se ve para V67 en el monómero A y F23 del monómero B. Junto con los contactos de van der Waal, los enlaces de hidrógeno entre K57 Nζ y el oxígeno de la cadena principal de V67 de la subunidad opuesta estabilizan el dímero y producen contribuciones adicionales a la estabilización del extremo C.

65 El reconocimiento de quimiocinas monoméricas y algunas diméricas se facilita mediante el reconocimiento de un motivo conservado de bucle N/ hebra β3 en la superficie de las quimiocinas (Blanpain et al., 2003; Baly et al., 1998; Bondue et al., 2001). La Figura 4d muestra una superposición de esta hendidura de unión en el dímero CCL20 bloqueado y en CCL20 monomérico (ID de PDB = 2JYO). El dímero CCL20 bloqueado adopta una conformación de compartimento similar a la del monómero, con un RMSD = 0,97 Å para los átomos Cα para los restos 10-50. De

manera adicional, las cadenas laterales de R13, F19 y V47 monoméricos y diméricos adoptan orientaciones similares en el compartimento, con el grupo amino de R13 apuntando hacia el compartimento y muy cerca de V47. No se encuentran compañeros de simetría u otras interacciones proteína-proteína cerca de este compartimento en la estructura de rayos X del dímero.

5

#### ***CCL20 S64C es un agonista sesgado para CCR6.***

Algunos dímeros de quimiocinas CXC pueden unirse y activar sus receptores, pero la dimerización de las quimiocinas CC generalmente bloquea la unión, haciéndolos no funcionales como agonistas de GPCR (Tan et al., 2012; Ravindran et al., 2013). Para probar si el dímero tiene relevancia biológica, los presentes inventores compararon el dímero bloqueado y CCL20 de tipo silvestre para determinar su capacidad para unirse y activar CCR6. El desplazamiento del radioligando de  $^{125}\text{I}$ -CCL20 TS en las células COS7 CCR6<sup>+</sup> mostró un factor de cambio de diez veces en la afinidad entre CCL20 TS y CCL20 S64C con valores de  $K_d$  de 7,6 nM y 74,4 nM, respectivamente (Fig. 5A). A continuación, los presentes inventores evaluaron la capacidad del dímero para activar CCR6 en relación con CCL20 TS midiendo la liberación intracelular de calcio. En las células Jurkat CCR6<sup>+</sup>, ambas moléculas indujeron el flujo de calcio mediado por CCR6 a concentraciones nanomolares con CCL20 S64C ~ 9 veces menos potente que la no modificada (Fig. 5b). Como corolario de la liberación de calcio en el retículo endoplasmático y específica para la asociación de la subunidad  $G_{\alpha i}$  con CCR6, se midió la acumulación de  $\text{IP}_3$  en células COS-7 transfectadas con la proteína G quimera Gqi4myr (Rosenkilde et al., 2006). La administración dependiente de la dosis de CCL20 TS y CCL20 S64C en células COS-7 generó una acumulación de  $\text{IP}_3$  mediada por CCR6 con valores de  $\text{CE}_{50}$  de 0,4 nM y 41,3 nM, respectivamente. En ambos ensayos que evalúan la señalización de la proteína G, la CCL20 S64C conserva la capacidad de activar CCR6 (Fig. 5c).

Tras la activación agonista de los receptores de quimiocinas, las cinasas receptoras de proteína G (GRKS) fosforilan la cola citoplasmática de GPCR y reclutan múltiples isotipos de  $\beta$ -arrestina en la cara intracelular del receptor (Aramori et al., 1997). Los presentes inventores probaron la capacidad del dímero para reclutar  $\beta$ -arrestina-2 usando un ensayo de luminiscencia de  $\beta$ -galactosidasa en células U2OS transfectadas (Fig. 5d). El reclutamiento de  $\beta$ -arrestina-2 para CCR6 se midió en respuesta a CCL20 TS y CCL20 S64C y produjo valores de  $\text{CE}_{50}$  de 1,1 nM y 86,2 nM, respectivamente.

30

También se evaluó la internalización de CCR6 en respuesta a CCL20 TS y CCL20 S64C. Las células Jurkat se incubaron con 70 y 700 nM de cada proteína durante 30 minutos y se cuantificó la expresión de CCR6 en la superficie celular por citometría de flujo. Cuando se trató con concentraciones de CCL20 S64C (700 nM) iguales a o superiores a valores de  $\text{CE}_{50}$  de flujo de calcio y de reclutamiento de  $\beta$ -arrestina-2, no se observó una internalización de CCR6 significativa (Fig. 5e). Por el contrario, CCL20 TS redujo significativamente la expresión de superficie de CCR6 de una manera dependiente de la concentración. Tomado en conjunto, la activación selectiva de algunas, pero no todas, las vías de señalización mediadas por receptores, clasifica CCL20 S64C como un agonista sesgado para CCR6.

40 [Eliminado]

40

#### REFERENCIAS

- Aramori, I. et al. 1997. The EMBO journal. 16: 4606-4616.  
 Baba, M. et al. 1997. The Journal of biological chemistry. 272:14893-14898.  
 45 Baly, D.L. et al. 1998. Journal of immunology. 161: 4944-4949.  
 Blanpain, C. et al. 2003. The Journal of biological chemistry. 278: 5179-5187.  
 Bondue, A. et al. 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98: 13722-13727.  
 Campanella, G.S. et al. 2006. Journal of immunology. 177:6991-6998.  
 50 Chan, D.I. et al. 2008. Antimicrobial agents and chemotherapy. 52:883-894.  
 Crump, M.P. et al. 1997. The EMBO journal. 16:6996-7007.  
 Dombkowski, A.A. 2003. Bioinformatics. 19:1852-1853.  
 Drury, L.J. et al. 2011. Proc. of the Natl Acad, of Sciences. 108:17655-17660.  
 Girardi, M. 2006. The Journal of investigative dermatology. 126:25-31.  
 55 Hassan, S. et al. 2011. Int. J. of cancer. Journal international du cancer. 129:225-232.  
 Hedrick, M.N. et al. 2009. The Journal of clinical investigation. 119:2317-2329.  
 Homey, B. et al. 2000. J. of immunology. 164:6621-663  
 Hoover, D.M. et al. 2002. The Journal of biological chemistry. 277:37647-37654  
 Jansma, A. et al. 2009. Capítulo 2. Methods in enzymology. 461:31-50.  
 60 Kagami, S. et al. 2010. The Journal of investigative dermatology. 130:1373-1383.  
 Kufareva, I. et al. 2014. Proc. Natl Academy of Sciences. 111: E5363-5372.  
 Kurd, S.K. et al. 2009. J. American Academy of Dermatology. 60:218-224.  
 Laggner, U et al. 2011. Journal of immunology. 187:2783-2793.  
 Langley, R.G. et al. 2014. The New England journal of medicine. 371:326-338.  
 65 Liao, F. et al. 1999. Journal of immunology. 162:186-194.  
 Mabuchi, T. et al. 2011. Journal of immunology. 187:5026-5031.

Malik, Z.A. et al. 2006. Acta crystallographica. 62:631-634.  
 Proudfoot, A.E. et al. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100:1885-1890.  
 Ravindran, A. et al. 2013. The Journal of biological chemistry. 288:12244-12252.  
 Rodriguez-Frade, J.M. et al. 1999. The Journal of cell biology. 144:755-765.  
 5 Rosenkilde, M.M. et al. 2004. The Journal of biological chemistry. 279:3033-3041.  
 Rosenkilde, M.M. et al. 2006. The Journal of biological chemistry. 281: 13199-13208.  
 Sutton, C.E. et al. 2009. Immunity. 31:331-341.  
 Takekoshi, T et al. 2012. Molecular cancer therapeutics. 11:2516-2525.  
 Tan, J.H et al. 2012. The Journal of biological chemistry. 287:14692-14702.  
 10 Tan, J.H., et al. 2013. The Journal of biological chemistry. 288:10024-10034.  
 Veldkamp, C.T. et al. 2008. Sci Signal. 1:ra4.  
 Zidar, D.A. et al. 2009. Proceedings of the National Academy of Sciences. 106:9649-9654.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Medical College of Wisconsin Volkman, Brian Hwang, Sam Peterson, Francis Getschman, Anthony Imai, Yasutomo

20 <120> Desarrollo de un Dímero Bloqueado Modificado por Ingeniería de la Citocina CCL20 Humana

<130> 650053,00404

<150> 62/170.347

<151> 03/06/2015

25 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1  
 <211> 70  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sintético

<400> 1

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His  
 1 5 10 15

Pro Lys Phe Ile Val Gly Phe Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys  
 20 25 30

Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys  
 35 40 45

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Cys  
 50 55 60

Lys Lys Val Lys Asn Met  
 65 70

40 <210> 2  
 <211> 70  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial

ES 2 776 243 T3

<220>  
<223> Sintético

5 <400> 2

```

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His
 1           5           10           15

Pro Lys Phe Ile Cys Gly Phe Cys Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys
          20           25           30

Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys
          35           40           45

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser
 50           55           60

Lys Lys Val Lys Asn Met
65           70
    
```

<210> 3  
<211> 70  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Sintético

15 <400> 3

```

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His
 1           5           10           15

Pro Lys Phe Ile Val Cys Phe Cys Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys
          20           25           30

Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys
          35           40           45

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser
 50           55           60

Lys Lys Val Lys Asn Met
65           70
    
```

<210> 4  
<211> 70  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Sintético

25

ES 2 776 243 T3

<400> 4

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His  
1 5 10 15

Pro Lys Phe Ile Val Gly Cys Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys  
20 25 30

Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys  
35 40 45

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser  
50 55 60

Lys Lys Val Lys Asn Met  
65 70

5 <210> 5  
<211> 70  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintético

<400> 5

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His  
1 5 10 15

Pro Lys Phe Ile Val Gly Phe Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys  
20 25 30

Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys  
35 40 45

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Cys Arg Leu Leu Ser  
50 55 60

Lys Lys Val Lys Asn Met  
65 70

15 <210> 6  
<211> 70  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintético

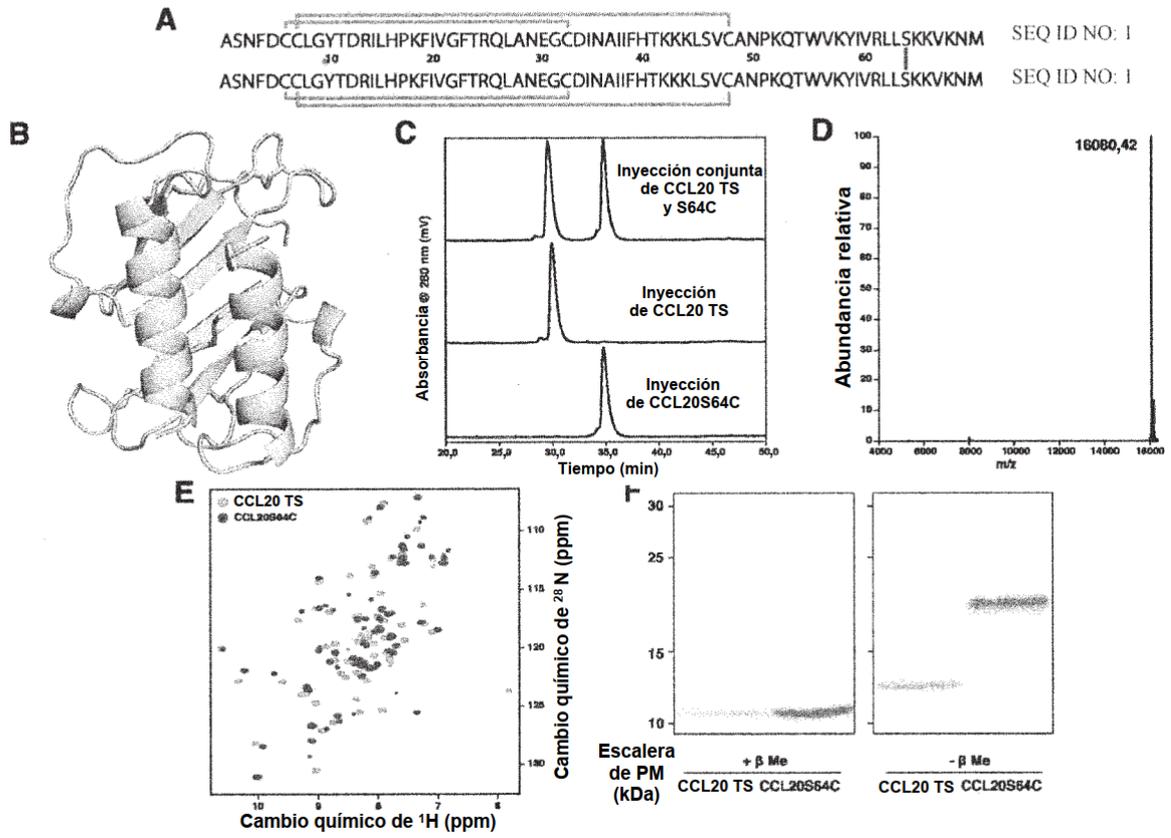
25 <400> 6



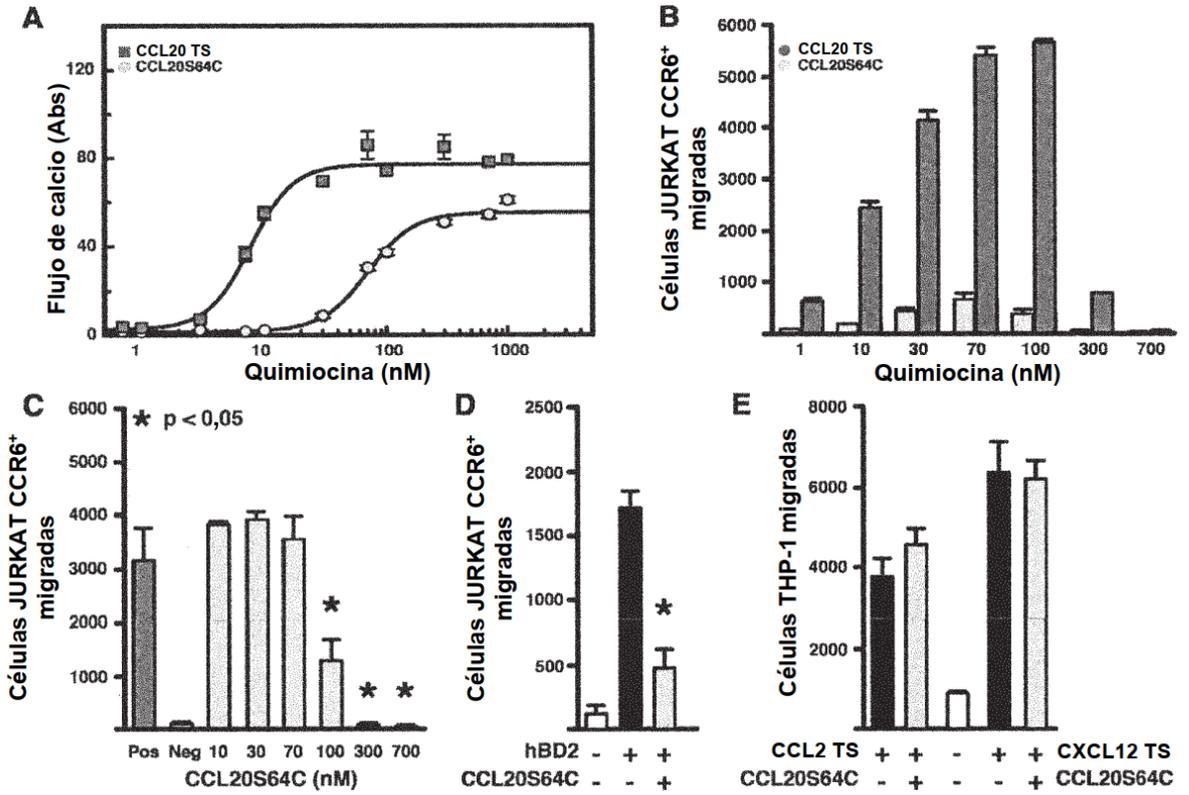
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido de dímero CCL20 bloqueado, en donde el dímero comprende dos monómeros unidos covalentemente entre sí, en donde los dos monómeros tienen cada uno la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1.
2. El polipéptido de dímero CCL20 bloqueado de la reivindicación 1, en donde el dímero consiste en dos monómeros unidos covalentemente entre sí.
- 10 3. El polipéptido de dímero CCL20 de la reivindicación 1 o 2, en donde el enlace covalente es un enlace disulfuro.
4. Una composición que comprende el polipéptido de dímero CCL20 de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. Un kit que comprende el polipéptido de dímero CCL20 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un transportador o diluyentes farmacéuticamente aceptables y material de instrucción.
- 20 6. Un polipéptido de dímero CCL20 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto.
7. Un polipéptido de dímero CCL20 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método para tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto.
- 25 8. El dímero CCL20 para su uso en el método de la reivindicación 7, en donde la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, eccema y artritis reumatoide.
9. El dímero CCL20 para su uso en el método de la reivindicación 8, en donde la enfermedad inflamatoria es psoriasis.
- 30 10. Un polipéptido de dímero CCL20 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método para tratar psoriasis en un sujeto el dímero comprende dos monómeros unidos covalentemente entre sí.
11. El polipéptido de dímero CCL20 para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el sujeto es un ser humano.

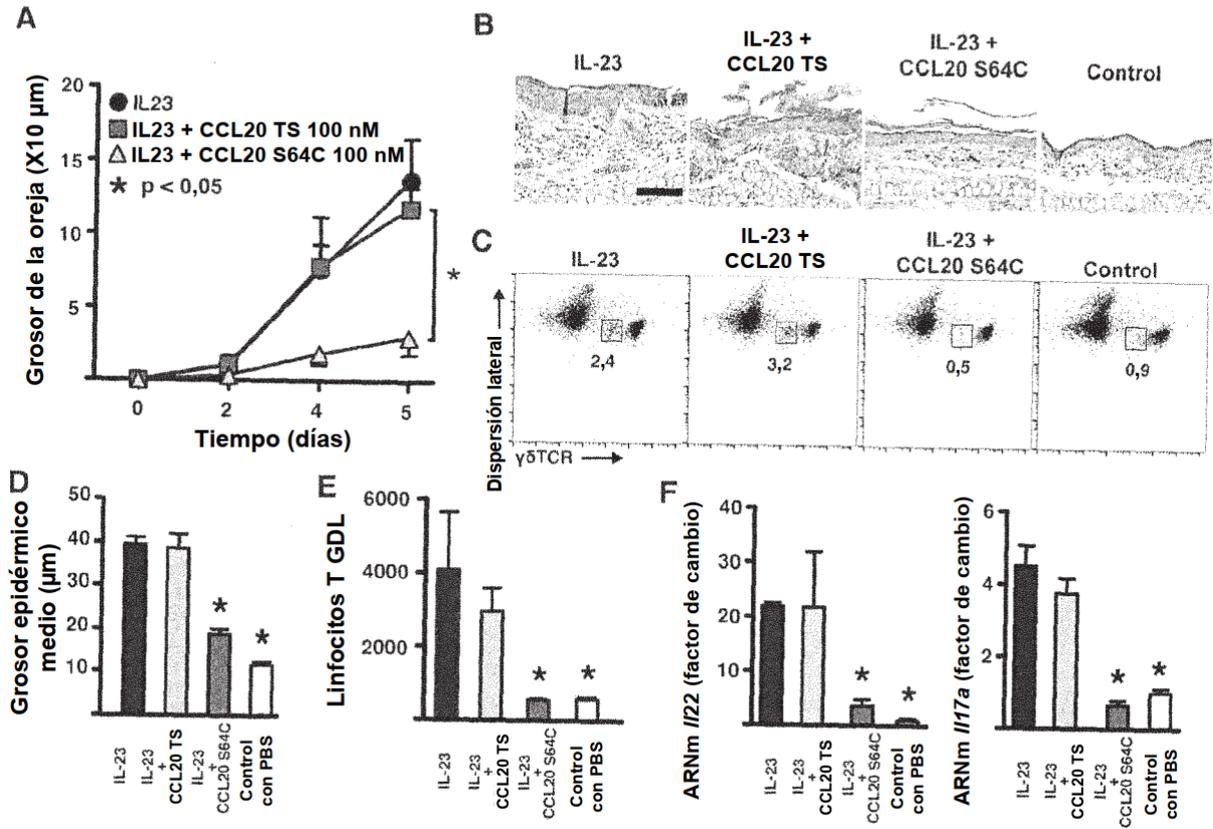
Figuras 1 A-F



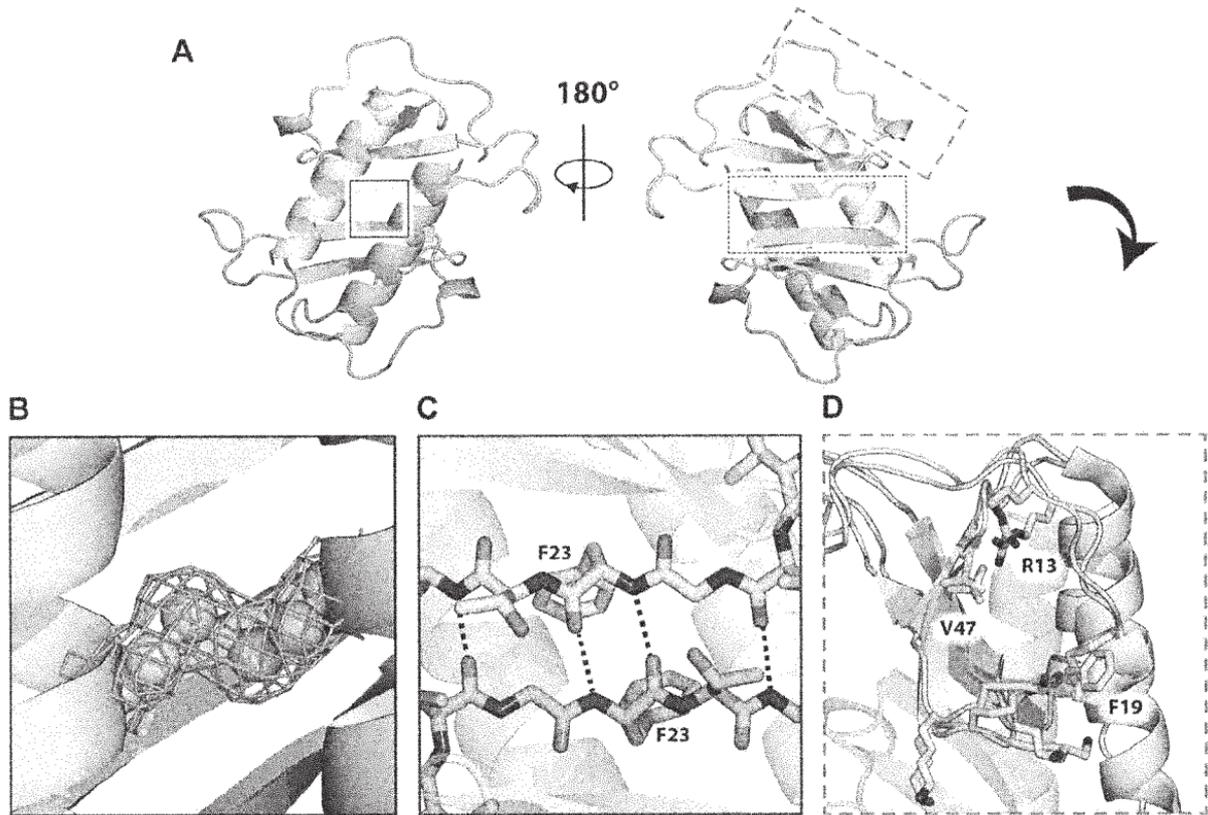
Figuras 2 A-E



Figuras 3 A-F



Figuras 4 A-D



Figuras 5 A-E

