



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0715331-7 B1



(22) Data do Depósito: 25/07/2007

(45) Data de Concessão: 13/04/2021

(54) Título: POLIPEPTÍDEO QUE COMPREENDE UMA PORÇÃO N-TERMINAL E UMA PORÇÃO C-TERMINAL, E USO DO MESMO

(51) Int.Cl.: C07K 14/52; A61K 38/19.

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2006 GB 06 14755.7.

(73) Titular(es): ORION BIOTECHNOLOGY SWITZERLAND SÀRL.

(72) Inventor(es): OLIVIER HARTLEY.

(86) Pedido PCT: PCT IB2007003026 de 25/07/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/012689 de 31/01/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/01/2009

(57) Resumo: DERIVADOS DE CITOQUINA. A presente invenção refere-se a polipeptídeos que compreendem uma parcela N-terminal e uma parcela C-terminal, sendo que cada parcela N-terminal compreende a sequência de assinatura QGP[P ou L] e a sequência de aminoácido da referida parcela C-terminal é pelo menos 70% idêntica à SEQ IN NO: 1, seus empregos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"POLIPEPTÍDEO QUE COMPREENDE UMA PORÇÃO N-TERMINAL
E UMA PORÇÃO C-TERMINAL, E USO DO MESMO".**

CAMPO TÉCNICO

[0001] A presente invenção refere-se a derivados de citocinas contendo atividades anti-HIV, anti-inflamatórias ou outras atividades.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Não é conhecido nenhum fármaco capaz de curar infecções do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). Até a presente data, nenhuma vacina capaz de evitar a infecção por HIV parece estar ao alcance.

[0003] Infecções por HIV existentes hoje em dia podem, em muitos casos, ser controladas por terapia antirretroviral altamente ativa que envolve uma combinação de três ou mais fármacos retrovirais. Entretanto, a ocorrência de cepas de HIV resistentes aos fármacos de classe única, dupla ou tripla está em constante crescimento sob pressão seletiva de inibidores de transcriptase reversa e protease (RTIs e PIs) atualmente empregados em HAART.

[0004] Não há, portanto, uma necessidade urgente de novos tipos de fármacos anti-HIV. De preferência, tais novos fármacos teriam como objetivo aspectos do vírus que são menos vulneráveis ao desenvolvimento da resistência do que processos de transcrição reversa e maturação viral objetivados pelos RTIs e PIs mencionados acima. Na ausência de uma vacina de HIV, além disso, há uma necessidade de agentes que sejam capazes de evitar a transmissão de HIV durante contato sexual.

[0005] Esta necessidade poderia potencialmente ser satisfeita por agentes que inibem a entrada de HIV nas células alvo, isto é, agentes da classe dos "inibidores de entrada" (EI). Tais agentes poderiam, por exemplo, estar localizados, e serem aplicados topicamente aos órgãos

genitais humanos para evitar a infecção de células por HIV durante contato sexual. Agentes que podem evitar a transmissão de HIV durante o contato sexual são comumente referidos (apesar de inapropriadamente) como "microbicidas".

[0006] A entrada de HIV nas células alvo humanas depende da ligação do vírion HIV à superfície celular da proteína humana CD4 e de um denominado correceptor. Correceptores principais usados por HIV incluem os sete receptores ligados a transmembranas da proteína G CXCR4 e CCR5. Verificou-se que ligantes de quimiocina naturais de CCR5, em particular RANTES (CCR5), inibem a entrada de cepas de HIV R5-trópicas (cepas de HIV que usam CCR5 como um correceptor) nas células humanas [0]. RANTES é uma citocina pró-inflamatória que é conhecida por promover a acumulação e ativação celular em doenças inflamatórias crônicas.

[0007] Certos derivados de RANTES com modificações na terminação N mostraram atividade anti-HIV, por exemplo, AOP-RANTES, a aminooxipentano oxima de [glioXilil]1RANTES(2-68) [0] onde "(2-68)" denota resíduos 2 até 68 do peptídeo RANTES que ocorre naturalmente. Outros derivados RANTES quimicamente modificados com atividade anti-HIV incluem NNY-RANTES (*n*-nonanoil-RANTES(2-68) [0, 0]) e PSC-RANTES [0].

[0008] Entretanto, derivados de RANTES quimicamente modificados mencionados acima não somente inibem a entrada de HIV nas células, mas também são agonistas relativamente fortes de CCR5: AOP- RANTES, NNY- RANTES e PSC-RANTES elicitam uma cascata sinalizadora pró-inflamatória envolvendo influxo citossólico de cálcio. O uso de agentes com uma tal atividade sinalizadora como fármacos anti-HIV poderia levar a efeitos colaterais indesejados envolvendo, por exemplo, inflamação. A indução da inflamação é um efeito colateral altamente indesejado para agentes anti-HIV

profiláticos, já que foi reconhecido que o risco de infecção por HIV pode de fato ser aumentado em tecidos inflamados.

[0009] Agentes tais como derivados de RANTES também induzem a sinalização em células alvo devido à falta de seletividade ou especificidade do agente para CCR5, isto é, visto que o agente se liga também às proteínas do receptor CCR1 e CCR3.

[00010] Uma desvantagem de polipeptídeos quimicamente modificados é que eles não somente podem ser preparados por meios biotecnológicos diretos (expressão e fermentação). Derivados anti-HIV RANTES totalmente codificados, isto é, derivados consistindo somente de aminoácidos naturalmente codificados também foram reportados [0, 0]. Entretanto, a potência anti-HIV de todos os derivados de RANTES inicialmente indicados, totalmente codificados, foi menor do que aquele da variante de PSC-RANTES [0] quimicamente modificada.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Moléculas da invenção

[00011] Agentes de peptídeos totalmente codificados com elevada potência anti-HIV foram identificados agora. Esses agentes de peptídeos podem ser facilmente preparados por métodos biotecnológicos padrão, evitando o dispêndio e esforços requisitados para síntese ou modificação químicas. Inesperadamente, verificou-se que, em modos de execução preferidos, os agentes de peptídeos da presente invenção combinam uma alta potência anti-HIV com uma capacidade para elicitar somente um baixo grau de sinalização pró-inflamatória, evitando assim efeitos colaterais.

[00012] Em outros modos de realização, os agentes da invenção levam à internalização de CCR5 para dentro da célula (seqüestro de receptor, regulação negativa ou modulação negativa). Este surpreendente mecanismo de ação é vantajoso, visto que (i) uma proteção de duração comparativamente longa pode ser obtida através

de uma dose única do fármaco, e (ii) cepas de HIV R5 trópicas resistentes são menos capazes de evoluir se nenhum CCR5 nem sua forma ligada ao fármaco são acessíveis na superfície da célula alvo para interação com o vírus.

[00013] Agentes de peptídeos particularmente preferidos combinam de alta potência anti-HIV com ambos uma alta atividade seqüestrante de receptor e uma baixa atividade sinalizadora. Outros agentes de peptídeos preferidos da invenção combinam pelo menos uma propriedade desejável selecionada do grupo que consiste em uma alta potência anti-HIV, atividade de seqüestro de receptor e atividade de baixa sinalização com receptor de alta seletividade, isto é, ligação preferida a CCR5 ao invés de CCR1 e/ou CCR3.

[00014] Os agentes de peptídeos da invenção compreendem uma seqüência de assinatura compreendendo QGP[P ou L], isto é, a quarta posição da seqüência de assinatura tanto pode ser P ou L. De preferência a seqüência de assinatura está localizada próximo à terminação N do polipeptídeo. De preferência, a seqüência de assinatura está localizada tal que o início da seqüência de assinatura situa-se dentro de 15 resíduos da terminação N do polipeptídeo, mais preferentemente dentro de 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1 resíduos da terminação N. Aqui, a expressão "o início da seqüência de assinatura" refere-se à terminação N da seqüência de assinatura. A seqüência de assinatura também pode estar localizada no extremo da terminação N do polipeptídeo, isto é, a terminação N do polipeptídeo como um todo e a seqüência de assinatura podem coincidir.

[00015] Portanto, a invenção refere-se a um polipeptídeo compreendendo uma porção N terminal e a porção C terminal, onde a referida porção N-terminal compreende a seqüência de assinatura QGP[P ou L], e a seqüência de aminoácido da referida porção C terminal é pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 1.

- [00016] De preferência, a referida assinatura é
- [00017] QGP[P ou L][L ou G ou S ou M][M ou D ou S ou Q ou G], ou em um outro modo de execução preferido,
- [00018] QGP[P ou L][L ou G][M ou D ou S].
- [00019] Mais preferentemente, a referida seqüência de assinatura é
- [00020] QGP[P ou L][L ou G ou S ou M][M ou D ou S ou Q ou G]XX[Q ou G ou L ou A ou T ou S]X, ou em um outro modo de execução preferido,
- [00021] QGP[P ou L][L ou G][M ou D ou S]XX[Q ou L]X, onde X denota qualquer aminoácido natural ou modificado.
- [00022] Mais preferentemente, a referida seqüência de assinatura é QGP[P ou L] LM ou QGPPG[D ou S].
- [00023] Mais preferentemente, a referida seqüência de assinatura é QGPPLM ou QGPPGD.
- [00024] Em um modo de execução, a referida seqüência de assinatura é
- [00025] QGP[P ou L][L ou M][M ou Q][A ou W ou G ou Q ou N]X[Q ou G ou L][S ou V ou T ou G], ou em processos de execução ainda mais preferidos
- [00026] QGP[P ou L][L ou M][M ou Q][A ou W ou G ou Q ou N][L ou T ou M ou S ou G ou Q ou R ou Y][Q ou G ou L][S ou V ou T ou G], ou
- [00027] QGP[P ou L]LM[A ou W][L ou T ou M][[Q ou G][S ou V ou T ou G].
- [00028] De preferência, a referida seqüência de assinatura é QGPPLM[A ou W][L ou T ou M][[Q ou G][S ou V ou T ou G].
- [00029] Em um outro modo de execução, a referida seqüência de assinatura é
- [00030] QGP[P ou L][L ou G ou S][D ou S ou G ou Q] XX[L ou A ou T ou Q][W ou A ou V], ou em processos de execução ainda mais preferidos

[00031] QGP[P ou L][L ou G ou S][D ou S ou G ou Q][T ou I ou S ou W ou Q][V ou L ou A ou S ou G][L ou A ou T ou Q][W ou A ou V], ou

[00032] QGPPG[D ou S][T ou I]VL[W ou A].

[00033] De preferência, a referida seqüência de assinatura é QGPPGD[T ou I]VL[W ou A].

[00034] Em um outro modo de execução, a referida seqüência de assinatura é

[00035] QGPP[G ou L][M ou Q]XX[Q ou S][S ou V], ou em processos de execução ainda mais preferidos

[00036] QGPP[G ou L][M ou Q][S ou G ou W ou A ou T][L ou F ou T ou S ou G ou Y][Q ou S][S ou V], ou

[00037] QGPPLM[S ou G][L ou F ou T]Q[S ou V].

[00038] De acordo com modos de execução preferidos, o polipeptídeo da presente invenção compreende uma seqüência de assinatura selecionada do grupo QGPPLMALQS, QGPPLMWMQV, QGPPLMWLQV, QGPPLMWTQS, QGPPLMWLQT, QGPPLMWTQV, QGPPLMWMQS, QGPPLMATQS, QGPPLMWLQS, QGPPLMALQV, QGPPLMWLGG, QGPPLMWRGS, QGPPLMWLQV, QGPPLMQTTP, QGPPLSWLQV, QGPPLSWLQS, QGPPGQWSQV, QGPPMMAGLS, QGPPLSWQQS, QGPPGMWSQS, QGPPLQWRQS, QGPPLMGTQS, QGPPLMQLQV, QGPPLSWSQV, QGPMSWSQS, QGPPLMNLQV, QGPMSAYQV e QGPPMQGGLS.

[00039] De acordo com outros modos de execução preferidos, o polipeptídeo da presente invenção compreende uma seqüência de assinatura selecionada do grupo QGPPGDTVWLW, QGPPGDIVLA, QGPPGSYDYS, QGPPGDGGSV, QGPLSGQSTP, QGPPGDWLQV, QGPPLMSLAV, QGPPLMSLTV, QGPLSGWAQV, QGPLSQSSQV, QGPLSSQSQV e QGPLGQQGQV.

[00040] De acordo com outros modos de execução preferidos, o polipeptídeo da presente invenção compreende uma seqüência de

assinatura selecionada do grupo QGPPLMSFQS, QGPPLMSTQS, QGPPLMSLQV, QGPPLMGLQV, QGPLSGWLQV, QGPPLQWFQV, QGPPLQWTQV, QGPPLMALSV, QGPPLMWSQV, QGPPGQWGQV, QGPPGSWSQV, QGPPLMSSQS, QGPPLMGLSV, QGPPLMTLQV e QGPPGQWYQS.

[00041] De acordo com outros modos de execução preferidos, o polipeptídeo da presente invenção compreende uma seqüência de assinatura selecionada do grupo QGPPLMSVLA, QGPPGSWSSV, QGPPLGSMGP, QGPPLQWMQA, QGPPLQWMQV, QGPPLMSTQV, QGPPLMSLSV, QGPPLMSLQS, QGPPLMSLQA, QGPPLMSVQS, QGPPLMSAQs, QGPPLMSGQS e QGPPLMSGQV.

[00042] Em um outro modo de execução, a referida porção N-terminal consiste em não mais do que 15 aminoácidos, de preferência não mais do que 14, 13, 12, 11, 10 aminoácidos. De acordo com um modo de execução preferido, a referida porção N-terminal consiste em 10 aminoácidos.

[00043] De acordo com um modo de execução, a terminação N da porção C-terminal se justapõe diretamente à terminação C da porção N-terminal, isto é, a porção N-terminal e a porção C-terminal estão diretamente unidas.

[00044] Em um outro modo de execução, a referida porção C terminal da cadeia de polipeptídeo é idêntica à SEQ ID NO: 1.

[00045] Em um outro modo de execução, a seqüência de assinatura está localizada na terminação N extrema.

[00046] Modos de execução preferidos das seqüências de assinatura dos derivados RANTES da presente invenção são indicados na Tabela 1:

SEQ ID NO Seqüência de Assinatura

SEQ ID NO: 2

QGPPLMALQS

SEQ ID NO: 3

QGPPLMWMQV

SEQ ID NO: 4

QGPPLMWLQV

continuação

SEQ ID NO Seqüência de Assinatura

SEQ ID NO: 5

QGPPLMWTQS

SEQ ID NO: 6

QGPPLMWLQT

SEQ ID NO: 7

QGPPLMWTQV

SEQ ID NO: 8

QGPPLMWMQS

SEQ ID NO: 9

QGPPLMATQS

SEQ ID NO: 10

QGPPLMWLQS

SEQ ID NO: 11

QGPPLMALQV

SEQ ID NO: 12

QGPPLMWLGG

SEQ ID NO: 13

QGPPLMWRGS

SEQ ID NO: 14

QGPLLMWLQV

SEQ ID NO: 15

QGPPLMQTTP

SEQ ID NO: 16

QGPPGDTVW

SEQ ID NO: 17

QGPPGDIVLA

SEQ ID NO: 18

QGPPGSYDYS

SEQ ID NO: 19

QGPPGDGGSV

SEQ ID NO: 20

QGPLSGQSTP

SEQ ID NO: 21

QGPPGDWLQV

SEQ ID NO: 22

QGPPLMSFQS

SEQ ID NO: 23

QGPPLMSTQS

SEQ ID NO: 24

QGPPLMSLQV

SEQ ID NO: 25

QGPPLMGLQV

SEQ ID NO: 26

QGPLSGWLQV

SEQ ID NO: 27

QGPPLMSVLA

SEQ ID NO: 28

QGPPGSWSSV

SEQ ID NO: 29

QGPPLGSMGP

SEQ ID NO: 30

QGPPLSWLQV

SEQ ID NO: 31

QGPPLSWLQS

SEQ ID NO: 32

QGPPGQWSQV

SEQ ID NO: 33

QGPPMMAGLS

SEQ ID NO: 34

QGPPLSWQQS

continuação

SEQ ID NO Seqüência de Assinatura

SEQ ID NO: 35

QGPPGMWSQS

SEQ ID NO: 36

QGPPLQWRQS

SEQ ID NO: 37

QGPPLMGTQS

SEQ ID NO: 38

QGPPLMQLQV

SEQ ID NO: 39

QGPPLSWSQV

SEQ ID NO: 40

QGPPMSWSQS

SEQ ID NO: 41

QGPPLMNLQV

SEQ ID NO: 42

QGPPMSAYQV

SEQ ID NO: 43

QGPPMQGGLS

SEQ ID NO: 44

QGPPLMSLAV

SEQ ID NO: 45

QGPPLMSLTV

SEQ ID NO: 46

QGPLSGWAQV

SEQ ID NO: 47

QGPLSQSSQV

SEQ ID NO: 48

QGPLSSQSQV

SEQ ID NO: 49

QGPLGQQGQV

SEQ ID NO: 50

QGPPLQWFQV

SEQ ID NO: 51

QGPPLQWTQV

SEQ ID NO: 52

QGPPLMALSV

SEQ ID NO: 53

QGPPLMWSQV

SEQ ID NO: 54

QGPPGQWGQV

SEQ ID NO: 55

QGPPGSWSQV

SEQ ID NO: 56

QGPPLMSSQS

SEQ ID NO: 57

QGPPLMGLSV

SEQ ID NO: 58

QGPPLMTLQV

SEQ ID NO: 59

QGPPGQWYQS

SEQ ID NO: 60	QGPPLQWMQA
SEQ ID NO: 61	QGPPLQWMQV
SEQ ID NO: 62	QGPPLMSTQV
SEQ ID NO: 63	QGPPLMSLSV
SEQ ID NO: 64	QGPPLMSLQS

continuação

SEQ ID NO Seqüência de Assinatura

SEQ ID NO: 65	QGPPLMSLQA
SEQ ID NO: 66	QGPPLMSVQS
SEQ ID NO: 67	QGPPLMSAQS
SEQ ID NO: 68	QGPPLMSGQS
SEQ ID NO: 69	QGPPLMSGQV

[00047] A presente invenção fornece os agentes de peptídeos conforme descrito acima e, além disso, ácidos nucleicos que codificam os referidos agentes de peptídeos. Os referidos ácidos nucleicos podem ser referidos como "ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção". A seguir, o termo "agente" abrange ambos os agentes de peptídeos da presente invenção e os ácidos nucleicos que codificam os referidos agentes de peptídeos. O versado saberia como projetar ou identificar ácidos nucleicos que codificam os referidos agentes de peptídeos de acordo com o código genético.

[00048] A presente invenção descreve portanto ácidos nucleicos compreendendo um ou mais segmentos que codificam um ou mais agentes de peptídeos de acordo com a presente invenção. O referido ácido nucleico pode ser RNA ou DNA. Os referidos ácidos nucleicos podem, além disso, ser um vetor, isto é, ácidos nucleicos que codificam os peptídeos da presente invenção podem ser incorporados dentro de um vetor. Ácidos nucleicos que codificam os peptídeos da presente invenção podem, além disso, ser incorporados em um vírus. A invenção, portanto, também fornece um vírus que contem, dentro de

seu genoma, a abrangência de um ou mais segmentos que codificam um ou mais agentes de peptídeos de acordo com a presente invenção.

[00049] De preferência, os agentes de peptídeos da presente invenção são inibidores altamente potentes contra a entrada de HIV nas células, isto é, apresentam uma alta potência anti-HIV. De acordo com a presente invenção, as expressões "alta potência anti-HIV", "alta potência" ou "altamente potente" são empregadas com referência aos agentes ou agentes de peptídeos contendo um valor IC50, conforme medido pela fusão celular e ensaios de replicação descritos sob Materiais e Métodos (Material & Methods), de 1000 pM (1 nM) ou mais baixo, de preferência menor do que 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, ou 20 pM.

[00050] Na literatura, a potência dos agentes é algumas vezes expressa em termos de valores "IC50" obtidos a partir de um ensaio de ligação competitiva, isto é, tipicamente, com respeito à competição com moléculas traçadoras rotuladas para ligação ao receptor de interesse. Neste caso, o IC50 é definido como a concentração do agente no qual 50% do traçador é deslocado do receptor pelo referido agente, e algumas vezes também é referido como uma "afinidade aparente". Entretanto, para os agentes da presente invenção, verificou-se que tais valores de afinidade aparente IC50, obtidos, por exemplo, no que se refere a RANTES nativos ou a MIP-1beta, nem sempre são proporcionais à potência anti-HIV da molécula. É, portanto, preferível usar valores IC50 obtidos dos ensaios descritos sob Materiais e Métodos.

[00051] Nos modos de execução preferidos, os agentes de peptídeos são peptídeos ou polipeptídeos que estão relacionados ao peptídeo RANTES. Os agentes de peptídeos podem compreender a seqüência SEQ ID NO: 1, ou uma variante, homólogos (ortólogos,

variante alélica, derivados funcionais mutantes) ou seus fragmentos. De preferência, a referida seqüência ou a variante, homóloga, ou fragmento ou portanto constituintes, ou está localizada dentro de uma parte diferente, no agente de peptídeo, do que a seqüência de assinatura. Entretanto, a seqüência de assinatura também pode estar contida dentro da variante ou homólogo SEQ ID NO: 1.

[00052] As referidas variantes, homólogos ou fragmentos podem conter substituições de seqüências, inserções, deleções, adições ou truncagens.

[00053] De acordo com a presente invenção, diz-se que uma seqüência possui uma similaridade a, ou é um homólogo da SEQ ID NO: 1, se a referida seqüência tem mais do que 70% de identidade de seqüência com a SEQ ID NO: 1, mais preferentemente, a referida seqüência tem mais do que 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 99,9% de identidade de seqüência com a SEQ ID NO: 1.

[00054] Diz-se também que uma seqüência possui uma similaridade a, ou é homóloga à SEQ ID NO: 1, se ela contém uma ou mais substituições conservadoras no que se refere à SEQ ID NO: 1. Substituições conservadoras são substituições na seqüência de um agente peptídeo ou agente de polipeptídeo que não levam a uma perda significativa de função do referido agente, ou que levam somente a uma pequena perda de função. Tal perda de função devido a uma ou mais substituições conservadoras pode ser considerada não significativa se essas referidas quantidades de perda somam menos do que 20% (de preferência menos do que 15%, 10%, 6% ou 4%) no que se refere à função do agente que contem a seqüência não substituída. Substituições conservadoras são comumente substituições onde uma cadeia lateral de aminoácido é substituída por uma cadeia lateral de aminoácido que está relacionada, ou similar em propriedades físicoquímicas, com o resíduo substituído. Tais

substituições conservadoras podem ser preparadas, por exemplo, de acordo com a tabela abaixo. Aminoácidos no mesmo bloco na coluna do meio e de preferência na mesma linha da coluna do lado direito podem ser substituídos um pelo outro:

Tabela 2:

Alifático	Não-polar	G A P
		I L V
	Polar não-carregado	C S T M
		N Q
	Polar carregado	D E
		K R H
Aromático		H F W Y

[00055] De acordo com a presente invenção diz-se que uma seqüência possui uma similaridade ou é homóloga à SEQ ID NO: 1, se mais do que 30% dos resíduos na referida seqüência são idênticos ou conservadores substituídos no que se refere à SEQ ID NO: 1. De preferência, mais do que 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% da referida seqüência são idênticas ou conservadores substituídas no que se refere à SEQ ID NO: 1.

[00056] A invenção ainda fornece polipeptídeos compreendendo fragmentos da SEQ ID NO: 1 ou os seus referidos homólogos. Os fragmentos deveriam compreender pelo menos n aminoácidos consecutivos da SEQ ID NO: 1 ou os seus referidos homólogos e, dependendo da seqüência particular, n é 5 ou mais (de preferência mais do que 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 57).

[00057] Os agentes de peptídeos da invenção têm, de preferência, baixa atividade de sinalização, isto é, sua administração e/ou ligação a CCR5 causa somente um baixo grau de sinalização pró-inflamatória

em células alvo. Agentes de peptídeos com "baixa atividade sinalizadora" de acordo com a presente invenção, levam a uma resposta sinalizadora de 30% ou menos da resposta máxima (Emax) elicitada por PSC-RANTES, quando testados a uma concentração de 300 nM no ensaio sinalizador do fluxo de cálcio (ver sob Matéria primas e métodos). De preferência, os agentes de peptídeos da invenção possuem atividades sinalizadoras e, conforme medido no referido ensaio, menores do que 30%, mais preferentemente menores do que 26%, 22%, 20%, 18%, 16%, 14%, 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1%.

[00058] Os agentes de peptídeos da invenção são, de preferência, seletivos mais para CCR5 do que para receptores CCR1 e CCR3. De acordo com a presente invenção, um agente que se liga a CCR1 e/ou CCR3 bem como a CCR5, ainda é considerado possuidor de uma seletividade para CCR5 sobre CCR1 e CCR3 caso ele não ative substancialmente CCR1 ou CCR3. Mais preferentemente, os agentes da presente invenção ou nem se ligam substancialmente, nem ativam substancialmente CCR1 e CCR3. No contexto da presente invenção, considera-se que um agente não se liga substancialmente a CCR1 e/ou CCR3 se o valor de IC₅₀ do agente, no que se refere à ligação a CCR1 e/ou CCR3, é maior do que 50 nM, mais preferentemente maior do que 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 nM, conforme medido usando o ensaio de discriminação de ligação CCR1 e/ou o ensaio de discriminação de ligação CCR3 (ver Materiais e Métodos). Seletividade da ativação de CCR5 sobre a ativação de CCR1 e/ou CCR3 pode ser avaliada por meio do teste do fluxo de cálcio conforme descrito em Materiais e Métodos. No contexto da presente invenção, considera-se que um agente não ativa substancialmente CCR1 e/ou CCR3 se sua atividade de sinalização é menor do que 30%, mais preferentemente

menor do que 26%, 22%, 20%, 18%, 16%, 14%, 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do Emax elicitado naquele receptor nativo RANTES/CCL5, conforme medido pelo ensaio do fluxo de cálcio.

[00059] Os agentes de peptídeos da invenção de preferência possuem alta atividade de seqüestro do receptor, isto é, a administração e/ou ligação a CCR5 causam um alto grau de seqüestro de receptor. O referido seqüestro é de preferência internalização do receptor, regulação negativa ou modulação negativa. Agentes de peptídeos com "elevada atividade de seqüestro do receptor" de acordo com a presente invenção levam ao seqüestro de pelo menos 50% do nível de controle das moléculas da superfície de CCR5, quando testado no ensaio de modulação negativa da superfície de CCR5/seqüestro de receptor (ver em Materiais e Métodos). De preferência, agentes de peptídeos da invenção possuem atividades de seqüestro de receptor maiores do que 50% do nível de controle da superfície de CCR5, por exemplo, pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95% do nível de controle da superfície de CCR5.

[00060] De preferência, os agentes da invenção combinam elevada potência anti-HIV com baixa atividade de sinalização, ou combinam alta potência anti-HIV com alta atividade de seqüestro do receptor. Mais preferentemente, os agentes da invenção combinam alta potência anti-HIV com ambos baixa sinalização e alta atividade de seqüestro de receptor. Além disso, os agentes de acordo com a invenção combinam, de preferência, pelo menos uma propriedade selecionada do grupo que consiste em elevada potência anti-HIV, elevada atividade de seqüestro de receptor e baixa atividade sinalizadora com seletividade para CCR5. De acordo com certos modos de execução preferidos da invenção, os agentes da invenção são caracterizados por uma combinação de níveis intermediários de

potência anti-HIV (níveis IC₅₀, conforme medido pelo ensaio de fusão celular, de por exemplo, entre 0,15 e 1 nM, entre 0,15 e 0,7 nM, entre 0,3 e 1 nM, ou entre 0,5 e 1 nM) com níveis intermediários de atividade sinalizadora (por exemplo, entre 30% e 50%, ou entre 30% e 45% conforme medido pelo ensaio do fluxo de cálcio) e níveis intermediários de atividade de seqüestro de receptores (p.ex., entre 20% e 60%, entre 30% e 50%, entre 20% e 50%, ou entre 30% e 60%, conforme medido pelo ensaio de modulação negativa da superfície de CCR5. Ensaio são descritos abaixo em Materiais e Métodos.

[00061] Os termos proteína, "peptídeo" ou "polipeptídeo" são usados intercambiavelmente e referem-se a polímeros de aminoácido de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, ele pode compreender aminoácidos modificados e ele pode ser interrompido por não-aminoácidos. Os termos também abrangem um polímero aminoácido que foi modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, formação de ligação de dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, ou qualquer outra manipulação ou modificação, tal como conjugação com um componente rotulador. Também estão incluídos na definição, por exemplo, polipeptídeos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. Polipeptídeos podem ocorrer como cadeias simples ou associadas. Os polipeptídeos da invenção podem ser glicosilados naturalmente ou não-naturalmente (*isto é o polipeptídeo tem um padrão de glicosilação que difere do padrão de glicosilação verificado no polipeptídeo correspondente que ocorre naturalmente*).

Preparação dos Agentes de Peptídeos

[00062] Os agentes de peptídeos da invenção podem ser preparados de várias maneiras, por exemplo, usando técnicas

conhecidas de biologia molecular (isto é engenharia genética e fermentação – em geral, biotecnologia) ou química de proteína (por exemplo, síntese química de peptídeo).

[00063] O peptídeo e os agentes de ácido nucléico são de preferência preparados usando as técnicas de engenharia genética conhecidas conforme descrito, por exemplo, em [0]. A invenção fornece, portanto, um processo para a produção de agentes de peptídeos ou polipeptídeos da invenção, compreendendo a etapa de cultivo de uma célula hospedeira sob condições que induzem a expressão do polipeptídeo.

[00064] Por exemplo, agentes de peptídeos da presente invenção podem ser preparados na forma recombinante por expressão em uma célula hospedeira. Tais métodos de expressão são bastante conhecidos pelos versados na técnica, e muitos são descritos em detalhes em [13]. Um vetor de expressão apropriado pode ser escolhido no hospedeiro da escolha. O vetor pode conter uma molécula de DNA recombinante que codifica um agente de peptídeo ligado operativamente a uma seqüência de controle de expressão que é reconhecida pelo maquinário de transcrição do hospedeiro. Quando um agente de peptídeo da invenção é assim produzido por expressão recombinante, o agente é recuperado por purificação de uma cultura de células hospedeiras.

[00065] Um método preferido envolve a síntese química in vitro A [0, 0]. A invenção fornece, portanto, um processo para a preparação de um agente peptídeo, onde o agente peptídeo é sintetizado em parte ou no todo usando meios químicos. A síntese de peptídeos em fase sólida é particularmente preferida, assim como métodos à base da química de tBoc ou Fmoc [0]. A síntese enzimática [0] também pode ser empregada no todo ou em parte.

[00066] Outra síntese biológica diferente de por expressão em uma

célula hospedeira, pode ser empregada, por exemplo, os polipeptídeos podem ser produzidos por translação de RNA in vitro. Agentes de peptídeos da invenção também podem ser preparados, por exemplo, por digestão de polipeptídeos mais longos usando proteases.

[00067] Métodos biológicos, incluindo engenharia genética, fermentação e expressão, são em geral restritos à produção de polipeptídeos baseados em L-aminoácidos, mas a manipulação do maquinário de translação in vivo ou in vitro (por exemplo de moléculas de aminoacila de tRNA) pode ser usada para permitir a introdução de D-aminoácidos (ou outros aminoácidos não naturais, tais como iodotirosina ou metilfenilalanina, azidohomoalanina, etc.) [0]. Onde D-aminoácidos estão incluídos, entretanto, é preferido o uso de síntese química. Os polipeptídeos da invenção podem ter modificações covalentes na terminação C e/ou na terminação N.

Células Hospedeiras

[00068] A presente invenção também fornece uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucléico de acordo com a presente invenção.

[00069] De acordo com um aspecto da invenção, a célula hospedeira é apropriada para a produção biotecnológica dos agentes da presente invenção. Hospedeiros apropriados para a produção biotecnológica dos agentes da presente invenção incluem espécies procarióticas normalmente usadas, tais como E. coli, ou levedos eucarióticos que podem ser preparados para expressar altos níveis de proteínas recombinantes e que podem ser facilmente cultivados em grandes quantidades. Linhas celulares cultivadas in vitro também são apropriadas, particularmente quando se emprega sistemas de expressão movidos a vírus, tais como o sistema de expressão de baculovírus, o qual envolve o uso de células de insetos como hospedeiros. Agentes de peptídeos também podem ser expressos in

vivo, por exemplo, em larvas de inseto ou em tecidos mamíferos. De preferência, o agente peptídeo é expresso em *E. coli*; por exemplo, a cepa BLR(DE3) é apropriada, apesar de sistemas equivalentes serem igualmente apropriados, como o leitor qualificado estará ciente.

[00070] De acordo com um outro aspecto da invenção, é fornecida uma célula hospedeira que é capaz de sobreviver e ser propagada no intestino humano ou animal (tripa) ou vagina, e de preferência expressar aí o agente peptídeo codificado pelo referido ácido nucléico. De preferência, a célula hospedeira de acordo com este aspecto da invenção também secreta o referido agente peptídeo no periplasma ou meio. Aqui, posteriormente, o termo "agente" compreende, além disso, células hospedeiras conforme descrito aqui.

[00071] De preferência, a célula hospedeira é um micro-organismo altamente colonizador e não patogênico. Microorganismos altamente colonizadores de acordo com a presente invenção são cepas que são capazes de competir com micróbios indígenas para colonização prolongada das superfícies internas das mucosas. A célula hospedeira de preferência é um micro-organismo que pertence à flora do intestino humano ou vagina, mais preferentemente um micro-organismo que é comumente encontrado na flora do intestino humano ou vagina. Mais preferentemente, a célula hospedeira é um probiótico e/ou um micro-organismo comensal, isto é, um gênero, espécie ou cepa benéficos a pelo menos um hospedeiro humano. De preferência a célula hospedeira de acordo com a presente invenção é parte do ser humano normal ou sadio, ou flora animal intestinal ou vaginal. De acordo com um modo de execução, a célula hospedeira pertence a um gênero selecionado do grupo que consiste em bacteroides, Clostridium, Fusobacterium, Eubacterium, Ruminococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Streptococcus, Escherichia e Lactobacillus. A célula hospedeira, de preferência, é uma espécie

selecionada do grupo que consiste em *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus GG*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* e *Streptococcus gordonii*. De preferência, o micro-organismo altamente colonizador de acordo com a presente invenção é *Escherichia coli* Nissle 1917. Entretanto, qualquer outra cepa altamente colonizadora, tanto de *Escherichia coli* ou outra das espécies anteriormente mencionadas, é também uma cepa preferida de acordo com a presente invenção. Em um outro modo de execução, a célula hospedeira é um levêdo. De preferência, o levêdo é um levêdo comensal, tal como *Pichia guelliermondii* ou *Saccharomyces boulardii*. Ainda em um outro modo de execução, uma célula hospedeira é uma célula humana.

[00072] O versado está bastante acostumado com métodos de transformação de micro-organismos com ácidos nucleicos estranhos e subsequente emprego dos micro-organismos transformados para expressar um polipeptídeo codificado pelos referidos ácidos nucleicos, na forma intracelular, periplásmica ou secretada [ver as referências 0, 0, 0, 0].

Composições Farmacêuticas

[00073] A presente invenção fornece composições compreendendo um agente de acordo com a presente invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável. Os agentes da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitáveis dos agentes de peptídeos ou ácidos nucleicos correspondentes, são portanto fornecidos para uso como um fármaco. As composições de acordo com a presente invenção podem compreender qualquer agente da presente invenção, isto é, aqui posteriormente, um agente de polipeptídeo, um seu sal

farmaceuticamente aceitável, um ácido nucléico, um seu sal farmaceuticamente aceitável, ou uma célula hospedeira de acordo com a presente invenção. A preparação de composições farmacêuticas é bastante conhecida daqueles versados na técnica.

[00074] As composições farmacêuticas da presente invenção podem, em particular, compreender mais do que um agente (múltiplo) da presente invenção, p.ex., dois ou mais agentes. A invenção também fornece uma preparação farmacêutica ou sistema, compreendendo (a) um primeiro agente, que é um agente da invenção; e (b) um segundo agente farmacêutico. De acordo com certos modos de execução, o segundo agente farmacêutico pode incluir inibidores de transcriptase reversa (RTI), inibidores de protease (PI), inibidores de integrase e inibidores de conjuntos virais. De acordo com outros modos de execução, o segundo agente farmacêutico pode incluir outros inibidores de entrada além daqueles da presente invenção, por exemplo, substâncias polianiónicas (por exemplo, sulfato de celulose), agentes de ligação glicano ou lecitinas, aglutinantes de receptores de glicano (por exemplo, manano solúvel), anticorpos, inibidores de entrada de pequenas moléculas, inibidores de entrada de peptídeos ou agentes de ligação de CXCR4 (agentes bloqueadores de CXCR4). De acordo ainda com outros modos de execução, o segundo agente farmacêutico pode incluir um detergente, ou um agente que modifica o pH, por exemplo, um ácido ou um agente tamponador de pH. Ainda de acordo com outros modos de execução, o segundo agente farmacêutico pode incluir um inibidor de RNA (siRNA), onde o siRNA pode ser quimicamente modificado.

[00075] De acordo com outros aspectos da invenção, o referido segundo agente também pode ser um fármaco anti-inflamatório ou um imunossupressor. Os referidos agentes múltiplos da invenção, ou os referidos primeiros e segundos agentes, são formulados tanto em

mistura ou como composições separadas, por exemplo, para administração simultânea apesar de separada, ou para administração seqüencial (ver abaixo).

[00076] Sais farmacêuticamente aceitáveis dos agentes da invenção podem é claro ser preparados por procedimentos convencionais, tais como por reação da base livre e/ou ácido livre do agente com pelo menos uma quantidade estequiométrica do ácido ou base formadores de sal desejado.

[00077] Sais farmacêuticamente aceitáveis dos agentes da invenção incluem sais com cátions inorgânicos, tais como sódio, potássio, cálcio, magnésio, zinco e amônio, e sais com bases orgânicas. Bases orgânicas apropriadas incluem N-metil-D-glucamina, arginina, benzatina, diolamina, olamina, procaína e trometamina. Sais farmacêuticamente aceitáveis dos agentes de acordo com a invenção também incluem sais derivados de ácidos orgânicos ou inorgânicos. Ânions apropriados incluem acetato, adipato, besilato, brometo, camsilato, cloreto, citrato, edisilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hiclato, hidrobrometo, hidrocloreto, iodeto, isetionato, lactato, lactobionato, maleato, mesilato, metilbrometo, metilsulfato, napsilato, nitrato, oleato, palmoato, fosfato, poligalacturonato, estearato, succinato, sulfato, sulfosalicilato, tanato, tartarato, tereftalato, tosilato e trietiodeto.

[00078] Formas de dosagem farmacêutica de um agente da invenção podem ser fornecidas em um desprendimento instantâneo, desprendimento controlado, desprendimento sustentado, ou sistema de fornecimento de fármaco alvo.

[00079] Formas de dosagem usualmente empregadas incluem, por exemplo, soluções e suspensões, (micro-) emulsões, ungüentos, géis, cremes, pastas, espumas, supositórios, óvulos, implantes, curativos, lipossomas, comprimidos, drágeas, losangos, cápsulas de envoltório

macio ou rígido, pós amorfos ou cristalinos, pós efervescentes ou comprimidos, aerosóis, e formulações liofilizadas. Dependendo da via de administração usada, dispositivos especiais podem ser requisitados para aplicação ou administração do fármaco, tais como, por exemplo, seringas e agulhas, inalantes, bombas, aplicadores por canetas de injeção, frascos especiais ou outros dispositivos para administração, que também podem ser implantados dentro do corpo. Em particular, os agentes da presente invenção também podem, por exemplo, ser compostos de, ou estar associados a um dispositivo contraceptivo ou agente, por exemplo, um dispositivo intrauterino ou intracervical, espiral ou diafragma, ou distribuído em um preservativo, por exemplo, contido na forma de um revestimento líquido, solução, gel ou pó. Entretanto, de acordo com a presente invenção, os agentes da presente invenção não necessitam necessariamente estar associados a, um dispositivo ou agente contraceptivo. De preferência, o agente de acordo com a invenção está compreendido e é administrado por um sistema de fornecimento de depósito. De preferência, o referido sistema de fornecimento de depósito compreende um anel vaginal ou outro implante que é apropriado para a inserção e/ou implante na vagina ou cerviz, e fornece um desprendimento lento (controlado e/ou sustentado) do agente da presente invenção.

[00080] Formas de dosagem farmacêutica são normalmente compostas do fármaco, de um excipiente (s), e um sistema de fechamento do recipiente. Um ou múltiplos excipientes, também referidos como ingredientes inativos, podem também ser adicionados a um agente da invenção para aperfeiçoar ou facilitar a fabricação, estabilidade, administração, e segurança do fármaco, e podem fornecer um meio para se obter um perfil de desprendimento de fármaco desejado. Portanto, o tipo de excipiente(s) a ser(em) adicionado(s) ao fármaco, pode depender de vários fatores, tais como,

por exemplo, as propriedades físicas e químicas do fármaco, a via de administração, e o procedimento de fabricação. Excipientes farmaceuticamente aceitáveis estão disponíveis na técnica e incluem aqueles listados em várias farmacopéias. (Ver, por exemplo, [0, 0])

[00081] Formas de dosagem farmacêutica de um agente da presente invenção podem ser preparadas por quaisquer dos métodos bem conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, processos de misturação convencionais, peneiramento, dissolução, fusão, granulação, preparação de drágeas, preparação de comprimidos, suspensão, extrusão, secagem por borrfio, levigação, emulsificação, (nano/micro-) encapsulação, aprisionamento, ou liofilização. Conforme notado acima, as composições da presente invenção podem incluir um ou mais ingredientes inativos fisiologicamente aceitáveis que facilitam o processamento de moléculas ativas em preparados para uso farmacêutico.

[00082] Uma formulação apropriada depende da via de administração desejada. Para injeção endovenosa, por exemplo, a composição pode ser formulada em solução aquosa, se necessário usando tamponadores fisiologicamente compatíveis, incluindo, por exemplo, fosfato, histidina, ou citrato para ajuste do pH da formulação pH, e um agente de tonicidade, tal como, por exemplo, cloreto de sódio ou dextrose. Para administração transmucosal ou nasal, formulações semissólidas, líquidas, ou em curativos, podem ser preferidas, possivelmente contendo promotores de penetração. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica. Para administração oral, os agentes podem ser formulados nas formas de dosagem líquida ou sólida e em formulações de desprendimento instantâneo ou controlado/sustentado. Formas de dosagem apropriadas para ingestão oral por um indivíduo incluem comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas de revestimento rígido e macio, líquidos,

géis, xaropes, lamas, suspensões e emulsões. Os agentes também podem ser formulados em composições retais, tais como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, contendo bases de supositório convencionais tais como manteiga de cacau ou outros glicerídeos. Para supositórios vaginais, muitas bases de supositório diferentes conhecidas pelos versados na técnica podem ser usadas, por exemplo, gelatina glicerinada, gelatina despolarizada, manteiga de cacau, polietileno glicol, polisorbato, ou outros.

[00083] Para administração oral, os agentes da invenção geralmente serão fornecidos nas formas de dosagem sólida, por exemplo, na forma de comprimidos ou cápsulas, ou como uma solução aquosa ou suspensão.

[00084] Formas de dosagem oral sólida podem ser obtidas usando excipientes, que podem incluir diluentes inertes, preenchedores, desintegrantes, aglutinantes (seco e úmido), retardantes de dissolução, lubrificantes, deslizantes, antiaderentes, resinas de troca catiônicas, agentes umectantes, antioxidantes, preservantes, agentes de coloração, adoçantes e agentes aromatizantes. Esses excipientes podem ser de fonte sintética ou natural. Exemplos de tais excipientes incluem derivados de celulose, ácido cítrico, fosfato de dicálcio, gelatina, carbonato de magnésio, lauril sulfato de magnésio/sódio, manitol, polietileno glicol, polivinil pirrolidona, silicatos, dióxido de silício, benzoato de sódio, sorbitol, amidos, ácido esteárico ou seus sais, açúcares (isto é dextrose, sucrose, lactose, etc.), talco, mucilagem de tragacanto, óleos vegetais (hidrogenados), e ceras. Etanol e água podem servir como auxiliares de granulação. Em certos momentos é desejável o revestimento de comprimidos, por exemplo, com um filme de mascaramento de paladar, um filme resistente a ácido gástrico, ou um filme de retardamento do desprendimento. Polímeros naturais e sintéticos, em combinação com corantes,

açúcares e solventes orgânicos ou água, são comumente empregados para revestir comprimidos, resultando em drágeas. Quando é preferida uma cápsula ao invés de um tablete, o pó do fármaco, a suspensão, ou sua solução, podem ser fornecidos em uma cápsula de revestimento rígido ou macio compatível.

[00085] Diluentes inertes apropriados incluem carbonato de sódio e cálcio, fosfato de sódio e cálcio, e lactose. Amido de milho e ácido algínico são agentes de desintegração apropriados. Agentes de ligação podem incluir amido e gelatinas. O agente de lubrificação, se presente, geralmente será estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco. Se desejado, os comprimidos podem ser revestidos com um material tal como monoestearato de glicerila ou diestearato de glicerila, para retardar a absorção no trato gastrointestinal.

[00086] Cápsulas para uso oral incluem cápsulas de gelatina dura na qual o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido e cápsulas de gelatina mole, onde o ingrediente ativo é misturado com água ou com um óleo tal como óleo de amendoim, parafina líquida ou azeite de oliva.

[00087] Em um modo de execução, os agentes da presente invenção podem ser administrados topicamente, via a pele ou membrana da mucosa, tal como através de um adesivo para pele, uma formulação semissólida ou uma formulação líquida, por exemplo, um gel, uma (micro-) emulsão, um ungüento, uma solução, uma suspensão (nano/micro), ou uma espuma. A penetração do fármaco na pele ou membrana da mucosa e tecidos subadjacentes pode ser regulada, por exemplo, usando promotores de penetração; pela escolha apropriada e combinação de excipientes lipofílicos, hidrofílicos, e excipientes anfifílicos, incluindo água, solventes orgânicos, ceras, óleos, polímeros sintéticos e naturais, agentes tensoativos, emulsificantes; por ajuste do pH; e pelo uso de agentes

complexadores. Outras técnicas, tais como iontoforese, podem ser empregadas para regular a penetração de um agente da invenção. A administração transdérmica ou tópica seriam preferidas, por exemplo, em situações nas quais é desejado o fornecimento local com uma exposição sistêmica mínima.

[00088] Para administração por inalação, ou administração ao nariz, os agentes para uso de acordo com a presente invenção são convenientemente fornecidos na forma de uma solução, suspensão, emulsão, ou embalagens pressurizadas em aerosol semissólido, ou um nebulizador, usualmente com o uso de um propelente, por exemplo, carbonos halogenados derivados de metano e etano, dióxido de carbono, ou qualquer outro gás apropriado. Como aerosóis tópicos, hidrocarbonetos semelhantes a butanos, como butanos, isobutenos, e pentanos, são úteis. No caso de um aerosol pressurizado, a unidade de dosagem apropriada pode ser determinada pelo emprego de uma válvula para fornecer uma quantidade determinada. Podem ser formuladas cápsulas e cartuchos, por exemplo, de gelatina para uso em um inalador ou insuflador. Esses contêm tipicamente uma mistura em pó do agente e uma base em pó apropriada, tal como lactose ou amido.

[00089] Composições formuladas para administração parenteral por injeção são usualmente estéreis e podem estar presentes em formas de dosagem unitárias, por exemplo, em ampolas, seringas, canetas injetoras, ou em recipientes de múltiplas doses, as últimas contendo usualmente um conservante. As composições podem tomar formas, tais como suspensões, soluções, ou emulsões, ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação, tais como soluções tampão, agentes tonificantes, agentes elevadores da viscosidade, agentes tensoativos, agentes de suspensão e dispersantes, antioxidantes, polímeros biocompatíveis, agentes

quelados, e conservantes. Dependendo do local da injeção, o veículo pode conter água, um óleo sintético ou vegetal, e/ou cossolventes orgânicos. Em certos casos, tais como com um produto liofilizado ou um concentrado, a formulação parenteral seria reconstituída ou diluída antes da administração. Formulações de depósito, que fornecem um desprendimento controlado ou sustentado de um agente da invenção, podem incluir suspensões injetáveis de nano/micro partículas ou nano/micro cristais ou cristais não-micronizados. Polímeros tais como ácido poli(lático), ácido poli(glicólico), ou seus copolímeros, podem servir como matrizes de desprendimento controlado/sustentado, além de outros bem conhecidos na técnica. Outros sistemas de fornecimento de depósito podem estar presentes na forma de implantes e bombas que requerem incisão.

[00090] Carreadores apropriados para injeção endovenosa para as moléculas da invenção são bem conhecidas na técnica e incluem soluções à base de água contendo uma base, tal como por exemplo hidróxido de sódio, para formar um agente ionizado, sucrose ou cloreto de sódio como um agente de tonicidade, por exemplo. A solução à base de água pode compreender uma solução tampão contendo fosfato ou histidina. Co-solventes, tais como por exemplo polietileno glicóis, podem ser adicionados. Esses sistemas à base de água são agentes eficazes na dissolução de agentes da invenção e produzem baixa toxidez sob administração sistêmica. As proporções dos componentes de um sistema de solução pode variar consideravelmente, sem destruir a solubilidade e características de toxidez. Além disso, a identidade dos componentes pode ser variada. Por exemplo, agentes tensoativos de baixa toxidez, tais como polisorbatos ou poloxâmeros podem ser empregados, assim como polietileno glicol ou outros cossolventes, polímeros biocompatíveis tais como polivinil pirrolidona podem ser adicionados, e outros açúcares e

polióis podem substituir dextrose.

Outros Aspectos da Invenção

[00091] A presente invenção, além disso, fornece um kit, por exemplo, um kit de diagnóstico compreendendo um ou mais agentes de peptídeos, ácidos nucleicos ou células hospedeiras de acordo com a invenção.

Usos das Moléculas da Invenção

Usos Baseados na Função Biológica; Tratamento e Prevenção de Doenças

[00092] A presente invenção estabelece o uso dos agentes de peptídeos da presente invenção ou de bloqueio e/ou causadores do seqüestro de CCR5. O seqüestro pode estar na forma da internalização de CCR5 nas células alvo e/ou a regulação negativa (modulação negativa) de CCR5 nas células alvo. A invenção também estabelece o uso de ácidos nucleicos que codificam os referidos agentes de peptídeo, ou uma célula hospedeira de acordo com a presente invenção (ver acima compreendendo um ácido nucleico da presente invenção, para a expressão e opcionalmente a secreção dos referidos agentes de peptídeos.

[00093] Conforme mencionado acima, no que se refere à presente invenção, o termo "agente" abrange agentes de peptídeos, ácidos nucleicos que codificam os referidos agentes de peptídeos, e células hospedeiras de acordo com a invenção. A invenção estabelece o uso dos referidos agentes para o tratamento e/ou profilaxia (prevenção) de doenças que podem ser tratadas por bloqueio e/ou que causam o seqüestro de CCR5. Os agentes da presente invenção são, portanto, fornecidos para uso como fármacos.

[00094] Um ou mais dos agentes da presente invenção podem ser administrados a um indivíduo. Quando mais do que um agente é administrado, os referidos agentes podem ser administrados juntos

(como uma mistura ou separadamente apesar de substancialmente simultaneamente) ou sequencialmente. Os referidos um ou mais agentes da presente invenção podem ser administrados em combinação com um ou mais outros agentes farmacologicamente ativos que não estão compreendidos dentro dos agentes da presente invenção. O agente ou agentes da presente invenção podem então ser administrados também conjuntamente (como uma mistura ou separadamente apesar de substancialmente simultaneamente) com os referidos um ou mais outros agentes farmacologicamente ativos, ou sequencialmente.

[00095] De acordo com um aspecto preferido, a presente invenção estabelece o uso dos referidos agentes de peptídeos, ou de ácidos nucleicos que codificam os agentes de peptídeos, para o tratamento e/ou prevenção de infecções de HIV e/ou o surgimento da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), e/ou distúrbios e doenças associadas com ela, em um indivíduo.

[00096] A presente invenção fornece, portanto, um método de tratamento ou prevenção de infecção por HIV (a transmissão de HIV) em um indivíduo compreendendo a administração de uma composição compreendendo um agente da presente invenção. Além disso, é fornecido um método de tratamento, ou prevenção do surgimento da síndrome de imunodeficiência (AIDS) em um indivíduo, que compreende a administração de um agente que compreende um agente da presente invenção.

[00097] Por exemplo, a transmissão de HIV, isto é, a infecção de células alvo por HIV, pode ser evitada por aplicação de uma composição de acordo com a invenção (por exemplo, um supositório, creme, gel, espuma, pasta, solução, líquido ou pó contendo um agente de acordo com a presente invenção). Neste modo de execução, a referida composição é de preferência aplicada à genitália humana

(vagina, reto, intestino) antes ou durante ou depois do contato sexual para evitar a transmissão de HIV durante o contato sexual. Mais preferentemente, a referida composição é aplicada antes do contato sexual.

[00098] A presente invenção também fornece o uso de agentes da presente invenção como agentes anti-inflamatórios. Os agentes são, portanto, úteis para o tratamento e/ou prevenção de doenças inflamatórias e doenças autoimunes. De acordo com um outro aspecto da invenção, os agentes da presente invenção são úteis para o tratamento e/ou prevenção de doenças malignas, e também para o tratamento e/ou prevenção de infecções bacterianas e infecções virais. Aqui o vírus pode ser HIV ou um vírus diferente de HIV.

[00099] De acordo com outros aspectos da invenção, também é fornecido um método de tratamento ou prevenção de inflamação, doenças inflamatórias, doenças autoimunes ou bacterianas e infecções virais compreendendo a administração de uma composição compreendendo um agente da presente invenção. Em particular, por exemplo, é fornecido um método de tratamento ou prevenção de doença de intestino inflamatório, artrite reumatóide, aterosclerose ou arterioesclerose, asma, rinite alérgica ou dermatite atópica, a rejeição de órgãos transplantados, tecidos ou células, esclerose múltipla e/ou outras doenças desmielinizantes, neuropatia periférica, bem como cânceres, incluindo cânceres em metástase.

[000100] Em um outro modo de execução da invenção, para qualquer das doenças e condições acima, é fornecido um método de tratamento ou profilaxia, onde uma célula hospedeira, conforme divulgado acima, é administrada a um indivíduo, sendo que a referida célula hospedeira expressa e secreta um agente de peptídeo de acordo com a presente invenção.

[000101] A invenção também estabelece o uso de ácidos nucleicos

da presente invenção para a terapia genética, onde os referidos ácidos nucleicos são incorporados em um vírus para administração a um indivíduo.

Modos de Administração

[000102] As composições da presente invenção podem ser fornecidas diretamente ou em composições farmacêuticas contendo excipientes (ver acima), como é bastante conhecido na técnica. Os presentes métodos de tratamento envolvem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente da presente invenção a um indivíduo.

[000103] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" conforme usado aqui refere-se a uma quantidade de um agente de acordo com a presente invenção necessária para tratar, melhorar ou evitar a condição de doença alvo, ou de exibir um efeito terapêutico detectável ou preventivo. Em geral, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente tanto nos ensaios de cultura celular ou em modelos animais, por exemplo, em primatas não humanos, ratos, coelhos, cães ou porcos. O modelo animal também pode ser usado para determinar a faixa de concentração e a via de administração apropriadas. Tal informação então pode ser usada para determinar doses úteis e vias de administração em humanos.

[000104] A quantidade eficaz precisa para um indivíduo humano dependerá da gravidade do estado da doença, saúde geral do indivíduo, idade, peso, e gênero do indivíduo, dieta, tempo e frequência da administração, combinação(ões) dos fármacos, sensibilidades, e tolerância/resposta à terapia. Esta quantidade pode ser determinada por experimentação rotineira e dependerá do julgamento do clínico geral. Geralmente, uma quantidade eficaz isto é, dose, de um agente será de 0,005 mg/kg até 50 mg/kg, de preferência 0,125 mg/kg até 20 mg/kg.

[000105] Regimes de tratamento eficazes para agentes preferidos de acordo com a invenção incluem a administração de uma, duas ou três vezes diariamente, e/ou uma, duas, três, quatro, cinco ou seis vezes semanalmente). Esses regimes são, portanto, de preferência particularmente preferidos para uso em na presente invenção.

[000106] Uma via eficaz e conveniente de administração e uma formulação apropriada dos agentes da invenção em composições farmacêuticas (ver acima) também podem ser prontamente determinados por experimentação rotineira. Vários sistemas de fornecimento de formulações e fármacos estão disponíveis na técnica (ver, por exemplo, [0, 0]).

[000107] Vias apropriadas de administração podem, por exemplo, incluir administração vaginal, retal, intestinal, oral, nasal (intranasal), pulmonar ou outras administrações mucosais, tópicas, transdermais, oculares, aurais, e parenterais.

[000108] Vias primárias para a administração parenteral incluem administração intravenosa, intramuscular, e subcutânea. Vias secundárias de administração incluem administração intraperitoneal, intraarterial, intraarticular, intracardíaca, intracisternal, intradérmica, intralesional, intraocular, intrapleural, intratecal, intrauterina, e intraventricular. A indicação a ser tratada juntamente com as propriedades físicas, químicas, e biológicas do fármaco ditam o tipo de formulação e a via de administração a ser usada, bem como se será preferido fornecimento local ou sistêmico.

[000109] Para composições úteis para os presentes métodos de tratamento, uma dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente usando uma variedade de técnicas bastante conhecidas na técnica. Doses iniciais usadas em estudos animais podem ser baseadas em concentrações eficazes estabelecidas em ensaios de cultura celular. Faixas de dosagem apropriadas para indivíduos

humanos podem ser determinadas, por exemplo, usando dados obtidos de estudos animais e ensaios de cultura celular.

[000110] Uma dose terapeuticamente eficaz ou quantidade de um agente, agente, ou fármaco da presente invenção refere-se a uma quantidade ou dose do agente, agente ou fármaco que resulta em um aperfeiçoamento dos sintomas ou uma prolongação da sobrevivência em um indivíduo. A toxidez e eficácia terapêutica de tais moléculas podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou experimentais em animais, por exemplo, para determinação do LD50 (a dose letal para 50% da população) e a ED50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A proporção da dose de efeitos tóxicos para efeitos terapêuticos é o índice terapêutico que pode ser expresso como a proporção de LD50/ED50. Agentes que exibem altos índices terapêuticos são preferidos.

[000111] A quantidade eficaz ou quantidade terapeuticamente eficaz é a quantidade do agente ou composição farmacêutica que elicitará a resposta biológica ou médica de um tecido, sistema, animal ou humano que está sendo buscado pelo pesquisador, veterinário, médico ou outro clínico geral, por exemplo, para regulação do metabolismo de glicose, decréscimo nos níveis elevados ou aumentados de glicose do sangue, tratamento ou prevenção de um distúrbio associado com o metabolismo alterado de glicose, por exemplo, diabetes, etc..

[000112] Doses de preferência caem em uma faixa de concentrações de circulação que inclui o ED50 com pouca ou nenhuma toxidez. Dosagens podem variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e/ou da via de administração utilizada. A exata formulação, via de administração, dosagem, e intervalos de dosagem deveriam ser escolhidos de acordo com métodos conhecidos na técnica, tendo em vista as especificidades da condição de um

indivíduo.

[000113] A quantidade de dosagem e os intervalos podem ser ajustados individualmente para fornecer níveis de plasma da parcela ativa que são suficientes para se obter os efeitos desejados, isto é, mínima concentração eficaz (MEC). O MEC variará para cada agente mas pode ser estimado, por exemplo, a partir de dados in vitro e experimentos animais. Dosagens necessárias para se obter o MEC dependerão das características individuais e vias de administração. Em casos de administração local ou absorção seletiva, a concentração local eficaz do fármaco pode não estar relacionada à concentração de plasma.

[000114] A quantidade de agente ou composição administrada pode depender de uma variedade de fatores, incluindo o sexo, idade e peso do indivíduo sendo tratado, a gravidade da doença, a forma de administração, e o julgamento do clínico geral que a prescreve.

[000115] As presentes composições podem, se desejado, ser apresentadas em um pacote ou um dispositivo dosador com uma ou mais unidades de dosagem contendo o ingrediente ativo. Um tal pacote ou dispositivo pode, por exemplo, compreender o laminado metálico ou plástico, tal como um pacote em bolhas, ou vidro e tampões de borracha tais como em frascos. O pacote ou dispositivo dosador podem estar acompanhados de instruções para administração. Composições compreendendo um agente da invenção formulado em um carreador farmacêutico compatível também podem ser preparadas, colocadas em um recipiente apropriado, e rotuladas para tratamento de uma condição indicada.

[000116] A presente invenção fornece assim um agente de peptídeo, ácido nucléico ou célula hospedeira de acordo com a invenção para uso no tratamento ou prevenção de infecções de HIV, no tratamento e/ou prevenção da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), no

tratamento e/ou prevenção da transmissão de HIV, e/ou na prevenção da transmissão de HIV durante contexto sexual.

[000117] A presente invenção, portanto, fornece um agente de peptídeo, ácido nucléico e/ou célula hospedeira de acordo com a invenção para uso no tratamento e/ou prevenção da inflamação, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, infecções bacterianas e virais, doença inflamatória do intestino, artrite reumatóide, ateroma, ou arterioesclerose, asma, rinite alérgica ou dermatite atópica, a rejeição de órgãos, tecidos ou células transplantados, esclerose múltipla e/ou outras doenças desmielinizantes, neuropatia periférica, doenças periféricas, doenças malignas, cânceres ou cânceres em metástase.

[000118] A presente invenção fornece assim o uso de um agente de peptídeo, ácido nucléico ou célula hospedeira de acordo com a invenção para tratamento ou prevenção de infecções de HIV, para o tratamento e/ou prevenção da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), ou o seu surgimento, evitando a transmissão de HIV, por exemplo, durante o contato sexual.

[000119] A presente invenção fornece o uso de um agente de peptídeo, ácido nucléico ou célula hospedeira de acordo com a invenção para a fabricação de um fármaco para o tratamento e/ou prevenção da inflamação, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, ou infecções bacterianas e infecções virais, artrite reumatóide, ateroma ou arterioesclerose, asma, rinite alérgica ou dermatite atópica, a rejeição de órgãos, tecidos ou células transplantados, esclerose múltipla e/ou outras doenças desmielinizantes, neuropatia periféricas malignas, cânceres ou em metástase.

BREVE DESCRIÇÃO DO DESENHO

[000120] Figura 1Mostra detalhes da caracterização de um polipeptídeo típico derivado de citoquina, consistindo da SEQ ID NO: 21 fundida na terminação N da SEQ ID NO: 1. O polipeptídeo foi

preparado por síntese química total conforme descrito sob Materiais e Métodos. AU: Unidades de Absorção. O painel A mostra uma HPLC analítica de material cru após clivagem HF. O painel B mostra um HPLC analítico do material desejado purificado da preparação crua. O painel C mostra o traço de um HPLC analítico da mistura de reação após purificação e redobragem/formação de pontes de dissulfeto. O painel D mostra o traço obtido por HPLC analítico com material purificado, redobrado.

MODOS PARA A EXECUÇÃO DA INVENÇÃO

Materiais e Métodos

Preparação de Polipeptídeos por Síntese Química

[000121] A preparação de quimiocinas por síntese química total foi executada em um sintetizador ABI 430 modificado customizado para realizar a química Boc com neutralização *in situ* [22]. A estratégia de síntese também apresentou uma etapa de capeamento químico (para finalizar quaisquer cadeias com grupos amina livres ao fim da etapa de ligação) usando uma acetilglicina em cada ciclo. Após a clivagem de HF, produtos crus foram analisados por HPLC analítico e espectroscopia de massa MALDI. Depois da purificação em escala preparatória do produto desejado, a redobragem das proteínas e a formação das pontes de dissulfeto foram realizadas de acordo com os procedimentos publicados [0], e o material redobrado foi verificado por HPLC analítico (tempo de retenção mais curto) e espectrometria de massa por eletroborrifo (perda de unidades de massa devido à oxidação do grupo cisteína tiol durante a formação da ponte de dissulfeto). Os produtos finais foram submetidos à escala de purificação preparatória e depois liofilizados. Detalhes da caracterização do material intermediário e parcialmente purificado por HPLC para uma síntese típica de uma proteína da invenção, consistindo da SEQ ID NO 21 fundida à terminação N da SEQ ID NO:

1, são mostrados na figura 1. Os resultados da caracterização do material purificado da referida proteína por espectroscopia de massa são fornecidos na seguinte tabela:

Tabela 3: Caracterização de material purificado por espectrometria de massa

Proteína consistindo da SEQ ID NO: 21 fundida à terminação N da SEQ ID NO: 1	Massa calculada	Massa observada
Material antes da redobragem	7976,26	7976,76 $\pm$ 0,24
Material depois da redobragem	7922,26	7972,68 $\pm$ 0,36

[000122] A análise do produto final por HPLC analítico é mostrada na Figura 1.

Preparação de polipeptídeo por expressão em organismos hospedeiros

[000123] Os agentes de polipeptídeo foram preparados por expressão em organismos hospedeiros usando técnicas rotineiras que são conhecidas na técnica, seguindo os procedimentos descritos por exemplo, nas referências [0] e [0].

Ensaio de Fusão Celular

[000124] Este procedimento foi realizado conforme descrito em [0] usando as linhas celulares HeLa-P5L [0] e HeLa-Env-ADA [0]. Células HeLa-P5L foram cultivadas em locais com 96-cavidades (10^4 células por cavidade). Vinte e quatro horas mais tarde, o meio foi removido e substituído por um meio contendo 10^4 HeLa-Env-ADA células por cavidade mais agentes de peptídeo quimiocina da presente invenção. Após outras 24 h, as células foram lavadas uma vez em PBS, lisadas e testadas quanto á atividade β -galactosidase por adição do substrato

colorigênico CPRG (clorofenol red-β-D-galactopiranosídeo). Os resultados foram expressos de acordo com a seguinte fórmula:

[000125] $100 \times (\text{absorvência média tratada} - \text{absorvência média nenhuma célula envelope}) / (\text{absorvência humana sem quimiocina} - \text{absorvência média nenhuma célula envelope})$.

[000126] As medições foram realizadas em número triplicado para cada experimento independente, e os valores IC50 foram obtidos a partir das curvas de inibição de dose ajustadas usando o software Prism® (GraphPad). O valor IC50 representa a concentração de um agente de peptídeo na qual a função celular foi inibida 50%, em comparação com um controle que não tinha sido exposto a qualquer agente inibidor.

Ensaio de Replicação Viral

[000127] A replicação viral foi testada como nas referências [0] e [0], com a modificação de que células HeLas foram usadas como material de partida, e células repórter SX22-1 foram adicionadas somente após expressão de vírus.

Ensaio de Fluxo de Cálcio

[000128] Agentes foram testados quanto a estímulo de sinalização de cálcio tanto via CCR5, CCR1 ou CCR3 usando células (por exemplo células humanas embriônicas do rim (HEK)) transfectadas para originar uma expressão mais estável, seja de CCR5, CCR1 ou CCR3, respectivamente. O procedimento foi realizado essencialmente conforme descrito na referência [0], usando placas com 96 cavidades e um fluorímetro FLEXstation (Dispositivos Moleculares). Medições da fluorescência foram realizadas nas respectivas células carregadas com Fluo-4 (Amostras Moleculares) de acordo com as recomendações do fabricante e mantidas a 37°C. As medições foram realizadas sextuplicadamente (n= 6) em uma concentração de agente simples (300 nM; uma concentração que produz $E_{\max}$ para PSC- RANTES e RANTES nativo).

Ensaio de Modulação Negativa de Superfície CCR5

[000129] Células CHO-CCR5 [0] foram cultivadas a 80.000 células por ml em placas com 96 cavidades. No dia seguinte, o meio foi removido e substituído por um meio contendo quimiocinas em diferentes concentrações e as células foram incubadas por 1 h a 37°C. Ao final deste período, o meio foi removido e as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído. Após duas lavagens com PBS, as soluções de ambos o anticorpo anti-CCR5 conjugado com ficoeritrina (clone 3A9, Pharmingen) ou anticorpo anti CCR1 conjugado com ficoeritrina (para controle negativo) em PBS-1% de BSA foram adicionados às células. As placas foram deixadas em gelo por 1 h, depois lavadas três vezes com PBS-1% de BSA antes que valores fluorescentes fossem determinados usando um fluorímetro FLEXstation. Os resultados foram expressos como % de nível de controle da superfície de CCR5:

[000130] $100 \times (\text{fluorescência média quimiocina adicionada, anti-CCR5} - \text{fluorescência de controle médio negativo anti-CCR1}) / (\text{fluorescência de controle médio positivo [nenhuma quimiocina adicionada, anti-CCR5-fluorescência média anti-CCR1]})$.

[000131] Cada determinação foi realizada em seis vezes (n=6), e PSC-RANTES foi empregado como uma quimiocina de referência em cada experimento.

Ensaio de Discriminação de CCR1

[000132] A seletividade para CCR5 sobre CCR1 foi medida em um ensaio de ligação de competição CCR1 usando um ligante CCR1 natural rotulado radioativo como um traçador. Tanto MIP-1 α /CCL3 ou RANTES/CCL5 podem, por exemplo, ser empregados como um traçador para este ensaio de discriminação de CCR1. O ensaio foi realizado e descrito como na referência [0].

Ensaio de Discriminação de CCR3

[000133] A seletividade para CCR5 sobre CCR1 foi medida em um

ensaio de ligação competição CCR3 usando um ligante CCR3 natural rotulado radioativo como um traçador. Eotaxin/CCL11 ou RANTES/CCL5 podem, por exemplo, ser usados como um traçador para este ensaio de discriminação CCR3. O ensaio foi realizado e descrito como na referência [0].

Exemplos

Exemplo 1: Medição de potência anti-HIV pelo ensaio de fusão celular.

[000134] Agentes de peptídeos foram preparados por síntese química conforme descrito sob Materiais e Métodos. Os agentes foram avaliados individualmente usando o ensaio de Fusão Celular conforme descrito sob Materiais e Métodos, e os valores IC50 foram obtidos por comparação do resultado do ensaio na ausência dos agentes. Os valores IC50 obtidos são listados na Tabela 1.

[000135] Em geral, valores IC50 baixos, isto é, elevados valores de potência anti-HIV, foram verificados para agentes de peptídeos que se conformaram bem para a sequência de assinatura de consenso N-terminal Q G P [P/L] [L/G] [M/D] X X [Q/L] X ou QGP[P ou L][L ou G ou S ou M][M ou D ou S ou Q ou G]XX[Q ou G ou L ou A ou T ou S]X, onde X representa qualquer aminoácido e "/" representa "ou". Exemplos de tais compostos são aqueles derivados RANTES que consistem nas sequências N-terminais de assinatura SEQ ID NO: 2 –69 fundidos nas posições 10-68 da sequência nativa RANTES (SEQ. ID. NO: 1)

Tabela 4: Caracterização de agentes de peptídeos ou da invenção

Sequência de assinatura SEQ ID NO:	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de fusão celular	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de replicação viral	Sinalização de CCR5 (%) ⁽¹⁾	Sequestro de CCR5 (%) ⁽²⁾
2	0,02	0,194	1,4	5
3	0,02		<5	3
4	0,02	0,380	4,6	3
5	0,02	0,576	5,3	0
6	0,02	0,289	1,4	3

Seqüência de assinatura SEQ ID NO:	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de fusão celular	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de replicação viral	Sinalização de CCR5 (%) ⁽¹⁾	Seqüestro de CCR5 (%) ⁽²⁾
7	0,02	0,179	0,7	10
8	0,03	0,278	2,5	0
9	0,03	0,187	4,8	2
10	0,03	0,403	2,3	0
11	0,03		1,6	9
12	0,03	0,204	4,1	4
13	0,07		<5	9
14	0,13		1,4	8
15	0,65		2,4	2
16	0,02	0,091	96,3	70
17	0,02	129	87,7	70
18	0,08		90,1	69
19	0,28		85,1	66
20	0,66		95,6	71
21	0,54		14,2	54
22	0,02	0,470	2,4	12
23	0,03	0,625	5,3	35
24	0,03	0,174	2,4	35
25	0,03		0,0	13
26	0,58		9,4	41
27	0,03		14,6	40
28	0,03	0,213	45,0	59
29	0,39		22,6	36
30	0,01		4,1	4
31	0,02		3,6	6
32	0,03		6,0	5
33	0,03		0,2	0
34	0,03		5,1	8
35	0,05		4,9	5
36	0,05		5,1	7
37	0,09		0,7	5
38	0,10		0,3	3
39	0,10		1,7	5
40	0,11		0	6
41	0,12		0	9

Seqüência de assinatura SEQ ID NO:	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de fusão celular	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de replicação viral	Sinalização de CCR5 (%) ⁽¹⁾	Seqüestro de CCR5 (%) ⁽²⁾
42	0,16		0,2	0
43	0,29		0,3	4
44	0,02		68,5	60
45	0,02		77,4	62
46	0,40		97,6	72
47	0,44		96,9	78
48	0,64		100,5	78
49	0,74		97,2	77
50	0,02		7,6	11
51	0,02		5,0	12
52	0,02		8,3	11
53	0,02		5,1	16
54	0,06		2,1	12
55	0,07		7,3	33
56	0,15		7,5	15
57	0,16		4,9	18
58	0,23		0,7	25
59	0,23		6,0	15
60	0,02		11,8	8
61	0,02		12,7	7
62	0,03		29,6	45
63	0,03		42,7	50
64	0,04		17,2	28
65	0,04		11,5	30
66	0,07		33,4	42
67	0,12		10,3	15
68	0,17		10,6	24
69	0,22		20,1	38

(1) O sinal% é expresso como a% da resposta máxima (E_{max}) elicitada por PSC-RANTES, quando testada a uma concentração de 300 nM no ensaio sinalizando o fluxo de cálcio conforme descrito sob Materiais e Métodos.

(2) A% de seqüestro é expressa como a quantidade de seqüestro no

que se refere ao nível de controle das moléculas da superfície CCR5, quando testadas no ensaio de modulação negativa da superfície de CCR5/ receptor de seqüestro conforme descrito em Materiais e Métodos.

Exemplo 2: Medição de potência anti-HIV pelo ensaio de replicação viral

[000136] Agentes de peptídeos da invenção foram preparados por síntese química conforme descrito sob Materiais e Métodos. Os agentes foram individualmente avaliados usando o ensaio de replicação viral conforme descrito sob Materiais e Métodos, e valores de IC50 foram obtidos por comparação do resultado do ensaio na presença dos agentes com o resultado do ensaio obtido na ausência dos agentes. Os valores de IC50 obtidos são listados na tabela 4.

[000137] Em geral, valores de IC50 baixos, isto é, valores de alta potência anti-HIV, foram verificados para agentes de peptídeos que se conformam bem com a seqüência de assinatura de consenso N terminal da Q G P [P/L] [L/G] [M/D] X X [Q/L] X onde X representa qualquer aminoácido e "/" representa "ou". Exemplos de tais compostos são aqueles derivados RANTES que consistem nas seqüências de assinatura N-terminais SEQ ID NO: 2 – 29 fundidas nas posições 10-68 da seqüência nativa RANTES (SEQ. ID. NO: 1).

Exemplo 3: Medição de sinalização celular pelo ensaio de fluxo de cálcio

[000138] Agentes de peptídeos preparados por síntese química conforme descrito sob Materiais e Métodos foram avaliados usando o ensaio de fluxo de cálcio conforme descrito em Materiais e Métodos. Os valores de "sinalização" obtidos usando o referido ensaio para agentes de peptídeos individuais da presente invenção estão listados na Tabela 4.

[000139] Em geral, foram observados valores de sinalização baixos de, por exemplo, no máximo 6% ou 10% para agentes de peptídeos que se conformaram bem para a seqüência de assinatura de consenso N-terminal

Q G P P L M [S/G] [L/F/T] Q [S/V] onde "/" representa "ou". Exemplos de tais compostos são aqueles derivados de RANTES que consistem nas seqüências de assinatura N-terminais 0, 0, 0, ou 0 fundidas nas posições 10-68 da seqüência nativa RANTES (SEQ. ID. NO: 1). Entretanto, derivados de RANTES da presente invenção com outras seqüências de assinatura, tais como a 0 e 0 também mostraram baixos valores de sinalização de 20% ou menos, o agente de peptídeo carregando a seqüência de assinatura 0 conseguiu um valor de sinalização baixo de 30% ou menos, e o agente de peptídeo carregando a seqüência de assinatura 0 conseguiu um valor de sinalização abaixo de 46%. Valores de sinalização baixos, totais, foram observados para agentes de peptídeos que se conformaram à seqüência de assinatura de consenso N-terminal QGPP[G/L][M/Q]XX[Q/S][S/V], ou [000140] QGPP[G/L][M/Q][S/G/W/A/T][L/F/T/S/G/Y][Q/S][S/V], por exemplo, incluindo derivados RANTES contendo as seqüências de assinatura N-terminais 0, 0, 0, 0, 0, ou 0.

Exemplo 4: Ensaio de seqüestro de receptor pelo ensaio de modulação negativa da superfície CCR5.

[000141] Agentes de peptídeos preparados por síntese química sob Materiais e Métodos foram avaliados usando o Ensaio de modulação negativa de superfície CCR5 conforme descrito sob Materiais e Métodos. Os valores de "seqüestro de CCR5" obtidos usando o referido ensaio para agentes de peptídeos individuais da presente invenção são listados na tabela 5. Valores de seqüestro de CCR5 obtidos nos testes equivalentes dos documentos da técnica anterior estão listados na Tabela 1.

[000142] Em geral, altos valores de seqüestro de CCR5, de por exemplo pelo menos 60% ou 65% ou mais, foram observados para agentes de peptídeos que se conformaram bem com a assinatura de consenso N-terminal Q G P P G D [T/I] V L [W/A], onde "/" representa "ou". Exemplos

de tais compostos são aqueles derivados RANTES que consistem nas seqüências de assinatura N-terminais 0 ou 0 fundidas nas posições 10-68 da seqüência nativa RANTES (SEQ. ID. NO: 1). Entretanto, derivados RANTES da presente invenção com outras seqüências de assinatura, tais como 0, 0, 0, também foram caracterizadas por uma alta atividade de seqüestro de CCR5, de por exemplo 60% ou 65%, ou mais. Além disso, os agentes de peptídeos derivados RANTES com as seqüências de assinatura 0 e 0 também foram caracterizados por uma elevada atividade de seqüestro de CCR5, isto é, de pelo menos 50%, ou pelo menos 54, 55 ou 59%. No total, elevados valores de seqüestro de CCR5 foram observados para agentes de peptídeos que se conformaram com aquela seqüência de assinatura de consenso N-terminal QGP[P/L][L/G/S][D/S/G/Q]XX[L/A/T/Q][W/A/V], ou [000143] QGP[P/L][L/G/S][D/S/G/Q][T/I/S/W/Q][V/L/A/S/G][L/A/T/Q][W/A/V], por exemplo, incluindo derivados RANTES contendo as seqüências de assinatura N-terminal 0, 0, 0, 0, 0, 0.

Exemplo 5: Exemplo Comparativo

[000144] Derivados RANTES da técnica anterior listados na Tabela 5 foram avaliados usando ensaios conforme descritos para os agentes da invenção em exemplo 1 a exemplo 4. Os resultados obtidos nesses ensaios com os derivados RANTES da técnica anterior estão listados na Tabela 1.

Tabela 5: Caracterização dos derivados de citocina selecionados da técnica anterior

Nome do Agente	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de fusão celular	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de replicação viral	Sinalização de CCR5 (%) ⁽¹⁾	Seqüestro de CCR5 (%) ⁽²⁾
Met-RANTES ⁽³⁾	75,14		15,0	26
AOP-RANTES ⁽⁴⁾	1,12		80,7	71

Nome do Agente	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de fusão celular	Potência anti-HIV (IC50, nM) por ensaio de replicação viral	Sinalização de CCR5 (%) ⁽¹⁾	Seqüestro de CCR5 (%) ⁽²⁾
NNY-RANTES ⁽⁵⁾	0,29		84,5	77
PSC-RANTES ⁽⁶⁾	0,02	0,281	100,0	75
P1 ⁽⁷⁾	6,59		0,0	5
P2 ⁽⁷⁾	1,61		93,8	68

(1) A% de sinalização é expressa como% da resposta máxima (E_{max}) elicitada por PSC-RANTES, quando testada a uma concentração de 300 nM no ensaio de sinalização do fluxo de cálcio conforme descrito sob Materiais e Métodos.

(2) A% de seqüestro é expressa como a quantidade de seqüestro no que se refere ao nível de controle das moléculas de superfície CCR5, quando testado na superfície de modulação negativa CCR5 /receptor de seqüestro conforme descrito em Materiais e Métodos.

(3) composto reportado na ref. [0]

(4) composto reportado na ref. [0]

(5) composto reportado na ref. [0]

(6) composto reportado na ref. [0]

(7) composto reportado na ref. [0]

Exemplo 6: Teste in vitro da eficácia das novas moléculas contra clades de HIV de todo o mundo

[000145] As moléculas são testadas contra cepas de R5 representativas de todo o mundo.

[000146] Em resumo, isolados de HIV primários obtidos de diferentes áreas de campo em todo o mundo e disponíveis através dos repositórios de reagente são testadas quanto à sua sensibilidade de inibição em ensaios de replicação usando células primárias humanas.

[000147] O procedimento pode ser executado conforme descrito na referência [29], ou como se segue:

[000148] Culturas Celulares: PBMC são purificados a partir do sangue de diferentes doadores humanos HIV-negativos por centrifugação gradiente Ficoll-Paque. PBMC purificados são ressuspensos em meio RPMI (Mediatech, Inc., Herndon, Pa.) suplementados com soro bovino fetal 10% (FBS; Life Technologies, Inc., Rockville, Md.), 100 U de penicilina e 100 µg de estreptomicina (pen/strep; Mediatech, Inc.) por ml, 1 ng de recombinante humano interleuquina-2 (IL-2; Life Technologies, Inc.) por ml, e 1 U de fitohemaglutinina (PHA; Life Technologies, Inc.) por ml.

[000149] Vírus: As seguintes cepas de NSI R5 HIV-1 são obtidas a partir do programa "AIDS Research and Reagent Program": A-92RW009, A-92RW008, A-93UG075, B-92BR021, B-92TH026, B-BaL, C-92BR025, C-93IN101, D-94UG108, E/A-92TH022, E-92TH001, B/F-93BR019, F-93BR029, G-92NG083-JV1083, e G-92NG003-G3. Duas cepas SI X4 (HXB2 e F-93BR020) também são obtidas a partir do Programa de Reagente de AIDS (AIDS Reagent Program) para uso como controles. Para a maioria das cepas listadas acima, a letra antes do traço indica o subtipo do envelope viral e é seguido pelo ano de isolamento, país de origem, e número da cepa, por exemplo, A-92RW009 é uma cepa de clade A HIV-1 isolada em Rwanda em 1992. Todos esses vírus são propagados em culturas de PBMC até que as elevadas titrações dos vírus (conforme determinado pela atividade de transcriptase reversa [RT]) sejam obtidas em sobrenadantes de cultura. Os valores da dose ineficaz de cultura de 50% são então calculados para cada vírus usando a técnica de Reed-Muench [30].

[000150] Ensaio de Replicação: PBMC tratados por PHA/IL-2 são adicionados a placas com 96 cavidades (2×10^5 células/cavidade) contendo inibidores diluídos serialmente. O isolado de HIV-1 apropriado em meio de RPMI (multiplicidade de infecção [MOI] aproximadamente 0,1) é adicionado. Experimentos triplicados são

realizados com todos os isolados NSI R5 de HIV-1. No dia 3 pós infecção, cada placa é centrifugada por 5 min a $1,200 \times g$ em uma centrífuga tipo "swinging-bucket". Uma alíquota (150 μ l) de sobrenadante livre de células é então removida de cada cavidade e substituída com 150 μ l de meio RPMI completo contendo as concentrações apropriadas do inibidor. Nos dias 5, 10, e 15 pós-infecção, cada placa é centrifugada novamente por 5 min, e amostras sobrenadantes livres de células (25 μ l) são removidas e armazenadas a -70°C para análise subsequente. Culturas são descartadas no dia 15.

[000151] A produção de vírus na presença de inibidores é medida em sobrenadantes livres de células usando ensaios de RT conforme descrito previamente [31].

Exemplo 7: Demonstração da eficácia *in vivo* de inibidores de CCR5 em um modelo primata não humano de transmissão vaginal de HIV

[000152] O modelo do macaco de prevenção de HIV descrito abaixo é usado para demonstrar a eficácia *in vivo* das moléculas da invenção.

[000153] Em resumo, grupos de macacos rhesus adultos fêmeas tratadas com progesterona são pré-tratados com 4 mL de PBS ou de soluções de inibidores em PBS. Quinze minutos mais tarde, animais são contaminados com 300 TCID₅₀ de SHIV SF162 e monitorados por até 24 semanas para o desenvolvimento de viremia de plasma [32].

[000154] O procedimento pode ser executado conforme descrito na referência [33], ou como se segue:

[000155] São usados macacos rhesus fêmeas adultos, de ciclo normal (*Macacca mulatta*) variando de 5 até 12 anos de idade. Todos os estudos aderem ao guia para o cuidado e uso de animais de laboratório, preparados pelo Conselho de Pesquisa Nacional "Tulane National Primate Research Center Institutional Animal Care and Use Committee". Todo o pessoal chave (tratadores de animais, tratadores

e técnicos de laboratório que se engajaram na preparação de inóculos virais e em análises virológicas) são "cegados" quanto ao tratamento imputado.

[000156] Animais são tratados com uma única injeção intramuscular de 30 mg de acetato de depo-medroxiprogesterona (Depo-Provera®). Após 30-33 dias eles são sedados com telazol, colocados em decúbito ventral com os quadris elevados, e 4 ml de solução inibidora em PBS, ou PBS sozinho é introduzido sem trauma no vazio vaginal usando um cateter francês dobrável. Este volume fornece a cobertura mais eficaz das paredes do vazio vaginal sem vazamento indevido. Os animais são contaminados 15 min mais tarde com 300 TCID₅₀ de SHIV SF162 obtidos do programa "NIH AIDS Research and Reference Reagent Program" em 1 ml do meio RPMI 1640. Sangue é coletado em tubos de EDTA cada semana após a contaminação. Níveis de plasma viral são determinados por quantificação de SIV *gag* RNA usando um ensaio de RT-PCR em tempo real, conforme descrito previamente [0]. O ensaio tem o limiar de sensibilidade de 60 cópias de RNA/ml com um coeficiente de variação interensaio <25%. O estado livre de infecção é definido como uma viremia de plasma consistentemente indetectável para todas as análises. A conversão do soro é monitorada por Western Blot usando o kit Zeptometrix SIV (Zeptometrix, Buffalo N.Iorque).

REFERÊNCIAS

1. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapormeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. Nature. 22 Ag 1996;382(6593):722-5.

2. Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TN, Proudfoot AE. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science*. 11 Abr 1997;276(5310):276-9.
3. Mosier DE, Picchio GR, Gulizia RJ, Sabbe R, Poignard P, Picard L, Offord RE, Thompson DA, Wilken J. Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants. *J Virol*. Maio 1999;73(5):3544-50.
4. Sabbe R, Picchio GR, Pastore C, Chaloin O, Hartley O, Offord R, Mosier DE. Donor- and ligand-dependent differences in C-C chemokine receptor 5 reexpression. *J Virol*. Jan 2001;75(2):661-71.
5. Hartley O, Gaertner H, Wilken J, Thompson D, Fish R, Ramos A, Pastore C, Dufour B, Cerini F, Melotti A, Heveker N, Picard L, Alizon M, Mosier D, Kent S, Offord R. Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: development of highly potent HIV entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 Nov 2004;101(47):16460-5. Epub 15 Nov 2004.
6. Hartley O, Dougham K, Perez-Bercoff D, Cerini F, Heimann A, Gaertner H, Offord RE, Pancino G, Debre P, Gorochov G. Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors selected on living cells from a library of phage chemokines. *J Virol*. Jun 2003;77(12):6637-44.
7. WO 03/022884.
8. Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. CRC Press. 1997. ISBN 0849391423.
9. Benoiton NL. Chemistry of Peptide Synthesis. CRC Press. 2005. ISBN 1574444549.
10. Chan W, White P. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. Oxford University Press. 2000. ISBN: 0199637245.

11. Kullmann W. Enzymatic Peptide Synthesis. CRC Press. 1987. ISBN 0849368413.
12. Ibba M. Strategies for in vitro and in vivo translation with non-natural amino acids. Biotechnol Genet Eng Rev. 1996;13:197-216.
13. Proudfoot, A. E., Power, C. A., Hoogewerf, A. J., Montjovent, M. O., Borlat, F., Offord, R. E., and Wells, T. N. J Biol Chem. 1996; 271: 2599-2603.
14. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3a edição (15 Janeiro 2001). ISBN 087969576.
15. Rao S, Hu S, McHugh L, Lueders K, Henry K, Zhao Q, Fekete RA, Kar S, Adhya S, Hamer DH. Toward a live microbial microbicide for HIV: commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. Proc Natl Acad Sci E U A. 23 Ag 2005; 102(34):11993-8. Epub 22 Jul 2005.
16. Chang TL, Chang CH, Simpson DA, Xu Q, Martin PK, Lagenaur LA, Schoolnik GK, Ho DD, Hillier SL, Holodniy M, Lewicki JA, Lee PP. Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of Lactobacillus jensenii engineered to express functional two-domain CD4. Proc Natl Acad Sci E U A. 30 Set 2003;100(20):11672-7. Epub 12 Set 2003.
17. Lagenaur LA, Berger EA. An anti-HIV microbicide comes alive. Proc Natl Acad Sci U S A. 30 Ag 2005;102(35):12294-5. Epub 23 Agosto 2005.
18. FDA (US Food and Drug Administração) web page. Inactive Ingredient Guide. 1996. <http://www.fda.gov/cder/drug/iig/default.htm>
19. Ash M and Ash I. Handbook of Pharmaceutical Additives. Synapse Information Resources. 2ª edição. 2002. ISBN 1890595349
20. Gennaro AR (ed.). Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott Williams & Wilkins. 21ª edição. 3 de julho de 2005. ISBN 0781763789.

21. Hardman JG, Limbird LE, Alfred G. Gilman AG. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill; 10^a edição. 13 de agosto de 2001. ISBN 0071354697.
22. Schnolzer M, Alewood P, Jones A, Alewood D, Kent SB. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. Int J Pept Protein Res. Set-Out 1992; 40(3-4):180-93.
23. Wilken J, Hoover D, Thompson DA, Barlow PN, McSparron H, Picard L, Wlodawer A, Lubkowski J, Kent SB. Total chemical synthesis and high-resolution crystal structure of the potent anti-HIV protein AOP-RANTES. Chem Biol. Jan 1999; 6(1):43-51.
24. Klimkait T, Stauffer F, Lupo E, Sonderegger-Rubli C. Dissecting the mode of action of various HIV-inhibitor classes in a stable cellular system. Arch Virol. 1998; 143(11):2109-31.
25. Sune C, Brennan L, Stover DR, Klimkait T. Effect of polymorphisms on the replicative capacity of protease inhibitor-resistant HIV-1 variants under drug pressure. Clin Microbiol Infect. Feb 2004; 10(2):119-26.
26. Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alizon M. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. Science. 20 Jun 1997; 276(5320):1874-8.
27. Neote K., DiGregorio, D., Mak, J. Y., Horuk, R., and Schall, T. J. Cell. 1993; 72: 415-425
28. Daugherty, B. L., Siciliano, S. J., DeMartino, J. A., Malkowitz, L., Sirotina, A., and Springer, M. S. J Exp Med. 1996; 183: 2349-2354
29. Torre VS, Marozsan AJ, Albright JL, Collins KR, Hartley O, Offord RE, Quinones-Mateu ME, Arts EJ. 2000. Variable sensitivity of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates to inhibition by RANTES analogs. J Virol 74: 4868-76

30. Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, and R. Coico. 1999. Detection and analysis of HIV; isolation and quantitation of HIV in peripheral blood, alternate protocol: assessment of HIV titer using the Reed-Muench accumulative method, p. 12.2.5. In *Current protocols in immunology*, CD-ROM version. John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, N.Y.
31. Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, and R. Coico. 1999. Detection and analysis of HIV; detection assays for HIV proteins, basic protocol: assay for HIV reverse transcriptase activity, p. 12.5.8. In *Current protocols in immunology*, CD-ROM version. John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, N.Y.
32. Lifson JD, Rossio JL, Piatak M, Jr., Parks T, Li L, Kiser R, Coalter V, Fisher B, Flynn BM, Czajak S, Hirsch VM, Reimann KA, Schmitz JE, Ghayeb J, Bischofberger N, Nowak MA, Desrosiers RC, Wodarz D. 2001. Role of CD8(+) lymphocytes in control of simian immunodeficiency virus infection and resistance to rechallenge after transient early antiretroviral treatment. *J Virol* 75: 10187-99
33. Lederman MM, Veazey RS, Offord R, Mosier DE, Dufour J, Mefford M, Piatak M, Jr., Lifson JD, Salkowitz JR, Rodriguez B, Blauvelt A, Hartley O. 2004. Prevention of vaginal SHIV transmission in rhesus macaques through inhibition of CCR5. *Science* 306: 485-7

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende uma porção N-terminal e uma porção C-terminal, em que a referida porção N-terminal compreende a sequência de assinatura QGP[P ou L] e é selecionada dentre o grupo que consiste de SEQ ID NOs: 2-69, e a sequência de aminoácido da referida porção C-terminal é idêntica à SEQ ID NO: 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de assinatura é selecionada dentre o grupo que consiste de QGPPLMALQS, QGPPLMWMQV, QGPPLMWLQV, QGPPLMWTQS, QGPPLMWLQT, QGPPLMWTQV, QGPPLMWMQS, QGPPLMATQS, QGPPLMWLQS, QGPPLMALQV, QGPPLMWLGG, QGPPLMWRGS, QGPPLMWLQV, QGPPLMQTTP, QGPPLSWLQV, QGPPLSWLQS, QGPPGQWSQV, QGPPMMAGLS, QGPPLSWQQS, QGPPGMWSQS, QGPPLQWRQS, QGPPLMGTQS, QGPPLMQLQV, QGPPLSWSQV, QGPMSWSQS, QGPPLMNLQV, QGPMSAYQV e QGPPMQGGLS.

3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de assinatura é selecionada dentre o grupo que consiste de QGPPLMALQS, QGPPLMWMQV, QGPPLMWLQV, QGPPLMWTQS, QGPPLMWLQT, QGPPLMWTQV, QGPPLMWMQS, QGPPLMATQS, QGPPLMWLQS, QGPPLMALQV, QGPPLMWLGG, QGPPLMWRGS, QGPPLMWLQV e QGPPLMQTTP.

4. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de assinatura é selecionada dentre o grupo que consiste de QGPPGDTVWLW, QGPPGDIVLA, QGPPGSYDYS, QGPPGDGGSV, QGPLSGQSTP, QGPPGDWLQV, QGPPLMSLAV, QGPPLMSLTV, QGPLSGWAQV, QGPLSQSSQV, QGPLSSQSQV e QGPLGQQGQV.

5. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de assinatura é selecionada dentre o grupo que consiste de QGPPGDTVLR, QGPPGDIVLA, QGPPGSYDYS, QGPPGDGGSV, QGPLSGQSTP e QGPPGDWLQV.

6. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de assinatura é selecionada dentre o grupo que consiste de QGPPLMSFQS, QGPPLMSTQS, QGPPLMSLQV, QGPPLMGLQV, QGPLSGWLQV, QGPPLQWFQV, QGPPLQWTQV, QGPPLMALSV, QGPPLMWSQV, QGPPGQWGQV, QGPPGSWSQV, QGPPLMSSQS, QGPPLMGLSV, QGPPLMTLQV e QGPPGQWYQS.

7. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de assinatura é selecionada dentre o grupo que consiste de QGPPLMSFQS, QGPPLMSTQS, QGPPLMSLQV, QGPPLMGLQV e QGPLSGWLQV.

8. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de assinatura é selecionada dentre o grupo que consiste de QGPPLMSVLA, QGPPGSWSSV, QGPPLGSMGP, QGPPLQWMQA, QGPPLQWMQV, QGPPLMSTQV, QGPPLMSLSV, QGPPLMSLQS, QGPPLMSLQA, QGPPLMSVQS, QGPPLMSAQS, QGPPLMSGQS e QGPPLMSGQV.

9. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de assinatura é selecionada dentre o grupo que consiste de QGPPLMSVLA, QGPPGSWSSV e QGPPLGSMGP.

10. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a sequência de assinatura está localizada na extremidade N terminal.

11. Uso de um polipeptídeo como definido em qualquer

uma das reivindicações 1 a 10, um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para tratar ou prevenir infecções por HIV, síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), ou a transmissão de HIV.

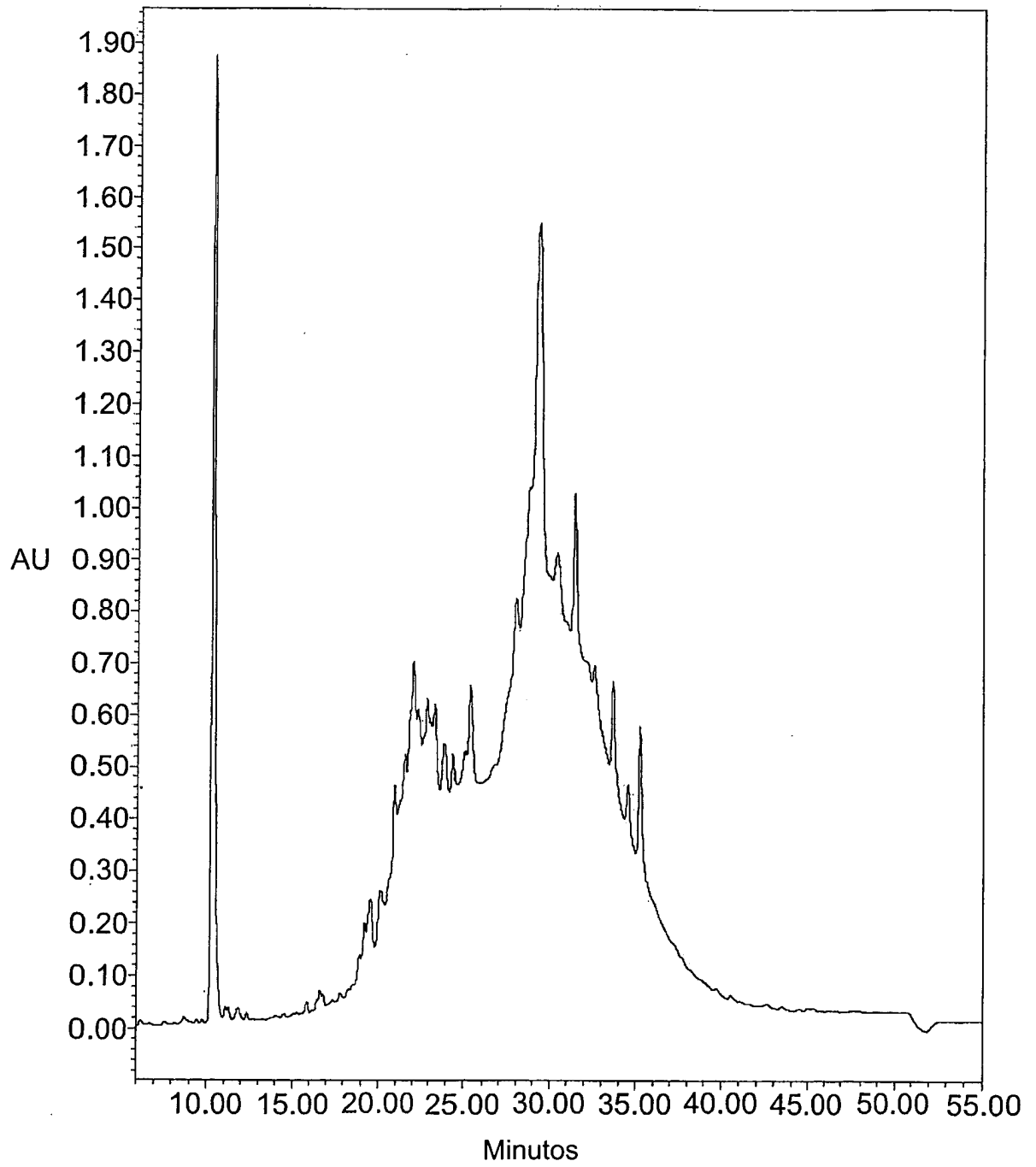
FIG. 1A

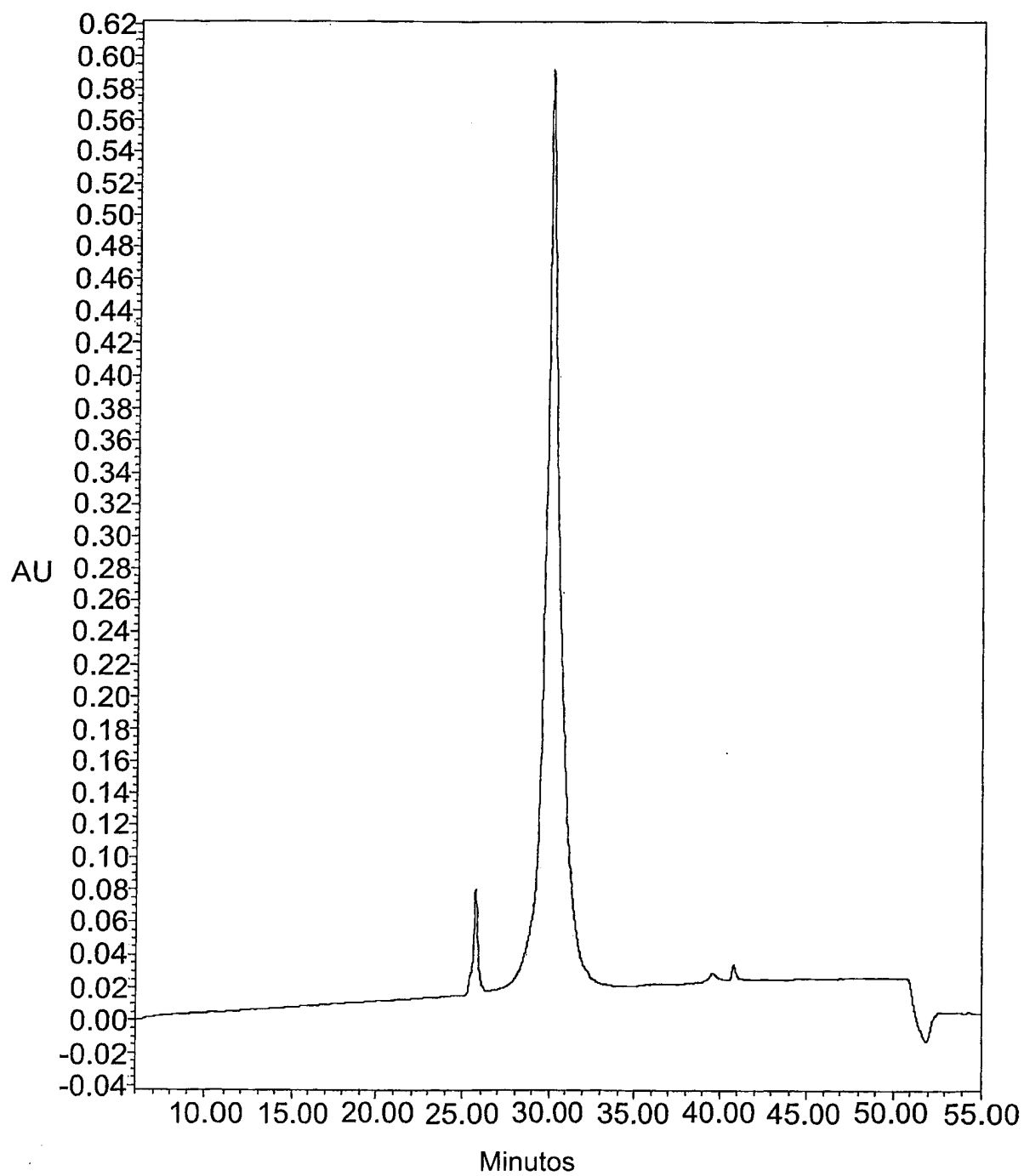
FIG. 1B

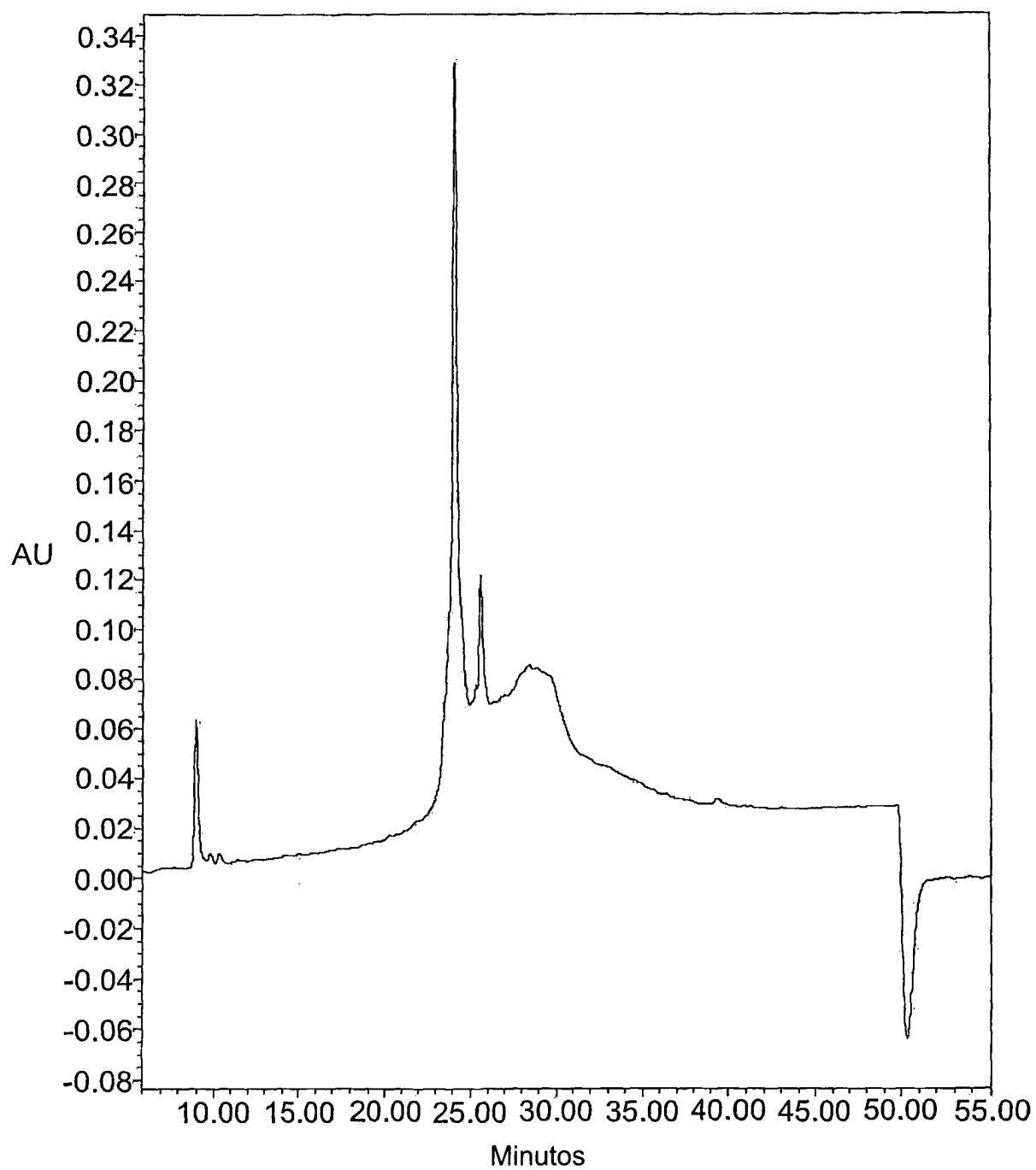
FIG. 1C

FIG. 1D