

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 876 947**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2016 PCT/US2016/017714**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16130899**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2016 E 16749945 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021 EP 3256144**

54 Título: **Inhibición con péptidos de enfermedades o afecciones mediadas por CCR3**

30 Prioridad:

13.02.2015 US 201562115880 P

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

15.11.2021

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ILLINOIS (100.0%)
352 Henry Administration Building, 506 South
Wright Street
Urbana, IL 61801, US**

72 Inventor/es:

**ACKERMAN, STEVEN, J.;
LAFHEY, FAN, GAO;
HITCHINSON, BEN;
GARNIER, BORIS;
GAPONENKO, VADIM;
TARASOVA, NADYA y
ABDELKARIM, HAZEM**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 876 947 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

Inhibición con péptidos de enfermedades o afecciones mediadas por CCR3

5 Antecedentes

En los trastornos alérgicos tales como el asma y la esofagitis eosinofílica (EoE), los eosinófilos se reclutan en el pulmón y el esófago, respectivamente, y se activan en exceso en estos sitios de inflamación. Los eosinófilos están implicados como uno de los principales tipos de células efectoras que contribuyen a la patología de estas enfermedades. La señalización a través del receptor 3 de quimiocinas C-C (CCR3), un receptor acoplado a proteína G (GPCR), es un proceso crítico responsable del reclutamiento de los eosinófilos.

Si bien CCR3 se expresa en mayor medida por los eosinófilos, también lo expresan los basófilos y subconjuntos de mastocitos y células Th2. Estos pueden ser activado por una variedad de quimiocinas que incluyen, entre otras, las eotaxinas (CCL11, CCL24, CCL26), RANTES (CCL5), MEC (CCL28), MCP-3 y MCP-4. La activación y desensibilización desencadenada por la unión del ligando no se ha investigado exhaustivamente para CCR3. Sin embargo, se ha demostrado que la activación de CCR3 por las eotaxinas y RANTES da como resultado la movilización de calcio, la activación de las vías MAPK/ERK1/2 y MAPK/p38 y la activación de la vía PI3K/AKT. La activación de estas vías de señalización intracelular culmina en el cebado, quimiotaxis, activación y degranulación de eosinófilos. Al mismo tiempo, CCR3 se internaliza y al menos se degrada parcialmente. También se ha demostrado que la internalización de CCR3 inducida por eotaxinas es necesaria para la polimerización y quimiotaxis de la actina.

La importancia de CCR3 como posible blanco terapéutico se ha establecido a través de las observaciones de que los ratones sin CCR3 y los ratones con doble knock-out de eotaxina-1 y -2 se muestran cerca de una abolición casi completa del reclutamiento de eosinófilos inducido por alérgenos en las vías respiratorias Fulkerson y otros (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 103: 16418-16423). También hay un aumento de los niveles de proteína y CCR3 transcrito en la mucosa bronquial de pacientes con asma alérgica (Ying y otros (1997) Eur. J. Immunol. 27:3507-3516). En consonancia con esto, se han realizado esfuerzos para desarrollar antagonistas de CCR3 de molécula pequeña. Por ejemplo, inhibidores competitivos de molécula pequeña de CCR3 tales como UCB35625 (1,4-trans-1-(1-ciclooctano-1-ilmetil)-4-[[[(2,7-dicloro-9H-xanten-9-il) yoduro de carbonil] amino]-1-etilpiperidina), GW766994 (1-(4-acetil-bencil)-3-[4-(3,4-dicloro-bencil)-morfolina-2-ilmetil]-urea) y SB328437 (Se han descrito éster metílico de N-(1-naftalenilcarbonil)-4-nitro-L-fenilalanina). Sin embargo, estas moléculas son típicamente antagonistas imparciales que inhiben tanto la quimiotaxis como la internalización del receptor (endocitosis), lo que lleva a la acumulación del receptor en la superficie celular. Como resultado, tales antagonistas pierden su potencia después de una administración prolongada, un fenómeno comúnmente conocido como tolerancia a fármacos.

Además, WO 1999/043711 y US 7,105,488 describen péptidos transmembrana CCR3 monoméricos tales como LLFLVTLPFWIHYVRGHNWVFGDD (SEQ ID NO:1), FGVITSIVTWGLAVLAALPEFIFYETED (SEQ ID NO:2), IFVXMAVFFIFWTPYNVAILSSYQSDD (SEQ ID NO:3, X = T o I), y DDLVMLVTEVIAYSHCCMNPIYAFV (SEQ ID NO:4), que se insertan en una membrana con la misma orientación que el dominio transmembrana del que se deriva, y modulan la actividad biológica de GPCR. Se sugiere que los derivados de péptidos tales como modificaciones postraduccionales y la adición de residuos cargados a los extremos del péptido mejoran la solubilidad, mientras que la generación de peptidomiméticos se describe para aumentar la resistencia a la degradación por enzimas proteolíticas.

Laffey y otros (Revista de Alergia e Inmunología Clínica, 135 (2), Suplemento S, página AB160) se refiere al desarrollo de un nuevo inhibidor de nanopartículas peptídicas para la migración de eosinófilos mediada por CCR3/eotaxinas humana.

US 2007/031940 se refiere a métodos *in vivo* e *in vitro*, agentes y ensayos de selección de compuestos para inducir la diferenciación de células de mamífero indiferenciadas en osteoblastos, incluidas las composiciones farmacéuticas que mejoran la formación ósea, y el uso de las mismas para tratar y/o prevenir una enfermedad que implica una disminución sistémica o local de la densidad ósea media en un sujeto.

WO 02/40720 se refiere a ácidos nucleicos y polipéptidos recientemente identificados presentes en células de ovario normales y neoplásicas, incluidos fragmentos, variantes y derivados de los ácidos nucleicos y polipéptidos. La presente invención también se refiere a anticuerpos contra los polipéptidos de la invención, así como a agonistas y antagonistas de los polipéptidos de los mismos. WO 02/40720 también se refiere a composiciones que comprenden los ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos, variantes, derivados, agonistas y antagonistas de los mismos y métodos para el uso de estas composiciones. Estos usos incluyen identificar, diagnosticar, monitorizar, estadificar, formar imágenes y tratar el cáncer de ovario y estados patológicos no cancerosos en el tejido ovárico, identificar el tejido ovárico, monitorizar e identificar y/o diseñar agonistas y antagonistas de sus polipéptidos. Estos usos también incluyen terapia génica, producción de animales y células transgénicas y producción de tejido ovárico modificado para tratamiento e investigación.

Resumen de la Invención

Esta invención es un análogo peptídico del receptor 3 de quimiocinas C-C (CCR3) que tiene la secuencia de aminoácidos Xaa₁-Leu-Phe-Leu-Xaa₂-Thr-Xaa₃-Xaa₄-Phe-Trp-Ile-His-Tyr (SEQ ID NO:15), en donde Xaa₁ indica Phe o Leu, Xaa₂ indica Leu o Val, Xaa₃ indica Leu o Val, y Xaa₄ indica Pro o Val, y dicha secuencia de aminoácidos incluye dos o más modificaciones seleccionadas del grupo de lipidación, carboxilación glicosilación, sulfonación, amidación, PEGilación, miristoilación, biotinilación, la formación de disulfuro y la adición de aminoácidos cargados de residuos, en donde el péptido análogo comprende la secuencia del amino ácido LLFLVTLPFWIHVVRGHNWVFGHDDD (SEQ ID NO:20) o LLFLVTLPFWIHVVRGHNWVFGHDDD-PEG₂₇-NH₂ (SEQ ID NO:21) o la secuencia de aminoácidos LLFLVTLPFWIHVVRGHNWVFGH (SEQ ID NO:18).

. En algunas realizaciones, el análogo peptídico tiene una longitud de hasta 30 o 50 residuos de aminoácidos. En otras realizaciones, el análogo peptídico tiene la secuencia de aminoácidos LLFLVTLPFWIHVVRGHNWVFGHDDD (SEQ ID NO:20). Se describe un análogo peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos LLNLAISDLLFLVTLPFWIHVYDDDC (SEQ ID NO:19). En realizaciones demás, el péptido PEGilado tiene entre 5 y 50 unidades de PEG. En realizaciones particulares, el análogo peptídico de CCR3 es LLFLVTLPFWIHVVRGHNWVFGHDDD-PEG₂₇-NH₂ (SEQ ID NO:21). También se proporciona una composición de nanopartículas que contiene el análogo peptídico de CCR3, así como una composición farmacéutica y un inhalador de dosis medida que lo contiene. En determinadas realizaciones, la composición de nanopartículas incluye además un segundo agente terapéutico.

Esta invención también es una composición farmacéutica que contiene el análogo peptídico de CCR3 o nanopartículas del mismo para su uso en un método para tratar, prevenir o aminorar uno o más síntomas de una enfermedad o afección mediada por eosinófilos o CCR3 administrándola a un sujeto una cantidad efectiva de la composición farmacéutica que contiene el análogo peptídico de CCR3 o nanopartículas del mismo. En algunas realizaciones, la composición se administra a los pulmones del sujeto, por ejemplo, mediante nebulización. En otras realizaciones, la composición se administra por el esófago, por ejemplo, mediante una preparación viscosa oral que recubre el esófago.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra un histograma de distribución de regularización de dispersión de luz dinámica para una solución de péptido R-3-2-1 de 0,4 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Las Figuras 2A y 2B muestran que R3-2-1 (2 y 10 μ M) inhibe la activación de la vía MAPK por RANTES (Figura 2A) y eotaxinas (Figura 2B) como se muestra por la inhibición de la fosforilación de ERK1/2. Se detectó fosfo-ERK usando un anticuerpo específico. La membrana se quitó y se volvió a analizar para ERK1/2 total como control. Las inmunotransferencias se cuantificaron mediante densitometría mediante el uso de ImageJ. PD: PD184161, inhibidor de MEK.

La Figura 3 muestra que R3-2-1 inhibe la quimiotaxis mediada por CCR3 inducida por múltiples ligandos. En las células AML14.3D10-CCR3, R3-2-1 (0,4, 2 o 10 μ M) inhibe la quimiotaxis inducida por Eotaxinas/CCL11, RANTES/CCL5 y MEC/CCL28 de una manera dependiente de la dosis. R3-2-1 (2, 10 o 50 μ M) es igualmente capaz de inhibir la quimiotaxis de los eosinófilos en sangre. SB:SB328437, inhibidor de CCR3 competitivo. UCB: UCB35625, inhibidor de CCR3 no selectivo. Las barras de error muestran SEM. * $p < 0,05$, en comparación con las células inducidas por quimiocinas no inhibidas; $n \geq 3$.

Las Figuras 4A-4C muestran que R3-2-1 ejerce su efecto inhibidor en parte, regulando negativamente la superficie CCR3. Como se muestra en la Figura 4A, R3-2-1 (2 o 10 μ M) no inhibe la endocitosis CCR3 inducida por CCL11 en comparación con los antagonistas de CCR3 SB328437 (SB; 10 μ M) y UCB35625 (UCB; 10 μ M). Además, en ausencia del ligando CCR3, solo R3-2-1 disminuye significativamente la expresión de CCR3 de superficie en células AML14.3D10-CCR3 cuantificada por citometría de flujo (Figura 4B). A pesar de ser capaz de inducir la internalización de CCR3, R3-2-1 por sí mismo no es quimiotáctico para las células AML14.3D10-CCR3 (Figura 4C). Las barras de error representan SEM. * $p < 0,05$, en comparación con células no tratadas; $n = 3$.

Las Figuras 5A-5C muestran que R3-2-1 bloquea el reclutamiento de eosinófilos en el esófago en un modelo de ratón con EoE. Los ratones transgénicos L2-IL5 sensibilizados en la piel recibieron tópicos de oxazolona esofágica (OXA) reto por sonda nasogástrica (es decir) los días 5, 8 y 12 (Figura 5A). Se administraron nanopartículas de péptido R3-2-1, péptido de control (R3-2-3) o inhibidor de CCR3 UCB35625 (UCB) inmediatamente antes los días 5, 8, 10 y 12 (Figura 5A). La eosinofilia esofágica se evaluó 24 horas después del último reto y tratamiento con OXA (día 13). R3-2-1 bloqueó significativamente el reclutamiento de eosinófilos en el epitelio esofágico distal (Figura 5B) y el epitelio esofágico total, si bien UCB35625 no tuvo ningún efecto (Figura 5C). Las barras de error representan SEM.

Las Figuras 6A-6E muestran la evaluación por RMN de la unión de R3-2-1 y CCL11/eotaxina-1 a preparaciones de membrana con CCR3. ¹³C HSQC espectros de preparaciones de membrana de CCR3 ¹³C-reductivamente metilado

(0,25mg/ml) se registraron con 1μM CCL11 y 10μM R321. Figura 6A, CCR3 reductivamente metilado (CCR3-K-di¹³CH₃) (gris) y CCR3 reductivamente metilado con CCL11 (negro); Figura 6B, CCR3 reductivamente metilado (CCR3-K-di¹³CH₃) (gris) y CCR3 reductivamente metilado con R321 (negro); Figura 6C, CCR3 reductivamente metilado (CCR3-K-di¹³CH₃) (gris) y CCR3 reductivamente metilado con CCL11 y R321 (negro); Figura 6D, CCR3 metilado reductivamente con CCL11 (gris) y CCR3 metilado reductivamente con CCL11 y R321 (negro); y la Figura 6D, CCR3 reductivamente metilado con R321 (gris) y CCR3 reductivamente metilado con CCL11 y R321 (negro) muestran cambios de desplazamiento químico indicativos de la unión. Las flechas negras indican las diferencias en los cambios químicos.

La Figura 7 muestra el protocolo del modelo de asma de ratón alérgico al triple antígeno (DRA) en ratones C57BL6 o Balb/c de tipo salvaje sensibilizados y retados. Se muestra la sensibilización/reto, el tratamiento con nanopartículas, mezcla de péptidos CCR3 R3-2-1, el péptido R3-2-1 codificado, los antagonistas de moléculas pequeñas y los controles de vehículos, y el registro de recolección de tejidos. Para el tratamiento intranasal con péptido R3-2-1 y controles, el protocolo se extiende, los ratones se tratan los días 11, 13 y 15 un día antes de cada reto con alérgenos los días 12, 14 y 16, con sangre, BAL y tejido pulmonar recolectado el día 17.

Descripción detallada de la Invención

Muchos antagonistas de CCR3 de molécula pequeña, tales como UCB35625, se caracterizan por ser antagonistas completos (Sabroe y otros (2000) J. Biol. Chem. 275: 25985). Es decir, actúan para inhibir tanto la rama de activación como la de desensibilización y degradación de la señalización de CCR3 después de la unión del ligando. En este escenario, la célula aumenta en la densidad de receptores de superficie a medida que el proceso de renovación basal continúa produciendo nuevos receptores. La acumulación de receptores probablemente explica el éxito limitado *in vivo* observado con tales antagonistas (Vecino, y otros (2014) Clin. Exp. Alergia 44:508-516) ya que los eosinófilos eventualmente superan la inhibición y se vuelven resistentes.

Ahora se ha demostrado que un análogo peptídico de la segunda hélice transmembrana de CCR3, denominado en la presente descripción R3-2-1, exhibe antagonismo sesgado al unirse y promover la internalización (endocitosis) y degradación de CCR3 si bien al mismo tiempo inhibe la señalización mediada de CCR3 y la quimiotaxis. Es importante señalar que el análogo peptídico R3-2-1 se autoensambla en medio acuoso en nanopartículas de tamaño uniforme (Figura 1), protegiendo así al péptido de la degradación proteolítica en sangre y otros fluidos corporales, e inhibe la transducción de señales CCR3, incluida la activación de Gai y la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la estimulación con eotaxinas o RANTES (Figuras 2A y 2B). Además, el análogo peptídico R3-2-1 atenúa la quimiotaxis y la degranulación mediadas por CCR3 *in vitro* (Figura 3) e *in vivo* (Figura 5A-5C). Por consiguiente, la presente invención proporciona el análogo peptídico de CCR3, así como composiciones y usos, del análogo peptídico para inhibir la actividad de CCR3 y tratar enfermedades.

Para los propósitos de esta invención, un "péptido" se refiere generalmente a una simple cadena lineal de residuos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces amida. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser el isómero D o L. En algunas realizaciones, el análogo peptídico de la invención tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50, 40 o 30 residuos de aminoácidos. En otras realizaciones, un análogo peptídico de la invención tiene entre 13 y 50, 13 y 40, o 13 y 30 residuos de aminoácidos. En realizaciones particulares, el análogo peptídico de la invención tiene hasta 30 residuos de aminoácidos.

La proteína del receptor 3 de quimiocinas C-C (CCR3, también conocida como CD193) es una proteína altamente conservada que se une y responde a una variedad de quimiocinas, incluyendo eotaxinas (CCL11), eotaxina-2 (CCL24), eotaxina-3 (CCL26), MCP -3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), MEC (CCL28) y RANTES (CCL5). La secuencia de aminoácidos de las proteínas CCR3 de mamífero que son conocidas y fácilmente disponibles en GENBANK incluyen, pero no se limitan a, NP_847899,1 (*Homo sapiens*), XP_001149443,1 (*Pan troglodytes*), NP_001040605,1 (*Macaca mulatta*), NP_001005261,1 (*Canis lupus*), NP_001181889,1 (*Bos taurus*), NP_034044,3 (*Mus musculus*), NP_446410,1 (*Rattus norvegicus*), NP_001001620 (*Sus scrofa*) y NP_001128600 (*Oryctolagus cuniculus*). El análogo peptídico de CCR3 de esta invención se deriva de la proteína CCR3 de mamífero e incluye todo o una parte del segundo dominio transmembrana y una parte del bucle extracelular a partir de entonces (Tabla 1).

Tabla 1

Especies	2 ^{do} dominio transmembrana/secuencia de bucle extracelular	SEQ ID NO:
<i>H. sapiens</i>	<u>LLNLAISDLLFLVTLFPWIHY</u> VRGHNWVFGH	5
<i>P. troglodytes</i>	<u>LLNLAISDLLFLFTLPFIWIHY</u> VRGHNWVFGH	6
<i>M. mulatta</i>	<u>LLNLAISDLLFLFTLPFIWIHY</u> VRERNWVFSH	7
<i>C. lupus</i>	<u>LLNLAISDLLFLFTLVFIWIHY</u> TGWNDWVFGH	8
<i>B. tauro</i>	<u>LLNLAISDVLFLLTLPFIWIHY</u> VRWNEWVFGH	9
<i>M. musculus</i>	<u>LFNLAISDLLFLFTVPFIWIHY</u> VLWNEWGFGH	10
<i>R. norvegicus</i>	<u>LLNLAISDLLFLFTVPFIWIHY</u> VLWNEWGFGH	11
<i>S. scrofa</i>	<u>LFNLAISDLLFLFTLPFIWIHY</u> ILRKEWGFGH	12
<i>O. cuniculus</i>	<u>LFNLAISDLLFLFTLPFIWIHY</u> VRWNEWVDFS	13
Consenso	<u>LXNLAISDXLFLXTXXFIWIHY</u> XXXXXWXFXX	14
A = Ala o alanina; R = Arg o arginina; N = Asn o asparagina; D = Asp o ácido aspártico; C = Cys o cisteína; E = Glu o ácido glutámico; Q = Gln o glutamina; G = Gly o glicina; H = His o histidina; I = Ile o isoleucina; L = Leu o leucina; K = Lys o lisina; M = Met o metionina; F = Phe o fenilalanina; P = Pro o prolina; S = Ser o serina; T = Thr o treonina; W = Trp o triptófano; Y = Tyr o tirosina; y V = Val o valina.		

Más específicamente, el análogo peptídico de CCR3 de esta invención tiene una secuencia que incluye la secuencia transmembrana Xaa₁-Leu-Phe-Leu-Xaa₂-Thr-Xaa₃-Xaa₄-Phe-Trp-Ile-His-Tyr (SEQ ID NO:15), en donde Xaa₁ indica Val o Leu, Xaa₂ indica Phe o Val, Xaa₃ indica Leu o Val, y Xaa₄ indica Pro o Val. El análogo peptídico de CCR3 de esta invención puede ser un péptido de 20 a 30 residuos de aminoácidos que incluye la secuencia transmembrana de SEQ ID NO:15. El análogo peptídico de CCR3 puede incluir la secuencia LLFLVTLFPWIHY (SEQ ID NO:16). El análogo peptídico de CCR3 puede incluir la secuencia establecida en SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16 y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos consecutivos adicionales como se establece en la Tabla 1 en el N-terminal, C-terminal o ambos. El análogo peptídico de CCR3 puede incluir la secuencia de aminoácidos LLNLAISDLLFLVTLFPWIHY (SEQ ID NO:17) o LLFLVTLFPWIHYVRGHNWVFGH (SEQ ID NO:18). En determinadas realizaciones, el péptido análogo es la secuencia de aminoácidos LLFLVTLFPWIHYVRGHNWVFGH (SEQ ID NO:18).

El análogo peptídico de CCR3 de la invención puede incluir además una o más delecciones, adiciones y/o sustituciones de la secuencia de aminoácidos nativa pero conserva al menos una propiedad funcional del péptido nativo.

Para uso terapéutico, el análogo peptídico de CCR3 de esta invención incluye dos o más modificaciones a la secuencia del péptido CCR3 nativo presentada en la Tabla 1, que aumentan la resistencia a la degradación proteolítica, facilitan el autoensamblaje en nanopartículas, aumentan la estabilidad, aumentan la vida útil, aumentan la biodisponibilidad, reducen la toxicidad y/o facilitan la inserción en una membrana. En particular, el análogo peptídico de CCR3 de la presente invención incluye dos o más modificaciones seleccionadas del grupo de lipidación, carboxilación, glicosilación, sulfonación, amidación, PEGilación, miristoilación, biotilación, formación de disulfuro y adición de residuos de aminoácidos cargados. El análogo peptídico de CCR3 puede incluir además un grupo acetilo en el extremo N-terminal.

La lipidación del análogo peptídico de CCR3 se refiere a la unión covalente de un grupo lipófilo al péptido CCR3. El grupo lipófilo puede ser un hidrocarburo saturado o insaturado de cadena lineal o ramificada que incluye entre aproximadamente uno y 90 carbonos, por ejemplo entre aproximadamente 4 y 30 carbonos, o alternativamente entre aproximadamente 10 y 20 carbonos, y más preferiblemente es un C₄-C₃₀ hidrocarburo de cadena lineal. Otros grupos lipofílicos incluyen esteroides, terpenos, vitaminas liposolubles, fitoesteres, terpenoides, fosfolípidos, gliceroles y grasas naturales o sintéticas. El grupo lipófilo puede unirse al péptido CCR3 directamente o mediante un grupo de enlace. Por ejemplo, el ácido 5-amino valérico, el ácido 8-amino octanoico o el ácido 2-amino decanoico pueden unirse al extremo N- y/o C-terminal del péptido CCR3.

La carboxilación se refiere a la gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico y la glicosilación se refiere a la unión de uno o más azúcares (por ejemplo, N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa) a través de enlaces N- u O- del Péptido CCR3. La sulfonación se refiere a la transferencia del grupo sulfonato (SO₃⁻¹) de 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato. La sulfonación puede ocurrir a través de varios tipos de enlaces, ésteres (O-sulfonación), amidas (N-sulfonación) y tioésteres (S-sulfonación).

La amidación se refiere a la adición de un grupo amida al final del poli péptido. Se han descrito varios métodos para amidar una proteína, incluido el uso de una enzima α-amidante (Beaudry y otros (1990) J. Biol. Chem. 265 (29): 17694-17699; US 4,708,934); proteasas US 4,709,014; US 5,580,751); compuestos de carbodiimida, un agente de

captura y una fuente de amina (5,503,989 de EE.UU.); y métodos recombinantes (WO 1998/050563). El análogo peptídico de CCR3 de esta invención puede incluir amidación C-terminal.

La formación de un disulfuro en un péptido CCR3 puede incluir la formación de enlaces disulfuro intramolecular o intermolecular entre residuos de cisteína de uno o dos péptidos CCR3, respectivamente. Al respecto, se pueden introducir uno o dos residuos de cisteína en un análogo peptídico de CCR3 de esta invención. Una vez que se introducen uno o dos residuos de cisteína en el péptido, el péptido puede someterse a un proceso oxidativo utilizando un agente oxidante para formar el enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína. Los agentes oxidantes incluyen, pero no limitan, aire (du Vigneaud y otros (1954) J. Am. Chem. Soc. 76: 3115-21), ferricianuro de potasio (Hope y otros (1962) J. Biol. Chem. 237:1563-6), yodo (Flouret y otros (1979) Int. J. Pept. Prot. Res. 13:137-41), trifluoroacetato de talio (Fuji y otros (1987) J. Chem. Soc., Chem. Comun. 21: 1676-78) o dimetilsulfóxido (Tam y otros (1991) J. Am. Chem. Soc. 113:6657-62). El análogo peptídico de CCR3 de esta invención puede incluir un residuo de cisteína C-terminal para la formación de disulfuro intermolecular.

"PEGilación" se refiere a la reacción en la que al menos un resto de polietilenglicol (PEG), independientemente del tamaño, se une químicamente al péptido CCR3 para formar un conjugado PEG-péptido. El PEG, en su forma más común, es un polímero lineal que tiene grupos hidroxilo en cada extremo: HO-CH₂-CH₂O (CH₂-CH₂O)_n CH₂CH₂-OH, en donde CH₂CH₂O representa la unidad del monómero de repetición de PEG. De acuerdo con la presente invención, se une un PEG lineal corto al terminal C y/o N del péptido CCR3. En realizaciones particulares, el componente PEG del análogo peptídico de CCR3 contiene de 5 a 50 unidades de monómeros de PEG, es decir, (-CH₂CH₂O-)_n, en donde n es de 5 a 50. En otras realizaciones, el análogo peptídico de CCR3 incluye hasta 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 unidades de PEG. En determinadas realizaciones, el análogo peptídico de CCR3 tiene entre 20 y 30 unidades de PEG. En una realización particular, el análogo peptídico de CCR3 tiene hasta 30 unidades de PEG. El PEG puede vincularse o unirse al residuo de aminoácido C- y/o N-terminal del péptido CCR3 mediante una vía de síntesis en fase sólida, por ejemplo, mediante el empleo de componentes básicos de PEG tales como O-(N-Fmoc-2-aminoetil)-O-(2carboxietil)-undecaetilenglicol disponible de fuentes comerciales tales como EMD Biosciences (La Jolla, CA).

La miristoilación se refiere a una modificación de la lipidación en la que un grupo miristoílo, derivado del ácido mirístico, se une covalentemente mediante un enlace amida al extremo N-terminal del péptido CCR3. Esta modificación puede añadirse co-traduccionalmente o post-traduccionalmente como por ejemplo, N-miristoiltransferasa (NMT) que cataliza la adición de ácido mirístico. El péptido CCR3 puede miristoilarse en el residuo de aminoácido N-terminal para facilitar la entrada del péptido en la célula.

El péptido CCR3 puede incluir la adición de entre 1 y 10 residuos de aminoácidos cargados en el extremo C-terminal. La carga del residuo de aminoácido que se pretende incluir en el ácido aspártico (Asp o D) o ácido glutámico (Glu o E), que contienen un grupo α-amino que está protonado -⁺NH₃ formado bajo condiciones biológicas. El péptido CCR3 puede incluir entre 1 y 7, 1 y 5, 1 y 4, o 1 y 3 residuos de aminoácidos cargados en el extremo C-terminal. Más particularmente, el péptido CCR3 incluye entre 1 y 7, 1 y 5, 1 y 4, o 1 y 3 residuos de ácido aspártico en el extremo C-terminal. Un análogo peptídico de CCR3 ilustrativo de la presente invención que incluye residuos de aminoácidos cargados adicionales incluye LLFLVTLPFWIHYVRGHNWVFGHDDD (SEQ ID NO:20). Se describe un análogo peptídico de CCR3 que incluye residuos de aminoácidos cargados adicionales como LLNLAISDLLFLVTLPFWIHYDDDC (SEQ ID NO:19).

A menos que se indique lo contrario, las modificaciones antes mencionadas del análogo peptídico de CCR3 pueden ocurrir en cualquier parte de la secuencia peptídica, incluyendo el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos, el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o una combinación de los mismos. Pueden producirse modificaciones del análogo peptídico de CCR3 en el C-terminal del péptido CCR3.

En realizaciones particulares, el análogo peptídico de CCR3 de la invención incluye una combinación de dos o más de PEGilación, miristoilación, biotilación, formación de disulfuro y adición de residuos de aminoácidos cargados. El análogo peptídico de CCR3 puede estar amidado, PEGilado y tiene residuos de aminoácidos cargados adicionales. En la Tabla 2 se proporcionan análogos peptídicos de CCR3 ilustrativos. El análogo peptídico de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos LLFLVTLPFWIHYVRGHNWVFGHDDD (SEQ ID NO: 20) o LLFLVTLPFWIHYVRGHNWVFGHDDD-PEG₂₇ -NH₂ (SEQ ID NO:21) o es la secuencia de aminoácidos LLFLVHVYFGHGHW (SEQ ID NO:18).

TABLA 2

Análogo peptídico de CCR3	SEQ ID NO:
LLFLVTLPFWIHYVRGHNWVFGHDDD- (CH ₂ CH ₂ O) ₂₇ -NH ₂	21
LLNLAISDLLFLVTLPFWIHYDDDC	19
LLFLVTLPFWIHYVRGHNWVFGHDDDC	22
LLNLAISDLLFLVTLPFWIHYDDD- (CH ₂ CH ₂ O) ₂₇ -NH ₂	23

El péptido CCR3 de la invención se puede sintetizar de forma recombinante usando técnicas de ADN recombinante. Por tanto, la invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican el péptido CCR3 de la invención, así como un vector, en particular un vector de expresión, que incluye los ácidos nucleicos que codifican el péptido CCR3 de la invención. El vector puede proporcionar secuencias reguladoras de replicación, transcripción y/o traducción que faciliten la síntesis recombinante del péptido en una célula eucariota (por ejemplo, una levadura, insecto o célula animal) o una célula procariota (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*). Por consiguiente, se describen células huésped para la expresión recombinante del péptido y métodos de recolección y purificación del péptido CCR3 producido por las células huésped. La producción y purificación de péptidos recombinantes es una práctica rutinaria para un experto en la técnica.

Alternativamente, el péptido CCR3 de la invención se puede sintetizar químicamente mediante cualquier técnica usada de forma rutinaria, particularmente técnicas de síntesis en fase sólida, por ejemplo, usando sintetizadores de péptidos automatizados disponibles comercialmente. Ver, por ejemplo, Stewart & Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2da ed., Pierce Chemical Co.; Tarn y otros (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105:6442; Merrifield (1986) *Science* 232:341-347.; Barany y otros (1987) *Int. Péptido Proteína Res.* 30:705-739; y 5.424.398.

El péptido puede fusionarse con una proteína o etiqueta de purificación tal como proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, 6His, FLAG, o HA, para facilitar la detección y/o purificación. A modo de ilustración, se puede incorporar un residuo Cys en el péptido CCR3, en donde el lado N-terminal del residuo Cys está tioesterificado y la etiqueta se une al lado C-terminal. Tras la purificación, se corta la etiqueta y se obtiene eficazmente el tioéster de péptido.

El péptido puede purificarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica que incluye, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtro, ultrafiltración, filtración en gel, electroforesis, salado, diálisis y similares. El péptido CCR3 se puede purificar mediante cromatografía de fase inversa. Cuando el péptido de la invención se produce en forma de proteína de fusión, el resto de la fusión (o etiqueta) se puede escindir opcionalmente usando una proteasa además de un análisis adicional.

Como se indica en la presente descripción, el análogo peptídico de CCR3 se autoensambla en medio acuoso en nanopartículas altamente homogéneas. Los análisis de dispersión de luz dinámica indican que el radio de las nanopartículas instantáneas está en el rango de 1 a 100nm, más específicamente alrededor de 8nm (Figura 1). Según el tamaño y la composición, las nanopartículas facilitan la translocación del péptido a través de la membrana plasmática y protegen al péptido de la degradación en la sangre/suero. Por consiguiente, esta invención también proporciona una composición de nanopartículas que contiene el análogo peptídico de CC3 así como el uso de la composición de nanopartículas para antagonizar CCR3 y en el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como asma y esofagitis eosinofílica.

Para aplicaciones terapéuticas, el análogo peptídico de CCR3 y su nanopartículas se proporcionan preferiblemente en composiciones farmacéuticas que contienen un portador farmacéuticamente aceptable. Los materiales portadores aceptables preferiblemente no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición.

Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como el sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como PLURONICS, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbato tales como POLISORBATO 20 y POLISORBATO 80, TRITON, lecitina o colesterol); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol o sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Ver, por ejemplo, Remington: La ciencia y la práctica de la farmacia, Lippincott Williams & Wilkins, 21ra edición (2005).

El vehículo o portador principal en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en las composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero

son además vehículos ilustrativos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5 o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Id.*) En forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, el análogo peptídico de CCR3 y su nanopartícula se pueden formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción pueden formularse especialmente para administración oral en forma sólida o líquida o para inyección intravenosa. Al respecto, el análogo peptídico de CCR3 y su nanopartícula se pueden incorporar en una forma de dosificación sistémica convencional, tal como un comprimido, cápsula, cápsula de gelatina blanda, elixir o formulación inyectable. Las formas de dosificación también pueden incluir el material portador, excipiente, lubricante, tampón, tensioactivo, antibacteriano, agente de carga (tal como manitol), antioxidantes (ácido ascórbico o bisulfito de sodio) fisiológicamente aceptable necesario o similares.

Las vías de administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen por vía oral; inhalado a través de nebulizadores; aplicado tópicamente mediante, por ejemplo, gotas para los ojos o aerosoles nasales; por vía transdérmica; mediante inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante inyección en bolo o de forma continua mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación. La composición farmacéutica también se puede administrar localmente mediante la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se haya absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bolo de liberación programada o administración continua.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por vía parenteral. Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para usar en esta invención pueden estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que contiene el análogo peptídico de CCR3 en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que el análogo peptídico de CCR3 se formula como una solución isotónica estéril, apropiadamente conservada. La preparación puede implicar la formulación del análogo peptídico de CCR3 con un agente, tal como una microesfera inyectable, una partícula bio-erosionable, un compuesto polimérico (tal como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), una perla o liposoma, que puede proporcionar una concentración controlada o sostenida de la liberación del producto que luego puede administrarse mediante una inyección de depósito. La formulación con ácido hialurónico tiene el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. También se pueden usar dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir el análogo peptídico de CCR3 y su nanopartícula.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a través del tracto digestivo, tales como por vía oral. En determinadas realizaciones, el péptido se administra al esófago del sujeto como una preparación viscosa oral que se ingiere y recubre el esófago con dicho péptido. El análogo peptídico de CCR3 y su nanopartícula también se pueden formular con o sin los portadores que se usan habitualmente en la preparación en formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del análogo peptídico de CCR3 descrito en la presente descripción. También se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegradores de comprimidos y aglutinantes. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares.

En realizaciones particulares, el análogo peptídico de CCR3 y su nanopartícula están optimizados para la administración en aerosol, particularmente al tracto respiratorio, así como la medicación inhalada, siendo la ventaja de la administración local y una mejor penetración tisular. Al respecto, se administra una solución del análogo peptídico de CCR3 y su nanopartícula a los pulmones del sujeto mediante nebulización, utilizando un dispositivo de administración de fármacos (nebulizador) para administrar medicación en forma de niebla inhalada en los pulmones utilizando una boquilla o máscara. Para asegurar el tamaño de partícula adecuado en un aerosol líquido, las partículas se pueden preparar en tamaño respirable y luego incorporarse en una dispersión coloidal que contenga un propulsor como un inhalador de dosis medida (MDI) o aire, tales como en el caso de un polvo seco inhalador (DPI). El ingrediente activo se proporciona en un paquete presurizado con un propulsor adecuado tal como un clorofluorocarbono (CFC) (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluorometano), dióxido de carbono u otro gas adecuado. La dosis de fármaco se puede controlar mediante una válvula reguladora.

Alternativamente, los ingredientes activos se pueden proporcionar en forma de polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del péptido en una base de polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tal como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidina (PVP). El portador de polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosis única, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos, por ejemplo, gelatina o envases tipo blíster desde los cuales se puede administrar el polvo por medio de un inhalador.

Alternativamente, las formulaciones se pueden preparar en forma de solución para evitar la preocupación por el tamaño de partícula adecuado en la formulación. No obstante, las formulaciones en solución deben dispensarse de manera que produzcan partículas o gotitas de tamaño respirable. Para la aplicación de MDI, una vez preparada, una formulación de aerosol se llena en un contenedor de aerosol equipado con una válvula dosificadora. En las manos del paciente, la formulación se dispensa a través de un actuador adaptado para dirigir la dosis desde la válvula al paciente.

Generalmente, las formulaciones de la invención se pueden preparar combinando (i) el análogo peptídico de CCR3 y su nanopartícula en una cantidad suficiente para proporcionar una pluralidad de dosis terapéuticamente efectiva; (ii) el fluido, por ejemplo, propulsor, en una cantidad suficiente para impulsar una pluralidad de dosis, por ejemplo, desde un contenedor de aerosol; (iii) opcionalmente, la adición de agua en una cantidad efectiva para estabilizar además cada una de las formulaciones; y (iv) además cualquier componente opcional, por ejemplo, etanol como co-disolvente; y dispersando los componentes. Los componentes se pueden dispersar usando un mezclador u homogeneizador convencional, mediante agitación o mediante energía ultrasónica, así como mediante el uso de un molino de perlas o un microfluidizador. Las formulaciones a granel se pueden transferir a viales de aerosol individuales más pequeños usando métodos de transferencia de válvula a válvula, llenado a presión o usando métodos convencionales de llenado en frío. No se requiere que un componente usado en una formulación de aerosol en suspensión sea soluble en el fluido portador, por ejemplo, un propulsor. Los componentes que no son suficientemente solubles pueden recubrirse o congelarse con agentes poliméricos de control de la disolución en una cantidad apropiada y las partículas recubiertas pueden incorporarse luego en una formulación como se describe anteriormente. Los agentes poliméricos de control de la disolución adecuados para su uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, copolímero de poliláctido glicólico, ésteres acrílicos, poliamidoaminas, derivados de celulosa sustituidos o no sustituidos y otros productos de hidratos de carbono y polisacáridos de origen natural tales como zeína y quitosano.

Pueden usarse contenedores de aerosol equipados con válvulas convencionales, preferiblemente válvulas dosificadoras, para administrar las formulaciones de la invención. Sin embargo, se ha encontrado que la selección de conjuntos de válvula apropiados para usar con formulaciones de aerosol depende del componente particular y otros adyuvantes usados (si los hay), del fluido, por ejemplo, propelente, y del fármaco particular que se usa. Las gomas de válvula de neopreno y buna convencionales utilizados en válvulas de dosis medidas para administrar formulaciones de CFC convencionales a menudo tienen características de administración en las válvula menos óptimas y son fáciles de operar cuando se usan con formulaciones que contienen HFC-134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) o HFC- 227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano). Por lo tanto, ciertas formulaciones de la invención se dispensan preferiblemente a través de un conjunto de válvula en donde el diafragma está hecho de una goma de nitrilo tal como DB-218 (American Gasket and Rubber, Schiller Park, IL) o una goma EPDM tal como VISTALON (Exxon), ROYALENE (UniRoyal), bunaEP (Bayer). También son adecuados los diafragmas fabricados por extrusión, inyección, molde o molde por compresión a partir de un material elastomérico termoplástico, tal como la poliolefina FLEXOMER GERS 1085 NT (Union Carbide).

Los contenedores de aerosoles convencionales, revestidos o sin revestir, anodizados o no anodizados, por ejemplo, los de aluminio, vidrio, acero inoxidable, polibutilo o tereftalato de polietileno, y botes o botes revestidos con epon, epoxi, etc., se pueden usar para contener una formulación de la invención.

Dado que el análogo peptídico de CCR3 de esta invención se ensambla en una nanopartícula, la nanopartícula puede usarse ventajosamente para administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la composición de nanopartículas incluye además al menos un segundo agente terapéutico. Los segundos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, fármacos esteroides (por ejemplo, aldosterona, beclometasona, betametasona, acetato de desoxicorticosterona, fludrocortisona, hidrocortisona (cortisol), prednisolona, prednisona, metilprednisolona, dexametasona y triamcinolona); agentes antibacterianos (por ejemplo, amoxicilina, carbenicilina, cefaclor, ciprofloxacina, claritromicina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, minociclina, neomicina, penicilina, polimixina B, rifampicina, sulfacetamida, ticaromicina); agentes antifúngicos (por ejemplo, anfotericina B, ciclopirox, clotrimazol, econazol, fluconazol, nistatina y oxiconazol); anticoagulantes (por ejemplo, acenocumarol, argatroban, bivalirudina, lepirudina, fondaparinux, heparina, fenindiona, warfarina y ximelagatrán); trombolíticos (por ejemplo, anistreplasa, reteplasa, t-PA (alteplasa activa), estreptoquinasa, tenecteplasa y uroquinasa), agentes antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, aceclofenaco, acetaminofeno, amoxiciprina, aspirina, azapropazona, benorilato, bromfenaco, carcoprina, salicilato de colina y magnesio, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, etoricoxib, faislamina, fenbufeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, lornoxicam, loxoprofeno, ácido lumiracoxib, meclofenami, nabumetona, naproxeno, nimesulida, oxifenbutazona, parecoxib, fenilbutazona, piroxicam, salicilato de salicilo,

sulindac, sulfinpirazona, suprofen, tenoxicam, ácido tiaprofénico y tolmetina), y agentes antiplaquetarios (por ejemplo, cloidomogrelimab, tirofiplopidol, cloidomogrelimab).

El análogo peptídico de CCR3 y su nanopartícula también se pueden administrar en combinación con otras clases de compuestos, que incluyen, pero no se limitan a, (1) agentes alfa-adrenérgicos; (2) agentes antiarrítmicos; (3) agentes anti-ateroscleróticos, tales como inhibidores de ACAT; (4) agentes anticáncer y agentes citotóxicos, por ejemplo, agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno, alquil sulfonatos, nitrosoureas, etileniminas y triazenos; (5) agentes antidiabéticos, tales como biguanidas (por ejemplo, Metformina), inhibidores de glucosidasa (por ejemplo, Acarbosa), insulinas, meglitinidas (por ejemplo, Repaglinida), sulfonilureas (por ejemplo, Glimepirida, gliburida y glipizida), tiozolidindionas (por ejemplo, troglitazona, rosiglitazona y pioglitazona) y agonistas de PPAR-gamma; (6) antimetabólitos, tales como antagonistas de folato, análogos de purina y análogos de pirimidina; (7) antiproliferativos, tales como metotrexato, FK506 (tacrolimus) y micofenolato de mofetilo; (8) anticuerpos anti-TNF o receptor de TNF soluble, tales como etanercept, rapamicina y leflunimida; (9) inhibidores de α_2 ; (10) agentes beta-adrenérgicos, tales como carvedilol y metoprolol; (11) secuestrantes de ácidos biliares, tales como questrano; (12) bloqueadores de los canales de calcio, tales como besilato de amlodipina; (13) agentes quimioterapéuticos; (14) inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2), tales como celecoxib y rofecoxib; (15) ciclosporinas; (16) fármacos citotóxicos, como azatioprina y ciclofosfamida; (17) diuréticos, tales como clorotiazida, hidroclorotiazida, flumetiazida, hidroflumetiazida, bendroflumetiazida, metilclorotiazida, triclormetiazida, politiazida, benzotiazida, ácido etacrínico, ticrynafeno, clortamida, bidatlamida, fimurosinafeno, mu- (18) inhibidores de la enzima convertidora de endotelina (ECE), tales como el fosforamidón; (19) enzimas, tales como L-asparaginasa; (20) inhibidores del factor VIIa e inhibidores del factor Xa; (21) inhibidores de la farnesil-proteína transferasa; (22) fibratos; (23) inhibidores del factor de crecimiento, tales como moduladores de la actividad de PDGF; (24) secretagogos de la hormona del crecimiento; (25) inhibidores de la HMG CoA reductasa, como pravastatina, lovastatina, atorvastatina, simvastatina, NK-104 (también conocida como itavastatina, nisvastatina o nisbastatina) y ZD-4522 (también conocida como rosuvastatina, atavastatina o visastatina); (26) inhibidores de la endopeptidasa neutra (NEP); (27) agentes hormonales, tales como glucocorticoides (por ejemplo, cortisona), estrógenos/antiestrógenos, andrógenos/antiandrógenos, progestinas y antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante y acetato de octreótido; (28) inmunosupresores; (29) antagonistas del receptor de mineralocorticoides, tales como espironolactona y eplerenona; (30) agentes disruptores de microtúbulos, tales como ecteinascidinas; (31) agentes estabilizadores de microtúbulos, tales como paclitaxel, docetaxel y epotilonas AF; (32) inhibidores de MTP; (33) niacina; (34) inhibidores de la fosfodiesterasa, tales como inhibidores de PDE III (por ejemplo, cilostazol) e inhibidores de PDE V (por ejemplo, sildenafil, tadalafil y vardenafil); (35) productos derivados de plantas, tales como alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas y taxanos; (36) antagonistas del factor activador de plaquetas (PAF); (37) complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino, satraplatino y carboplatino; (38) abridores de canales de potasio; (39) inhibidores de prenilproteína transferasa; (40) inhibidores de proteína tirosina quinasa; (41) inhibidores de renina; (42) inhibidores de la escualeno sintetasa; (43) inhibidores de TNF- α , así como tenidap; (44) inhibidores de trombina, así como hirudina; (45) antagonistas del receptor de tromboxano, como ifetroban; (46) inhibidores de la topoisomerasa; (47) inhibidores de vasopeptidasa (inhibidores duales de NEP-ACE), así como omapatrilat y gemopatrilat; y (48) otros agentes diversos, tales como hidroxiurea, procabazina, mitotano, hexametilmelamina y compuestos de oro.

Los receptores de quimiocinas han sido implicados como mediadores importantes de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas e inmunorreguladoras, incluyendo asma y enfermedades alérgicas, tales como patologías autoinmunes como artritis reumatoide, enfermedad de Grave's, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, degeneración macular relacionada con la edad, y aterosclerosis. En particular, CCR3 se expresa en eosinófilos, basófilos, células TH2, macrófagos alveolares, mastocitos, células epiteliales, células de microglía, astrocitos y fibroblastos y desempeña un papel fundamental en la atracción de eosinófilos a sitios de inflamación alérgica y, posteriormente, en la activación de los mismos. Los eosinófilos se han implicado en la patogenia de varias enfermedades alérgicas, tales como el asma bronquial (Durham y Kay (1985) Clin. Alergia 15: 411-418; Kroegel y otros (1994) J. Allergy Clin. Immunol. 93:725-734), rinitis alérgica (Durham (1998) Clin. Exp. Alergia 28 (Suplemento 2):11-16), dermatitis atópica (Leung (1999) J. Allergy Clin. Immunol. 104:S99-108) y gastroenteritis eosinofílica (Bischoff y otros (1999) Enm. J. Gastro. 94:3521-3529). Por tanto, los antagonistas de CCR3 son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como el asma alérgica y la rinitis alérgica mediada por eosinófilos. Además, los antagonistas de CCR3 también son útiles para bloquear la infección de células que expresan CCR3 por agentes infecciosos, tales como el VIH, ya que se sabe que CCR3 es un correceptor de entrada para dichos agentes infecciosos.

Por consiguiente, la presente invención también es una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad o afección mediada por eosinófilos o CCR3 en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz del análogo peptídico de CCR3 o nanopartícula del mismo descrito en la presente descripción. En una realización, el sujeto es un mamífero. En otra realización, el sujeto es un ser humano. A diferencia de los antagonistas de moléculas pequeñas, el análogo peptídico de CCR3 de esta invención no inhibe la internalización y degradación de CCR3 inducida por ligando. Por lo tanto, el análogo peptídico de CCR3 es un antagonista sesgado que puede usarse sin el desarrollo de resistencia.

"Tratar" a un mamífero que tiene una enfermedad o afección significa lograr uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad de la enfermedad o afección; (b) detener el desarrollo de la enfermedad o condición; (c) inhibir el

empeoramiento de la enfermedad o afección; (d) limitar o prevenir la recurrencia de la enfermedad o afección en pacientes que han tenido previamente la enfermedad o afección; (e) causar la regresión de la enfermedad o afección; (f) mejorar o eliminar los síntomas de la enfermedad o afección; y (g) mejorar la supervivencia.

Como se usa en la presente descripción, el término "cantidad eficaz", o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del análogo peptídico de CCR3 o nanopartícula de la invención, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, que es suficiente para lograr el resultado deseado. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad que inhiba la transducción de la señal CCR3, incluida la activación de Gai y la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la estimulación de eotaxinas o RANTES. Además, una cantidad eficaz es una cantidad que atenúa la degranulación y quimiotaxis mediada por CCR3 *in vitro* e *in vivo*.

La cantidad del análogo peptídico de CCR3 o nanopartícula que constituye una "cantidad eficaz" puede variar según la gravedad de la enfermedad, la afección, el peso o la edad del paciente a tratar, la frecuencia de dosificación o la vía de administración, pero puede ser determinado de forma rutinaria por un experto en la técnica. Un médico puede valorar la dosis o la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Las dosis típicas varían desde aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. La dosis puede variar desde 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, o desde 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, o desde 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg.

Las enfermedades o afecciones mediadas por eosinófilos o CCR3 que pueden tratarse de acuerdo con este uso incluyen, entre otras, asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, psoriasis, esofagitis eosinofílica (EoE), enfermedades gastrointestinales eosinofílicas (EGID), incluida la gastritis eosinofílica (EG), gastroenteritis eosinofílica (EGE) y colitis eosinofílica (EC), y otras enfermedades que incluyen fascitis eosinofílica (EF), bronquitis eosinofílica, cistitis eosinofílica, neumonía eosinofílica, síndrome hipereosinofílico (HES) y variantes de las mismas, Eosinofilia Poliangulomatosis (también conocido como síndrome de Churg-Strauss), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), síndrome de mialgia eosinofílica, rinosinusitis crónica (CRS) y enfermedades fúngicas y parasitarias asociadas a eosinófilos, por ejemplo, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) y similares, así como esclerosis múltiple, virus de inmunodeficiencia humana (HIV), degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y cáncer, incluidos, entre otros, el cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de riñón (RCC) y linfoma de Hodgkin. La enfermedad o afección también puede incluir alergias alimentarias, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, mastocitosis, síndrome de hiper IgE, lupus eritematoso sistémico, acné, rechazo de aloinjerto, lesión por reperfusión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sinusitis, leucemia basófila, urticaria crónica, leucocitosis basófila, eccema, EPOC (trastorno pulmonar obstructivo crónico), artritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica y osteoartritis. En determinadas realizaciones, el trastorno o afección es asma, asma inducida por ejercicio o EoE.

La invención se describe con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Reactivos. Se adquirieron CCL5, CCL11, CCL13 y CCL28 recombinantes humanos de BioLegend (San Diego, CA). Los antagonistas de CCR3 de molécula pequeña, SB238437 y UCB35625, se adquirieron de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). PD184161, cloroquina, MG132 y forskolina se adquirieron de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

Cultivo de células. AML14.3D10-CCR3 (ATCC, Manassas, VA; Daugherty y otros (1996) J. Exp. Medicina. 183:2349-2354) se mantuvieron en RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina 2mM, HEPES 10mM, piruvato de sodio 1mM, β-mercaptoetanol 50µM y 2 mg/ml de G418 en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂ a 37 °C.

Purificación de eosinófilos. Los eosinófilos en sangre se purificaron a partir de sangre anticoagulada extraída de sujetos asmáticos, alérgicos leves. La sangre periférica se sometió a centrifugación en gradiente de densidad sobre FICOLL-PAQUE Plus (GE Healthcare, Pittsburg, PA) para obtener un sedimento que contenía eritrocitos y granulocitos. Después de la lisis de eritrocitos mediante choque hipotónico, los eosinófilos se purificaron mediante selección negativa usando un cóctel de perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos contra no eosinófilos (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Los eosinófilos se resuspendieron en X-VIVO 10 sin rojo fenol. La pureza y viabilidad de los eosinófilos obtenidos fue rutinariamente >97 % según lo evaluado por Hema III y tinción con azul tripan, respectivamente.

Ensayo de transducción de señales – Transferencia Western. Se privó de suero a las células AML14.3D10-CCR3 durante 16 horas. Las células se pretrataron con vehículo de control, R3-2-1 o PD184161 durante 30 minutos a 37 °C, y posteriormente se estimularon con CCL5 o CCL11 8nM durante 2 minutos. La estimulación se detuvo añadiendo PBS con hielo. Las células se centrifugaron y lisaron en tampón RIPA que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa. Los lisados celulares se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 12 % (10 µg/por carril), se transfirieron a una membrana de PVDF y se bloquearon en leche al 5 %. Se detectó fosfo-ERK1/2 usando anticuerpo monoclonal de conejo (clon D13,14,4E, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) e IgG-HRP anti-conejo

de cabra secundaria (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Como control de carga, la membrana se despojó posteriormente y se volvió a sondear con un anticuerpo contra ERK1/2 total (clon 127F5, tecnología de señalización celular).

5 Ensayo de quimiotaxis. La migración celular se determinó usando un sistema TRANSWELL de 96 pocillos (Corning, Tewksbury, MA). Brevemente, se añadieron 200µl de quimioatrayente o medio de control a la cámara inferior si bien se añadieron 100µl de células a la cámara superior. Las dos cámaras se separaron mediante un filtro de policarbonato con poros de 5µm. Para las células AML14.3D10-CCR3, 2x10⁵ células/pocillo se resuspendieron en RPMI-1640 + 0,1 % de BSA y se dejaron migrar durante 4 horas a 37 °C. Para los eosinófilos sanguíneos, 1x10⁵ células/pocillo se resuspendieron en X-VIVO 10 + 0,5 % de BSA y se dejaron migrar durante 3 horas a 37 °C. Las células migradas se contaron usando un citómetro de flujo Beckman QUANTA SC. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Se realizó un análisis de tablero de ajedrez para distinguir la quimiotaxis de la quimioinesis.

15 Expresión e internalización del receptor. Para evaluar la expresión superficial de CCR3, las células se tiñeron usando anticuerpo anti-CCR3 humano conjugado con PE (clon 5E8, BioLegend) o control de isotipo emparejado conjugado con PE después del bloqueo con suero AB humano al 10 %. Para determinar la internalización inducida por ligando de CCR3, las células se incubaron con varias quimiocinas durante 1 hora a 37 °C, se lavaron una vez en tampón de tinción (PBS + BSA al 0,5 % + 0,1 % NaN₃) antes de ser teñido como anteriormente. Después de la tinción del anticuerpo, las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % y se analizaron en un citómetro de flujo QUANTA SC (Beckman Coulter, Indianapolis, IN).

25 Activación Gai. El Gai unido a GTP se detectó usando un kit de ensayo de Gai comercial (Abcam, Cambridge, MA) con modificaciones. Brevemente, las células AML14.3D10-CCR3 se privaron de suero durante 16 horas antes de ser pretratadas con 2 mg/ml de toxina pertussis durante 2 horas, R3-2-1 10µM durante 30 minutos o con vehículo de control. A continuación, las células pretratadas se estimularon con CCL11 8nM o medio durante 1 minuto. La reacción se detuvo añadiendo PBS enfriado con hielo. Se utilizaron diez (10) millones de células para cada condición. Las células lavadas se lisaron con tampón de lisis 1X siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reducción de Gai activo, el anticuerpo de Gai unido a anti-GTP de ratón se conjugó con la proteína G DYNABEADS (Life Technologies, Carlsbad, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las perlas conjugadas se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con Tris + TWEEN (TBST) y se incubaron con lisados celulares durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con TBST, las proteínas unidas se eluyeron hirviendo las perlas en tampón SDS 2X durante 5 minutos. Los eluidos se resolvieron mediante SDS-PAGE y se inmunotransfirieron usando un anticuerpo anti-Gai total de conejo policlonal (Cell Signaling Technology).

35 Degradación CCR3. Se resuspendieron células AML14.3D10-CCR3 en RPMI-1640 + BSA al 0,1 %. Se pretrataron alícuotas de 1x10⁶ células con cicloheximida 10µM durante 1 hora a 37 °C. Algunas células se pretrataron simultáneamente con R3-2-1 10µM, MG132 10µM o ambos durante 30 minutos. Las células pretratadas se estimularon con eotaxinas 8nM o RANTES durante 3 horas para inducir la degradación del receptor. Se reservó una alícuota de células no tratadas al comienzo del experimento para establecer la expresión de CCR3 de referencia. A continuación, todas las células se lisaron en tampón RIPA y se inmunotransfirieron para CCR3 con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CCR3 (Abcam) seguido de anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG-HRP (Santa Cruz).

45 Ejemplo 2: Diseño de R3-2-1

El péptido monomérico R3-2-1 se derivó de la secuencia primaria del segundo dominio transmembrana y las primeras regiones de bucle intracelular de CCR3 con dos modificaciones químicas. Primero, se agregaron tres residuos de aspartato al extremo carboxilo terminal. En segundo lugar, el último residuo de aspartato se unió covalentemente a 27 unidades de polietilenglicol (PEG). Monómeros R3-2-1 autoensamblados en ambiente acuoso en nanoesferas con un radio hidrodinámico de aproximadamente 8nm (Figura 1). Esta estructura nanoesférica se mantuvo en una amplia gama de concentraciones monoméricas.

55 Ejemplo 3: R3-2-1 inhibe la quimiotaxis inducida por múltiples ligandos CCR3

Eosinófilos primarios y la línea celular mielocítica eosinofílica estable CCR3 +, AML14.3D10-CCR3 (Daugherty y otros (1996) J. Exp. Medicina. 183:2349-2354) se someten a quimiotaxis mediada por CCR3 inducida por múltiples quimiocinas, incluidas eotaxinas/CCL11, RANTES/CCL5, MCP-4/CCL13 y MEC/CCL28 (Daugherty y otros (1996) J. Exp. Medicina. 183:2349-2354; Pan y otros (2000) J. Immunol. 165:2943-2949). R3-2-1 inhibe funcionalmente la quimiotaxis mediada por CCR3 tanto de AML14.3D10-CCR3 como de eosinófilos sanguíneos en una forma dependiente de la dosis a concentraciones comparables a UCB35625, un inhibidor de CCR3 no selectivo de molécula pequeña (Figura 3). El inhibidor competitivo de CCR3 SB328437 solo inhibe la quimiotaxis inducida por CCL11 pero no la inducida por CCL5 o CCL28 (Figura 2).

65 Ejemplo 4: Efectos de R3-2-1 en las vías de transducción de señales CCR3

CCR3 está acoplado a la proteína G sensible a la toxina pertussis Gai (Elsner y otros (1996) Eur. J. Immunol. 26:1919-1925). Tras la unión y activación del ligando, el Gai unido a GTP ahora activo y el dímero Gβγ se disocian de CCR3 para desencadenar cascadas de señalización descendente que incluyen las vías MAPK (ERK1/2, p38) y la vía de PI3K/AKT. Se encontró que R3-2-1 inhibe la activación de Gai usando un ensayo de inmunoprecipitación que detecta específicamente la forma de Gai unida a GTP (Figura 2A). La posterior fosforilación de ERK1 / 2 también fue atenuada por R3-2-1 (Figura 2B).

Ejemplo 5: Antagonismo sesgado de CCR3 por R3-2-1

Simultáneamente a la unión y activación del ligando, CCR3 sufre una desensibilización e internalización inducidas por el ligando (Zimmermann y otros (1999) J. Biol. Chem. 274:12611-12618). Como parte del proceso de desensibilización, CCR3 se degrada. Se cree que esto ocurre mediante el reclutamiento de β-arrestina en CCR3 fosforilado y el secuestro subsiguiente del receptor en compartimentos endosomales, lo que finalmente conduce a la degradación. La señalización de β-arrestina es fundamental en este proceso y se caracteriza por una activación tardía de vías de señalización tal como MAPK/ERK1/2, en contraste con la activación aguda por las proteínas G. La inhibición de la señalización de la β-arrestina puede interferir con la degradación efectiva y, por lo tanto, acelerar la re-sensibilización de las células con el receptor. De hecho, los antagonistas de CCR3 de molécula pequeña bloquean parcial o completamente la internalización de CCR3 inducida por ligando (Sabroe y otros (2005) Eur. J. Immunol. 35:1301-1310), si bien R3-2-1 no (Figura 4A). Curiosamente, R3-2-1 parece inducir la internalización de CCR3 por sí solo en las células AML14.3D10-CCR3 (Figura 4B) sin ser él mismo un agonista de la quimiotaxis (Figura 4C).

Para dilucidar el destino de CCR3 tras la internalización inducida por ligando y el tratamiento con R3-2-1, se analizaron los niveles de proteína CCR3 de células eosinófilas tratadas con cicloheximida. Se descubrió que CCR3 se degradaba después de la exposición al ligando, de acuerdo con informes anteriores (Zimmermann y otros (1999) J. Biol. Chem. 274:12611-12618; Wise, y otros (2010) J. Allergy Clin. Immunol. 126:150-7.e2). R3-2-1 mejoró la degradación de CCR3 inducida por eotaxinas y RANTES.

Ejemplo 6: R3-2-1 inhibe el reclutamiento de eosinófilos en un modelo de ratón de EoE

Para demostrar la eficacia *in vivo* de R3-2-1 para bloquear el reclutamiento de eosinófilos en sitios de inflamación alérgica, ratones transgénicos L2-IL5 (Masterson y otros (2014) Intestino 63:43-53) fueron sensibilizados y retados con oxazalona (OXA) de acuerdo con un protocolo establecido (Figura 5A). Los ratones se trataron *i.v.* con péptido R3-2-1, mezcla de péptido de control R3-2-3 codificado (YLFLLVTVFHIWLPNHRGHVWGFDDDD-PEG₂₇-NH₂; SEQ ID NO:24), o el inhibidor de CCR3 no selectivo alostérico, UCB35625. El reclutamiento de eosinófilos en el epitelio esofágico se evaluó 24 horas después de la última prueba de reto de OXA contando los eosinófilos en 9 campos de alta potencia (hpf) que cubren el esófago total o 3 hpf que cubren el esófago distal. R3-2-1 redujo significativamente el reclutamiento de eosinófilos en relación con la mezcla de péptido codificado como control en el epitelio esofágico distal y total (Figuras 5B y 5C, respectivamente), donde se produce la mayor densidad de eosinófilos en este modelo de EoE. Por el contrario, el antagonista de CCR3 UCB35625 fue ineficaz para reducir el reclutamiento de eosinófilos en este modelo de EoE, aunque era un potente inhibidor de la quimiotaxis inducida por múltiples agonistas de CCR3 *in vitro*, similar a R3-2-1.

Ejemplo 7: R3-2-1 interactúa físicamente con CCR3 humano

La unión del ligando a GPCR induce transiciones conformacionales en el receptor que activan las proteínas G y el reclutamiento de β-arrestina. La evaluación por RMN de la unión de R3-2-1 y CCL11/eotaxina-1 a preparaciones de membrana CCR3 muestra cambios de desplazamiento químico indicativos de la unión de R3-2-1 a CCR3 en presencia de CCL11 (Figuras 6A-6E). Debido a que R3-2-1 es un análogo de la segunda hélice transmembrana de CCR3, se espera que R3-2-1 compita con la hélice nativa 2 por unirse a las hélices 1 y 3. La unión a la hélice 3 puede alterar la estructura y la orientación del motivo DRY en el bucle intracelular 2, inhibiendo las proteínas G.

Ejemplo 8: Prueba preclínica de R3-2-1 en modelos de asma de antígeno triple

En el modelo de ratón alérgico impulsado por antígenos triples, los ratones son sensibilizados y retados en las vías respiratorias con una combinación de aero-alérgenos que incluyen ácaros del polvo, ambrosía y *Aspergillus* sp. (DRA; Goplen y otros (2009) J. Allergy Clin. Immunol. 123: 925-932). Este modelo recapitula muchas de las características patológicas del asma humana, incluido el reclutamiento de eosinófilos en el pulmón y los espacios aéreos, la degranulación de eosinófilos, el aumento de la expresión de citocinas Th2, la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) y la remodelación de las vías respiratorias (metaplasia de células caliciformes y sobreproducción de moco) en las vías respiratorias, hiperplasia del músculo liso y fibrosis subepitelial. Utilizando este modelo, se evalúa la eficacia de R3-2-1 para bloquear el reclutamiento de eosinófilos inducido por alérgenos en las vías respiratorias, y el desarrollo de patologías de las vías respiratorias en cepas de ratón C57BL/6J y BALB/c. Se determina si las vías de administración pulmonar sistémica (*i.v.* o *i.p.*) y/o local (*i.n.*/intratraqueal) de R3-2-1 tienen la capacidad de inhibir el reclutamiento de eosinófilos mediado por eotaxinas en las vías respiratorias y su consecuente metaplasia de células caliciformes, hiperproducción de moco, que ha demostrado ser altamente dependiente del

reclutamiento de eosinófilos en el pulmón utilizando dos modelos de ratón deficientes en eosinófilos, PHIL y 11dbIGATA, respectivamente. Los ratones sometidos al protocolo de triple antígeno (DRA) se tratan con R3-2-1, péptido mezclado y controles de vehículo a través de las rutas de administración anteriores después de la sensibilización al antígeno, 24 horas antes del primer reto al alérgeno el día 11 del protocolo (Figura 7), y para las rutas i.v./i.p., repetidas antes de cada reto de alérgeno posterior. Para la ruta i.n., el protocolo se amplía para permitir la administración de R3-2-1 y los controles los días 11, 13 y 15, 24 horas antes de cada una de los retos con alérgenos en los días 12, 14 y 16, seguidas de recolección de sangre, líquido BAL (BALF) y tejidos pulmonares el día 17 (Figura 7). Criterios de valoración de células, citocinas y tejidos en los controles tratados con nanopartículas de CCR3 (nanopartículas y vehículos de péptidos no CCR3 mezclados e irrelevantes) incluyen recuentos celulares totales/diferenciales y niveles de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) y eotaxinas en BALF (ELISA o inmunoensayo multiplex; Bioplex), el primero demostró ser eosinófilos tisulares dependientes de eosinófilos mediante inmunotinción con un anticuerpo anti-mMBP de rata. La sobreproducción de moco se mide en BALF mediante ELISA para MUC5AC. Las evaluaciones de la metaplasia de células caliciformes inducida por alérgenos y el contenido de células mucosas del epitelio de las vías respiratorias se evalúan en pulmones fijados por inflación antes de la inclusión en parafina, el corte y la tinción con PAS y hematoxilina-verde de metilo. El número de células caliciformes/contenido de moco se basa en la evaluación de las vías respiratorias proximales y distales/ratón (n = 10 animales/grupo). Las comparaciones del contenido de moco entre R3-2-1 y ratones de control se cuantifican utilizando software de análisis de imágenes como índice de moco de las vías respiratorias: [(intensidad media de tinción de PAS del epitelio de las vías respiratorias) X (área de tinción del epitelio de las vías respiratorias con PAS)] / [(total área del epitelio conductor de la vía aérea) X (número total de vías respiratorias en la sección)]. Se espera que el pretratamiento de ratones con R3-2-1 después de la sensibilización al alérgeno pero antes del reto al alérgeno disminuya significativamente el reclutamiento de eosinófilos en el pulmón y los espacios aéreos, las citocinas Th2 y disminuya la remodelación de las vías respiratorias mediada por eosinófilos.

Ejemplo 9: Prueba preclínica de R3-2-1 en un ratón transgénico con asma grave IL-5 / CCL24

La posibilidad de que se requiera la coexpresión de los ligandos de IL-5 y CCR3 para la eosinofilia de las vías respiratorias y las patologías del asma condujo al desarrollo del modelo de asma transgénico doble IL-5/CCL24 utilizando ratones con expresión sistémica de IL-5 (Lee y otros (1997) J. Exp. Medicina. 185:2143-2156) cruzado con ratones en los que la expresión específica de pulmón de CCL24 utilizó el promotor CC10 de células Clara (Ochkur y otros (2007) J. Immunol. 178:7879-7889). Las patologías del asma que ocurren en todos los ratones transgénicos IL-5/CCL24 son más sustanciales que las inducidas en cualquiera de los modelos de sensibilización/reto, y se eliminan por completo mediante cruces con ratones PHIL deficientes en eosinófilos (Lee y otros (2004) Ciencia 305:1773-1776). Estos ratones "asmáticos" son ideales para probar la eficacia de R3-2-1 instilado directamente en las vías respiratorias o sistémicamente para antagonizar CCL24 de las vías respiratorias/pulmones para inhibir el reclutamiento de eosinófilos y sus patologías consiguientes. Los ratones IL-5 / CCL24 se tratan con R3-2-1 (o controles de péptido y vehículo) i.n. y/o i.v. (o i.p.) diariamente durante 1-2 semanas, seguido de evaluaciones cuantitativas de eosinófilos de las vías respiratorias y actividad de peroxidasa de eosinófilos (EPX) en BALF (= degranulación de eosinófilos), producción de moco y niveles de CCL24 como se describe (Ochkur y otros (2007) J. Immunol. 178:7879-7889; Lee y otros (2004) Ciencia 305:1773-1776; Justice, y otros (2003) Enm. J. Physiol. Célula pulmonar. Mol. Physiol. 284:L169-178). La actividad de EPX y los niveles de CCL24 se determinan usando kits de ELISA (R&D Systems, Cell Technologies, Inc.). La sobreproducción de moco se mide en BALF, como se discutió anteriormente y el péptido R3-2-1 mezclado es el control. Los pulmones se fijan con inflación, se seccionan y se tiñen para mMBP-1 para cuantificar los eosinófilos de las vías respiratorias y los tejidos, y MBP-1 extracelular (= degranulación), y para la producción de células caliciformes / moco mediante tinción PAS. Los resultados se evalúan como medias $\pm$ SEM y se analizan utilizando ANOVA seguido de análisis de las diferencias entre las medias para 10 ratones/grupo experimental utilizando las pruebas paramétricas o no paramétricas apropiadas, consideradas significativas a $p < 0,05$. Los resultados de este análisis demostrarán que los ratones a los que se administró ese péptido R3-2-1 pueden rescatarse de algunos o todos sus fenotipos de asma.

Listado de secuencias

<110> The Board of Trustees of the University of Illinois

Ackerman, Steven J.

<120> Inhibición con péptidos de enfermedades o afecciones mediadas por CCR3

<130> UIC0054WO

<150> US 62/115,880

<151> 2015-02-13

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 876 947 T3

<210> 1
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 1
 10
 Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly
 1 5 10 15
 15 His Asn Trp Val Phe Gly Asp Asp Asp
 20 25
 <210> 2
 20 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Péptido sintético
 <400> 2
 30 Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Val Thr Trp Gly Leu Ala Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Pro Glu Phe Ile Phe Tyr Glu Thr Glu Asp
 20 25
 35
 <210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 45
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa indica Thr o Ile
 50
 <400> 3
 Ile Phe Val Xaa Met Ala Val Phe Phe Ile Phe Trp Thr Pro Tyr Asn
 1 5 10 15
 55
 Val Ala Ile Leu Leu Ser Ser Tyr Gln Ser Asp Asp
 20 25
 60
 <210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 876 947 T3

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

5

Asp Asp Leu Val Met Leu Val Thr Glu Val Ile Ala Tyr Ser His Cys
1 5 10 15

10 Cys Met Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val
20 25

<210> 5

15 <211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptido sintético

<400> 5

25 Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro
1 5 10 15

30 Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly His Asn Trp Val Phe Gly His
20 25 30

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40 <400> 6

Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro
1 5 10 15

45 Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly His Asn Trp Val Phe Gly His
20 25 30

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 7

60 Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro
1 5 10 15

ES 2 876 947 T3

Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Glu Arg Asn Trp Val Phe Ser His
20 25 30

5 <210> 8
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 8

15 Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Val
1 5 10 15

20 Phe Trp Ile His Tyr Thr Gly Trp Asn Asp Trp Val Phe Gly Arg
20 25 30

25 <210> 9
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 9

35 Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Val Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro
1 5 10 15

40 Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Trp Asn Glu Trp Val Phe Gly His
20 25 30

45 <210> 10
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 10

55 Leu Phe Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Phe Thr Val Pro
1 5 10 15

60 Phe Trp Ile His Tyr Val Leu Trp Asn Glu Trp Gly Phe Gly His
20 25 30

60 <210> 11
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 876 947 T3

<223> Péptido sintético

<400> 11

5 Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Phe Thr Val Pro
1 5 10 15

10 Phe Trp Ile His Tyr Val Leu Trp Asn Glu Trp Gly Phe Gly His
20 25 30

<210> 12

<211> 31

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20

<400> 12

25 Leu Phe Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro
1 5 10 15

Phe Trp Ile His Tyr Ile Leu Arg Lys Glu Trp Gly Phe Gly His
20 25 30

30

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 13

40

Leu Phe Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro
1 5 10 15

45 Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Trp Asn Glu Trp Val Phe Asp Ser
20 25 30

<210> 14

50 <211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISC

60 <222> (2)..(2)

<223> Xaa indica Leu o Phe

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISC

<222> (9)..(9)
 <223> Xaa indica Leu o Val

 <220>
 5 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa indica Phe o Val

 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa indica Leu o Val

 <220>
 15 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa indica Pro o Val

 <220>
 20 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa indica Ile, Thr o Val

 <220>
 25 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa indica Arg, Gly o Leu

 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa indica Trp, Gly, Glu o Arg

 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa indica His, Arg, Asn o Lys

 <220>
 40 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa indica Asn, Asp o Glu

 <220>
 45 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa indica Val o Gly

 <220>
 50 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa indica Gly, Ser o Asp

 <220>
 55 <221> CARACTERÍSTICAS MISC
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa indica His, Arg o Ser

 <400> 14
 60 Leu Xaa Asn Leu Ala Ile Ser Asp Xaa Leu Phe Leu Xaa Thr Xaa Xaa
 1 5 10 15

65

ES 2 876 947 T3

Phe Trp Ile His Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Phe Xaa Xaa
20 25 30

- 5 <210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Péptido sintético
- 15 <220>
<221> CARACTERÍSTICAS MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa indica Leu o Val
- 20 <220>
<221> CARACTERÍSTICAS MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa indica Phe o Val
- 25 <220>
<221> CARACTERÍSTICAS MISC
<222> (7)..(7)
<223> Xaa indica Leu o Val
- 30 <220>
<221> CARACTERÍSTICAS MISC
<222> (8)..(8)
<223> Xaa indica Pro o Val
- 35 <400> 15
Xaa Leu Phe Leu Xaa Thr Xaa Xaa Phe Trp Ile His Tyr
1 5 10
- 40 <210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 16
- 50 Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr
1 5 10
- 55 <210> 17
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 17
- 65 Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro
1 5 10 15

ES 2 876 947 T3

Phe Trp Ile His Tyr
20

5 <210> 18
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 18

15 Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly
1 5 10 15

20 His Asn Trp Val Phe Gly His
20

<210> 19
<211> 25
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético
30
<400> 19

Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro
1 5 10 15

35 Phe Trp Ile His Tyr Asp Asp Asp Cys
20 25

40 <210> 20
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 20

50 Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly
1 5 10 15

55 His Asn Trp Val Phe Gly His Asp Asp Asp
20 25

<210> 21
60 <211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICAS MISC

<222> (26)..(26)

<223> PEGilación y amidación.

<400> 21

10

Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly
1 5 10 15

15

His Asn Trp Val Phe Gly His Asp Asp Asp
20 25

<210> 22

20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Péptido sintético

<400> 22

30

Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly
1 5 10 15

His Asn Trp Val Phe Gly His Asp Asp Asp Cys
20 25

35

<210> 23

<211> 24

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISC

<222> (24)..(24)

<223> PEGilación y amidación

50

<400> 23

Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro
1 5 10 15

55

Phe Trp Ile His Tyr Asp Asp Asp
20

60

<210> 24

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISC

<222> (26)..(26)

<223> PEGgilación y amidación.

10

<400> 24

Tyr	Leu	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Phe	His	Ile	Trp	Leu	Pro	His	Asn
1				5					10					15	

15

Arg	Gly	His	Val	Trp	Gly	Phe	Asp	Asp	Asp
			20					25	

20

REIVINDICACIONES

1. Un análogo peptídico del receptor 3 de quimiocinas C-C (CCR3) que comprende la secuencia de aminoácidos Xaa₁-Leu-Phe-Leu-Xaa₂-Thr-Xaa₃-Xaa₄-Phe-Trp-Ile-His-Tyr (SEQ ID NO:15), en donde Xaa₁ indica Val o Leu, Xaa₂ indica Phe o Val, Xaa₃ indica Leu o Val, y Xaa₄ indica Pro o Val, y dicha secuencia de aminoácidos comprende dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en lipidación, carboxilación, glicosilación, sulfonación, amidación, PEGilación, miristoilación, biotilación, formación de disulfuro y adición de residuos de aminoácidos cargados; en donde el análogo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos LLFLVTLFPWIHYVRGHNWVFGHDDD (SEQ ID NO:20) o LLFLVTLFPWIHYVRGHNWVFGHDDD-PEG₂₇-NH₂ (SEQ ID NO:21) o es la secuencia de aminoácidos LLFLVTLGRFWIHY NO:18).
2. El análogo peptídico de CCR3 de la reivindicación 1, en donde el análogo peptídico comprende hasta 50 residuos de aminoácidos; o en donde el análogo peptídico comprende hasta 30 residuos de aminoácidos.
3. El análogo peptídico de CCR3 de la reivindicación 1, en donde el análogo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos LLFLVTLFPWIHYVRGHNWVFGHDDD (SEQ ID NO:20).
4. El análogo peptídico de CCR3 de la reivindicación 1, en donde la PEGilación comprende entre 5 y 50 unidades de PEG.
5. El análogo peptídico de CCR3 de la reivindicación 1, en donde el análogo peptídico de CCR3 es LLFLVTLFPWIHYVRGHNWVFGHDDD-PEG₂₇-NH₂ (SEQ ID NO:21).
6. Una composición de nanopartículas que comprende el análogo peptídico de CCR3 de la reivindicación 1.
7. La composición de nanopartículas de la reivindicación 6, que comprende además un segundo agente terapéutico seleccionado de fármacos esteroides; agentes antibacterianos; agentes antifúngicos; anticoagulantes; trombolíticos; agentes antiinflamatorios no esteroideos; agentes antiplaquetarios; agentes alfa-adrenérgicos; agentes antiarrítmicos; agentes anti-ateroscleróticos; agentes anticancerígenos y agentes citotóxicos; agentes antidiabéticos; antimetabolitos; antiproliferativos; anticuerpos anti-TNF o receptor de TNF soluble; inhibidores de aP2; agentes beta-adrenérgicos; secuestrantes de ácidos biliares; bloqueadores de los canales de calcio; agentes quimioterapéuticos; inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2), ciclosporinas; fármacos citotóxicos; diuréticos; inhibidores de la enzima convertidora de endotelina (ECE); enzimas; Inhibidores del factor VIIa e inhibidores del factor Xa; inhibidores de la farnesil-proteína transferasa; fibratos; inhibidores del factor de crecimiento; secretagogos de la hormona del crecimiento; inhibidores de la HMG CoA reductasa; inhibidores de la endopeptidasa neutra (NEP); agentes hormonales; inmunosupresores; antagonistas del receptor de mineralocorticoides; agentes disruptores de microtúbulos; agentes estabilizadores de microtúbulos; Inhibidores de MTP; niacina; inhibidores de la fosfodiesterasa; productos derivados de plantas; antagonistas del factor activador de plaquetas (PAF); complejos de coordinación de platino; abridores de canales de potasio; inhibidores de prenil-proteína transferasa; inhibidores de proteína tirosina quinasa; inhibidores de renina; inhibidores de la escualeno sintetasa; inhibidores de TNF-alfa; inhibidores de trombina; antagonistas del receptor de tromboxano; inhibidores de la topoisomerasa; inhibidores de vasopectidasa; e hidroxiurea, procarbazona, mitotano, hexametilmelamina y compuestos de oro.
8. Una composición farmacéutica que comprende el análogo peptídico de CCR3 de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
9. Una composición farmacéutica que comprende la composición de nanopartículas de la reivindicación 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 o 9 para su uso en un método o tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad o afección mediada por eosinófilos o CCR3 en un sujeto, el uso que comprende, administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 8 o 9, tratando, previniendo o mejorando así uno o más síntomas de la enfermedad o afección mediada por eosinófilos o CCR3 del sujeto; en donde la enfermedad o afección mediada por eosinófilos o CCR3 se selecciona de asma, asma inducida por el ejercicio, dermatitis atópica, rinitis alérgica, psoriasis, esofagitis eosinofílica (EoE), enfermedades gastrointestinales eosinofílicas (EGID) tales como gastritis eosinofílica (EG), gastroenteritis eosinofílica (EGE) y colitis eosinofílica (EC), fascitis eosinofílica (EF), bronquitis eosinofílica, cistitis eosinofílica, neumonía eosinofílica, síndrome hipereosinofílico (HES) y variantes del mismo, granulomatosis eosinofílica con poliangéitis (síndrome de Churg-Strauss celular) Síndrome), síndrome de mialgia por eosinófilos, rinosinusitis crónica (CRS) y enfermedades fúngicas y parasitarias asociadas a eosinófilos tales como aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), esclerosis múltiple, virus de inmunodeficiencia humana (HIV), degeneración

- 5 macular relacionada con la edad (AMD), cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de riñón (RCC) y linfoma de Hodgkin, alergias alimentarias, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, mastocitosis, síndrome de hiper IgE, lupus eritematoso sistémico, acné, rechazo de aloinjerto, lesión por reperfusión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sinusitis, leucemia basófila, urticaria crónica, leucocitosis basófila, eczema, COPD (trastorno pulmonar obstructivo crónico), artritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica y osteoartritis.
- 10 11. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 10, en donde la composición farmacéutica se administra a los pulmones del sujeto.
12. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 11, en donde dicha administración se realiza mediante nebulización en los pulmones.
- 15 13. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 10, en donde la composición farmacéutica se administra al esófago del sujeto.
14. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 13, en donde dicha administración se realiza mediante una preparación viscosa oral que recubre el esófago.
- 20 15. Un inhalador de dosis medida que comprende un contenedor de aerosol equipado con una válvula de dosis medida, en donde el contenedor de aerosol se llena con una composición que comprende uno o más propelentes y el análogo peptídico de CCR3 de la reivindicación 1.

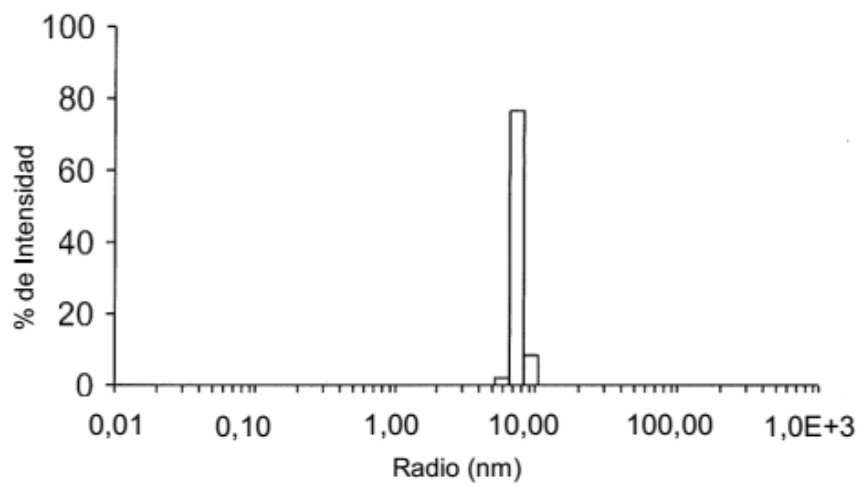


Figura 1

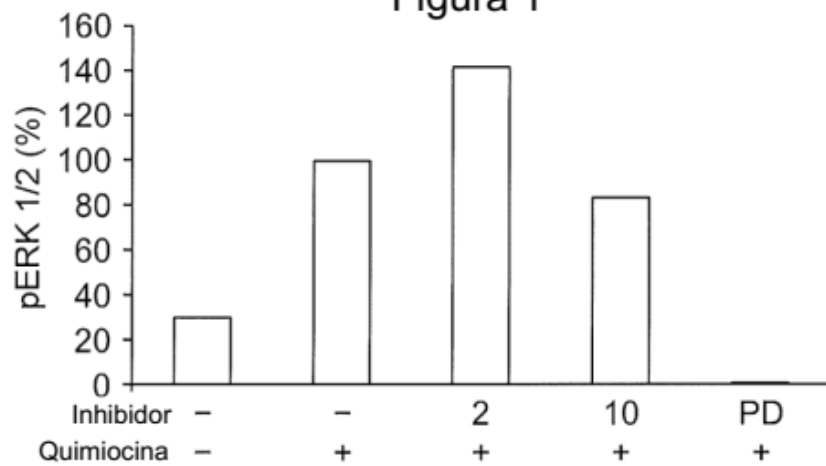


Figura 2A

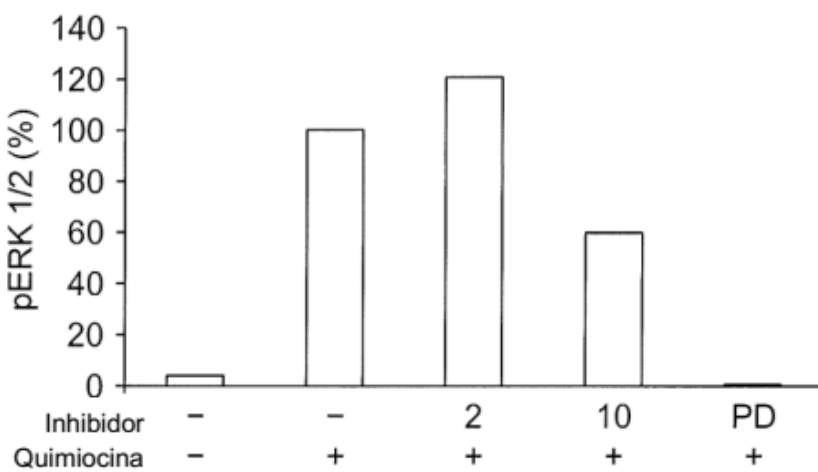


Figura 2B

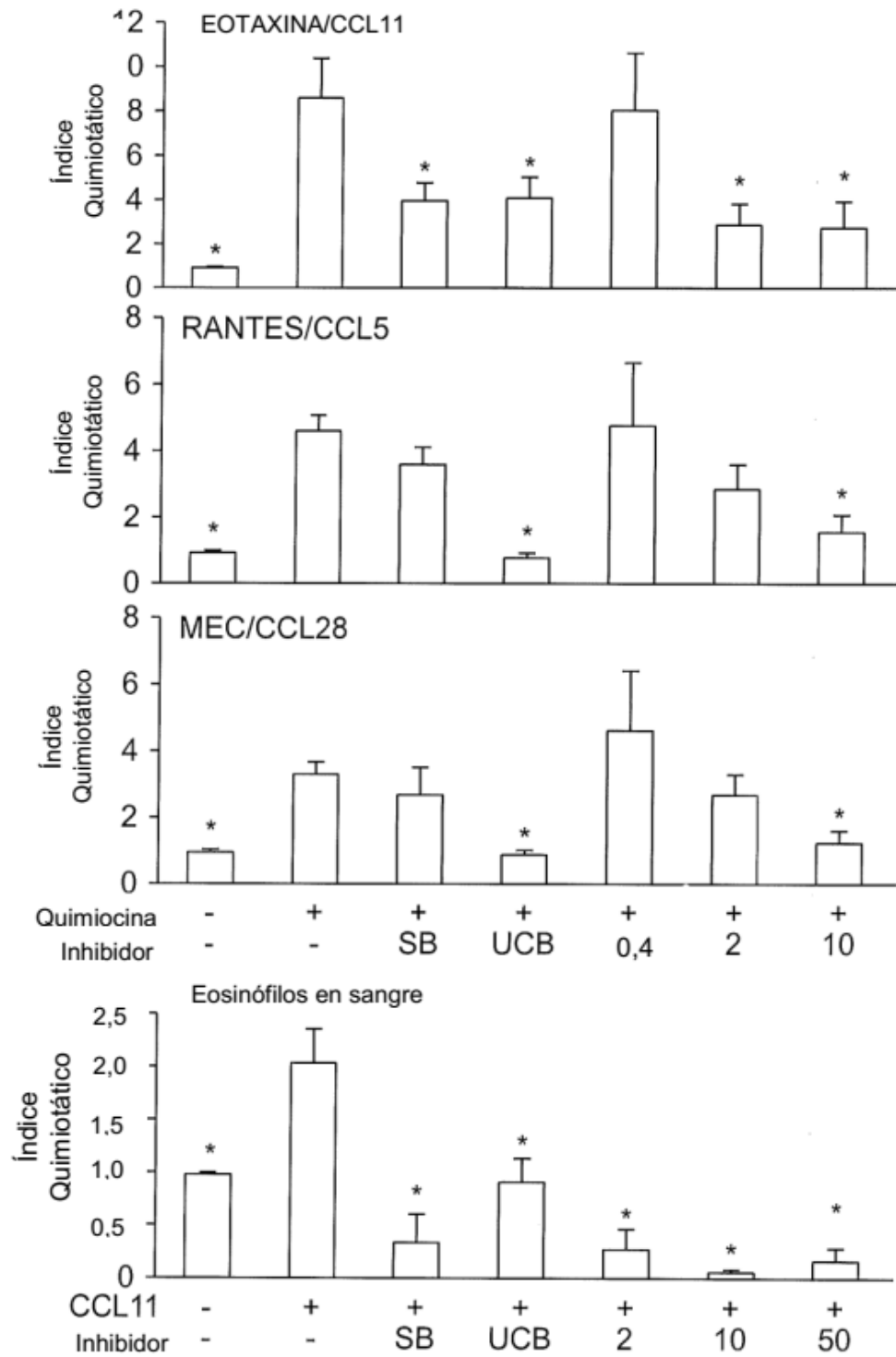


Figura 3

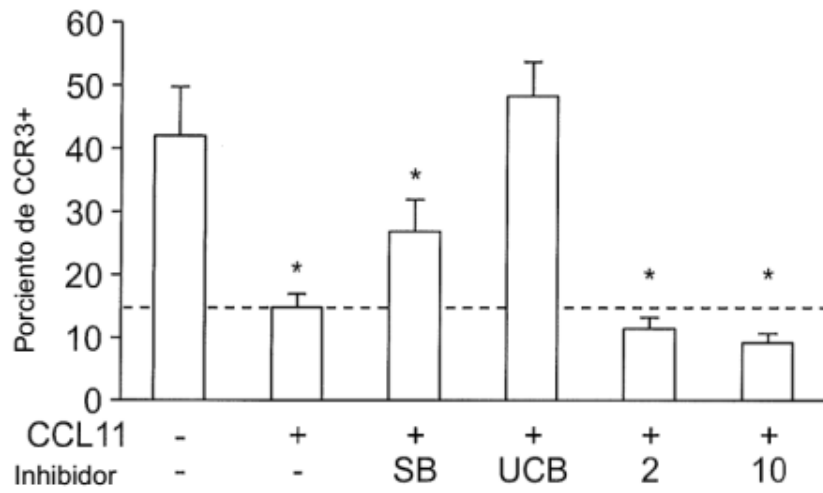


Figura 4A

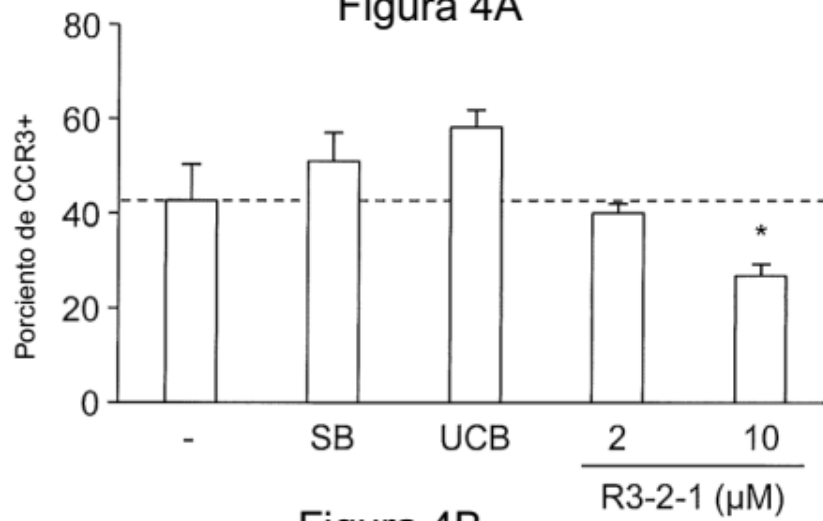


Figura 4B

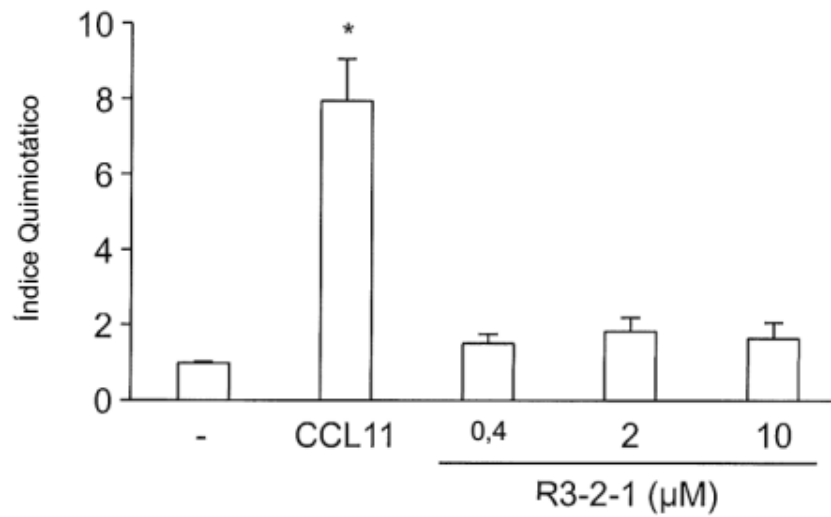


Figura 4C

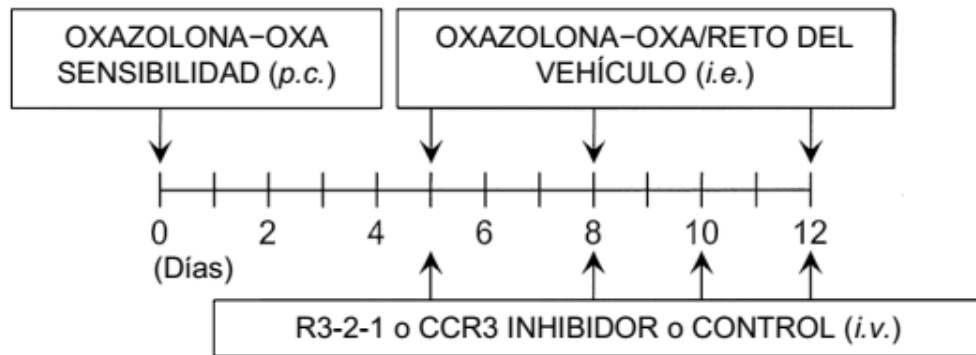


Figura 5A

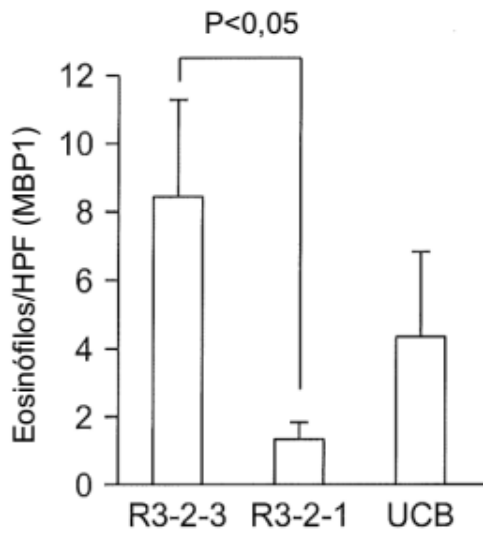


Figura 5B

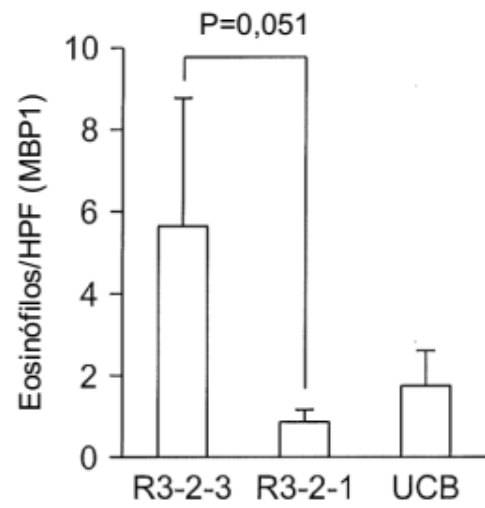


Figura 5C

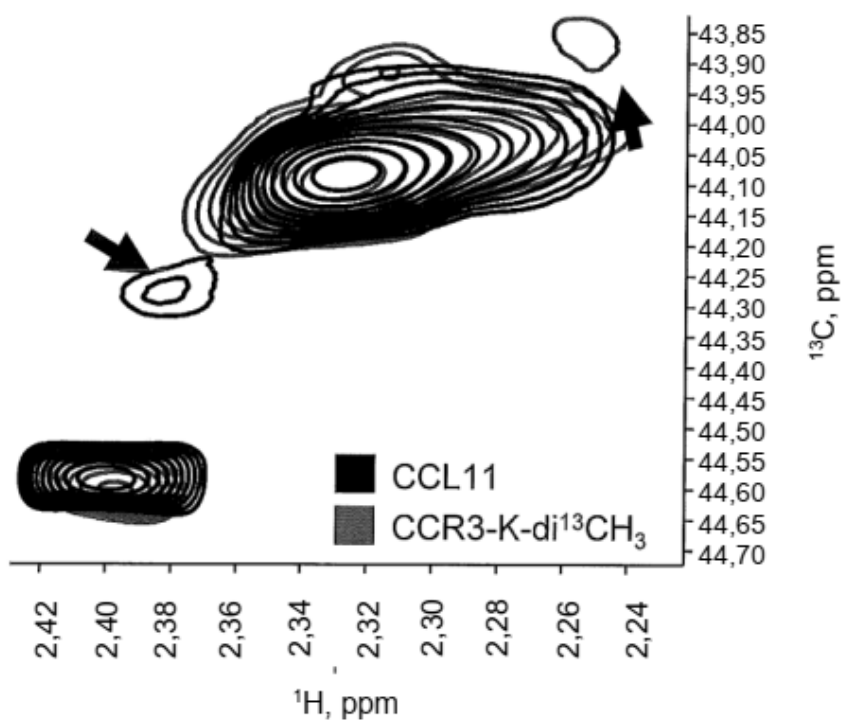


Figura 6A

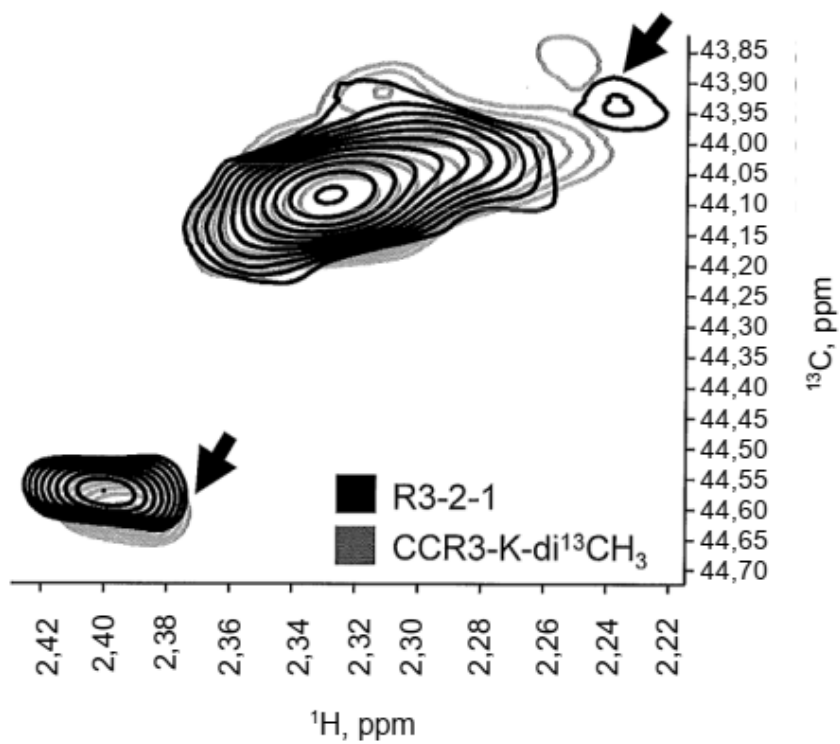


Figura 6B

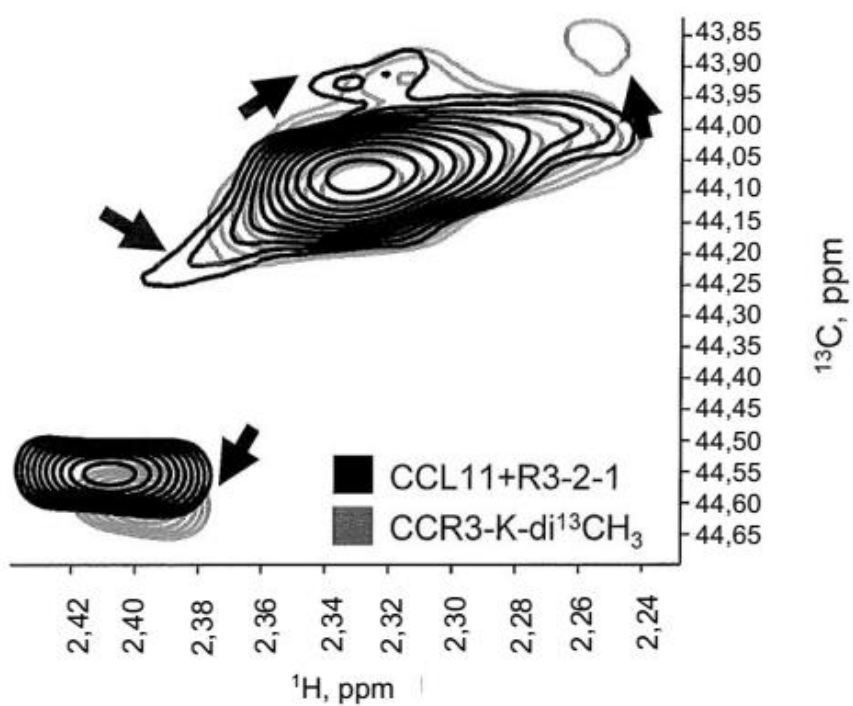


Figura 6C

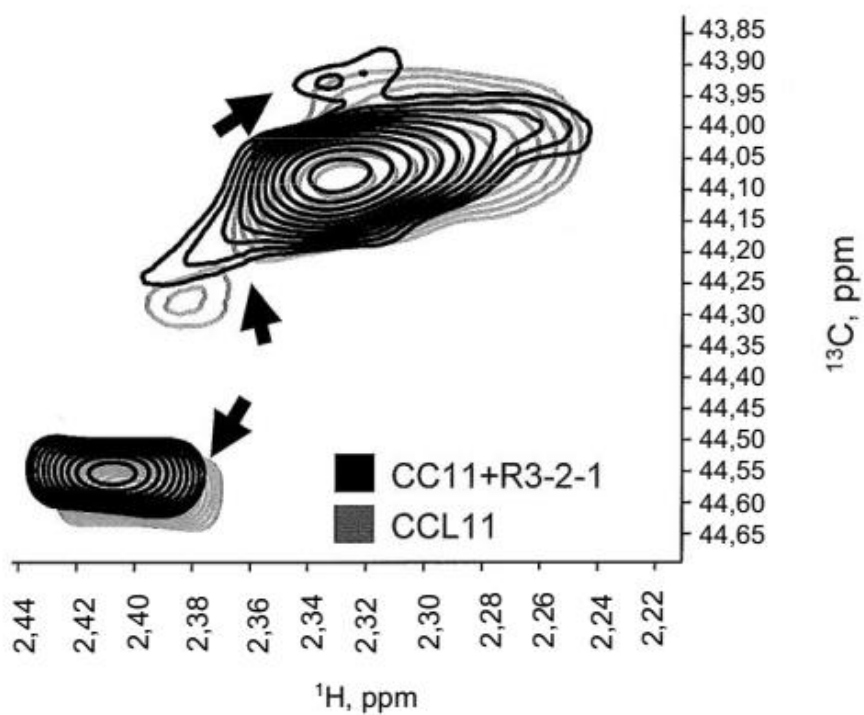


Figura 6D

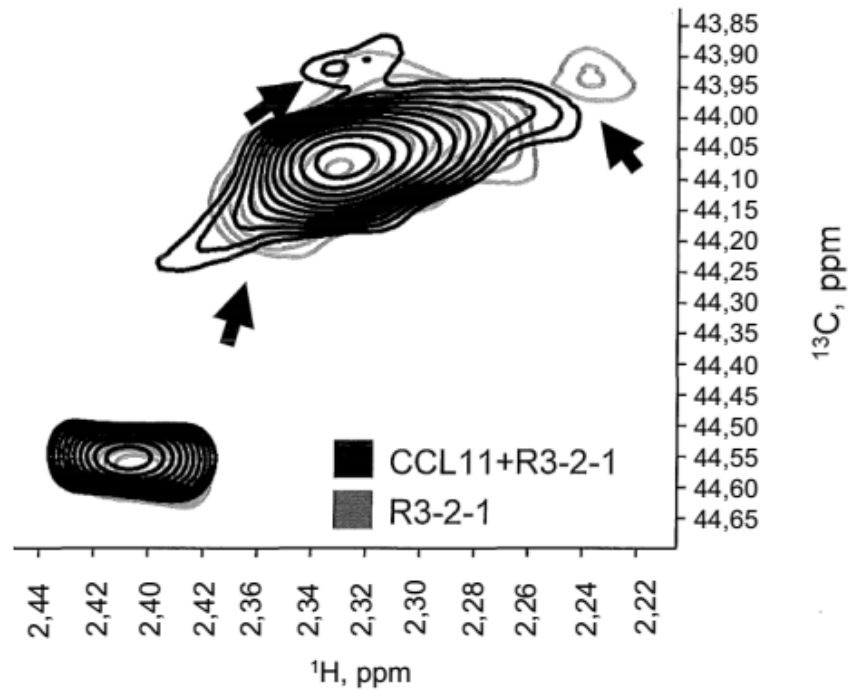


Figura 6E

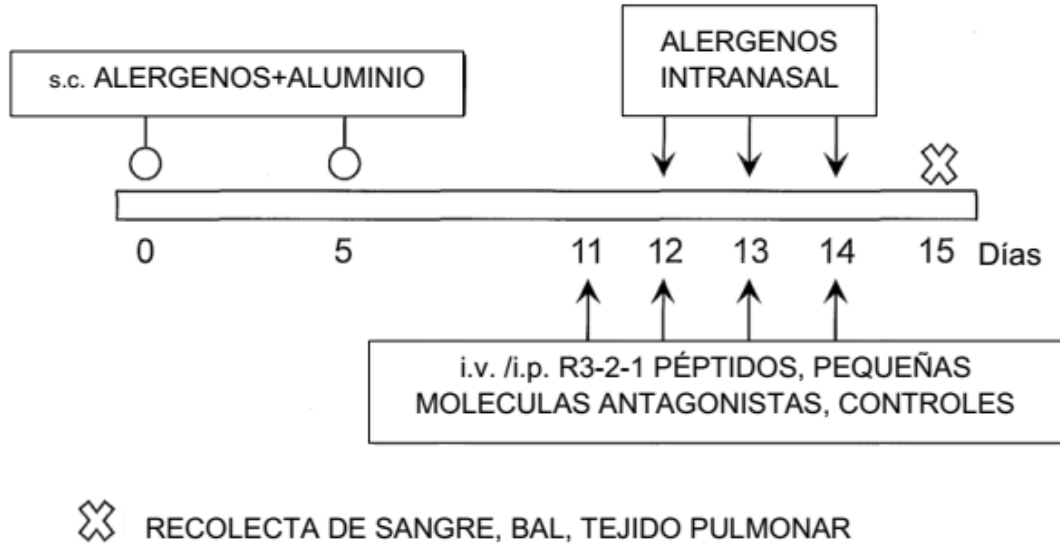


Figura 7