

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI 0715331-7 A2



★ B R P I 0 7 1 5 3 3 1 A 2 ★

(22) Data de Depósito: 25/07/2007

(43) Data da Publicação: 16/07/2013
(RPI 2219)

(51) Int.Cl.:

C07K 14/52

A61K 38/19

(54) Título: DERIVADOS DE CITOQUINA

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2006 GB 06147557

(73) Titular(es): The Mintaka Medical Research Foudation

(72) Inventor(es): Olivier Hartley

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

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

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

(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 "**DERIVADOS DE CITOQUINA**".

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção refere-se a derivados de citoquinas contendo atividades anti-HIV, anti-inflamatórias ou outras atividades.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 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.

15 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.

20 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.

25 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
30 comumente referidos (apesar de inapropriadamente) como "microbicidas".

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.

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].

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.

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.

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 natural-

mente 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.

5 DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO
 MOLÉCULAS DA INVENÇÃO

 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.

15 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.

 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.

30 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 seqüên-

cia de assinatura está localizada próximo à terminação N do polipeptídeo. De preferência, a sequência de assinatura está localizada tal que o início da sequência 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 sequência de assinatura" refere-se à terminação N da sequência de assinatura. A sequência 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 sequência de assinatura podem coincidir.

10 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 sequência de assinatura QGP[P ou L], e a sequência de aminoácido da referida porção C terminal é pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 1.

15 De preferência, a referida assinatura é 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, QGP[P ou L][L ou G][M ou D ou S].

Mais preferentemente, a referida sequência de assinatura é 20 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, 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.

Mais preferentemente, a referida sequência de assinatura é 25 QGP[P ou L] LM ou QGPPG[D ou S].

Mais preferentemente, a referida sequência de assinatura é QGPPLM ou QGPPGD.

Em um modo de execução, a referida sequência de assinatura é 30 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 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

QGP[P ou L]LM[A ou W][L ou T ou M][[Q ou G][S ou V ou T ou G].

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].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 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, QGPPLM-

25 WRGS, QGPPLMWLQV, QGPPLMQTTP, QGPPLSWLQV, QGPPLSWLQS, QGPPGQWSQV, QGPPMMAGLS, QGPPLSWQQS, QGPPGMWSQS, QGPPLQWRQS, QGPPLMGTQS, QGPPLMQLQV, QGPPLSWSQV, QGPPMSWSQS, QGPPLMNLQV, QGPPMSAYQV e QGPPMQGGLS.

30 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, QGP-

PLMSLTV, QGPLSGWAQV, QGPLSQSSQV, QGPLSSQSQV e QGPLGQQGQV.

De acordo com outros modos de execução preferidos, o polipeptídeo da presente invenção compreende uma sequência de assinatura selecionada do grupo QGPPLMSFQS, QGPPLMSTQS, QGPPLMSLQV, QGPPLMGLQV, QGPLSGWLQV, QGPPLQWFQV, QGPPLQWTQV, QGPPLMALSV, QGPPLMWSQV, QGPPGQWGQV, QGPPGSWSQV, QGPPLMSSQS, QGPPLMGLSV, QGPPLMTLQV e QGPPGQWYQS.

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

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.

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.

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

Em um outro modo de execução, a sequência de assinatura está localizada na terminação N extrema.

Modos de execução preferidos das sequências de assinatura dos derivados RANTES da presente invenção são indicados na Tabela 1:

SEQ ID NO	Sequência 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

5 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

10 SEQ ID NO: 12

QGPPLMWLGG

SEQ ID NO: 13

QGPPLMWRGS

SEQ ID NO: 14

QGPPLMWLQV

SEQ ID NO: 15

QGPPLMQTTP

SEQ ID NO: 16

QGP PGDTVLW

15 SEQ ID NO: 17

QGP PGDIVLA

SEQ ID NO: 18

QGP PGSYDYS

SEQ ID NO: 19

QGP PGDGGSV

SEQ ID NO: 20

QGPLSGQSTP

SEQ ID NO: 21

QGP PGDWLQV

20 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

25 SEQ ID NO: 27

QGPPLMSVLA

SEQ ID NO: 28

QGP PGSWSSV

SEQ ID NO: 29

QGPPLGSMGP

SEQ ID NO: 30

QGPPLSWLQV

SEQ ID NO: 31

QGPPLSWLQS

30 SEQ ID NO: 32

QGP PGQWSQV

SEQ ID NO: 33

QGP PMMAGLS

SEQ ID NO: 34

QGPPLSWQQS

continuação

SEQ ID NO

Seqüência de Assinatura

SEQ ID NO: 35

QGPPGMWSQS

SEQ ID NO: 36

QGPPLQWRQS

5 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

10 SEQ ID NO: 42

QGPMSAYQV

SEQ ID NO: 43

QGPQMGGLS

SEQ ID NO: 44

QGPPLMSLAV

SEQ ID NO: 45

QGPPLMSLTV

SEQ ID NO: 46

QGPLSGWAQV

15 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

20 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

25 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

30 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

5 SEQ ID NO: 67

QGPPLMSAQS

SEQ ID NO: 68

QGPPLMSGQS

SEQ ID NO: 69

QGPPLMSGQV

10 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.

15 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 contém, dentro de seu genoma, a abrangência de um ou mais segmentos

20 que codificam um ou mais agentes de peptídeos de acordo com a presente invenção.

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

30

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.

5 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
10 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 Mé-
15 todos.

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
20 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 po-
25 de estar contida dentro da variante ou homólogo SEQ ID NO: 1.

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

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 referi-
30 da 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.

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

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 substitu-

ídas no que se refere à SEQ ID NO: 1.

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 sequência 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).

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 ($E_{\max}$) 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%.

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 IC_{50} 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%,
5 mais preferentemente menor do que 26%, 22%, 20%, 18%, 16%, 14%, 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do E_{max} elicitado naquele receptor nativo RANTES/CCL5, conforme medido pelo ensaio do fluxo de cálcio.

Os agentes de peptídeos da invenção de preferência possuem alta atividade de seqüestro do receptor, isto é, a administração e/ou ligação
10 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,
15 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 que 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95%
20 do nível de controle da superfície de CCR5.

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
25 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
30 por uma combinação de níveis intermediários de potência anti-HIV (níveis IC_{50} , 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.

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

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).

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.

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.

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.

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.

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 co-

valentes na terminação C e/ou na terminação N.

Células Hospedeiras

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

5 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
10 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
15 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.

20 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
25 "agente" compreende, além disso, células hospedeiras conforme descrito aqui.

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
30 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

5 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

20 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.

25

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

30

Composições Farmacêuticas

A presente invenção fornece composições compreendendo um

agente de acordo com a presente invenção e um carreador farmacêuticamente aceitável. Os agentes da presente invenção, ou um sal farmacêuticamente 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 farmacêuticamente aceitável, um ácido nucleico, um seu sal farmacêuticamente aceitável, ou uma célula hospedeira de acordo com a presente invenção. A preparação de composições farmacêuticas é bastante conhecida daqueles versados na técnica.

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 tampoador 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.

De acordo com outros aspectos da invenção, o referido segundo agente também pode ser um fármaco anti-inflamatório ou um imunossupres-

sor. 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).

5 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.

10 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, 15 succinato, sulfato, sulfosalicilato, tanato, tartarato, tereftalato, tosilato e trietiodeto.

25 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.

30 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, aerossóis, 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.

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 farmacêuticamente aceitáveis estão disponíveis na técnica e incluem aqueles listados em várias farmacopéias. (Ver, por exemplo, [0, 0])

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 drá-

geas, preparação de comprimidos, suspensão, extrusão, secagem por borri-
fo, 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
5 que facilitam o processamento de moléculas ativas em preparados para uso
farmacêutico.

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 fisiolo-
10 gicamente 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 pene-
15 trantes 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 inclu-
em comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas de revestimento rígido e macio,
20 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 conven-
cionais tais como manteiga de cacau ou outros glicerídeos. Para supositórios
vaginais, muitas bases de supositório diferentes conhecidas pelos versados
25 na técnica podem ser usadas, por exemplo, gelatina glicerinada, gelatina
despolarizada, manteiga de cacau, polietileno glicol, polisorbato, ou outros.

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.

30 Formas de dosagem oral sólida podem ser obtidas usando exci-
pientes, que podem incluir diluentes inertes, preenchedores, desintegrantes,
aglutinantes (seco e úmido), retardantes de dissolução, lubrificantes, desli-

zantes, antiaderentes, resinas de troca catiônicas, agentes umectantes, anti-oxidantes, 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.

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.

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.

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 unguento, 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.

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.

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

5 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

10 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

15 bombas que requerem incisão.

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

20 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

25 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 bio-

30 compatíveis tais como polivinil pirrolidona podem ser adicionados, e outros açúcares e polióis podem substituir dextrose.

Outros Aspectos da Invenção

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

5 Usos Baseados na Função Biológica; Tratamento e Prevenção de Doenças

A presente invenção estabelece o uso dos agentes de peptídeos da presente invenção ou de bloqueio e/ou causadores do seqüestro de C-CR5. 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.

15 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 compreenden-

do 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, ateroma ou arterioesclerose, asma, rinite alérgica ou dermatite atópica, a
5 rejeição de órgãos transplantados, tecidos ou células, esclerose múltipla e/ou outras doenças desmielinizantes, neuropatia periférica, bem como cânceres, incluindo cânceres em metástase.

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 administra-
10 da a um indivíduo, sendo que a referida célula hospedeira expressa e secreta um agente de peptídeo de acordo com a presente invenção.

A invenção também estabelece o uso de ácidos nucleicos da presente invenção para a terapia genética, onde os referidos ácidos nucleícos são incorporados em um vírus para administração a um indivíduo.
15

Modos de Administração

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
20 tratamento envolvem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente da presente invenção a um indivíduo.

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
25 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
30 apropriadas. Tal informação então pode ser usada para determinar doses úteis e vias de administração em humanos.

A quantidade eficaz precisa para um indivíduo humano depende-

rá 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.

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.

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]).

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.

Vias primárias para a administração parenteral incluem administração intravenosa, intramuscular, e subcutânea. Vias secundárias de administração incluem administração intraperitoneal, intraarterial, intraarticular, intracardiaca, 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.

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.

5 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
10 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.
15 Agentes que exibem altos índices terapêuticos são preferidos.

 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
20 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..

 Doses de preferência caem em uma faixa de concentrações de
25 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
30 da condição de um indivíduo.

 A quantidade de dosagem e os intervalos podem ser ajustados individualmente para fornecer níveis de plasma da parcela ativa que são su-

ficientes 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.

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.

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.

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.

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.

5 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.

10 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, aterosclerose 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 maligna, cânceres ou em metástase.

BREVE DESCRIÇÃO DO DESENHO

20 Figura 1Mostra detalhes da caracterização de um polipeptídeo típico derivado de citocina, 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

25 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

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

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

25 Preparação de polipeptídeo por expressão em organismos hospedeiros

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

5 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
10 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:
15 $100 \times (\text{absorvência média tratada} - \text{absorvência média nenhuma célula envelope}) / (\text{absorvência humana sem quimiocina} - \text{absorvência média nenhuma célula envelope})$.

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
20 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

25 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

30 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 ex-

pressão 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).

10 Ensaio de Modulação Negativa de Superfície CCR5

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:

100 × (fluorescência média quimiocina adicionada, anti-CCR5 – fluorescência de controle médio negativo anti-CCR1)/(fluorescência de controle médio positivo [nenhuma quimiocina adicionada, anti-CCR5-fluorescência média anti-CCR1]).

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

30 Ensaio de Discriminação de CCR1

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].

5 Ensaio de Discriminação de CCR3

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.

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.

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 seqüências N-terminais de assinatura SEQ ID NO: 2 –69 fundidos nas posições 10-68 da seqüência nativa RANTES (SEQ. ID. NO: 1)

Tabela 4: Caracterização de agentes de peptídeos ou da invenção

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⁾
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
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

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⁾
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
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

Seqüência de assinatura SEQ ID NO:	Potência anti-HIV (IC ₅₀ , nM) por ensaio de fusão celular	Potência anti-HIV (IC ₅₀ , nM) por ensaio de replicação viral	Sinalização de CCR5 (%) ⁽¹⁾	Seqüestro de CCR5 (%) ⁽²⁾
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.

5 (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.

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

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.

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

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.

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 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.

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.

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 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

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 citoquina selecionados da téc-

nica anterior

Nome do Agente	Potência anti-HIV (IC ₅₀ , nM) por ensaio de fusão celular	Potência anti-HIV (IC ₅₀ , 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
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

5

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.

10

(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]

15

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

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

20

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.

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

Culturas Celulares: PBMC são purificados a partir do sangue de diferentes doadores humanos HIV-negativos por centrifugação gradiente Ficoll-Paque.

- 5 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 interleu-
10 quina-2 (IL-2; Life Technologies, Inc.) por ml, e 1 U de fitohemaglutinina (PHA; Life Technologies, Inc.) por ml.

- 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-
15 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
20 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
25 usando a técnica de Reed-Muench [30].

- 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
30 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 µl) de sobrenadante livre

de células é então removida de cada cavidade e substituída com 150 µl 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 µl) são removidas e armazenadas a -70°C para análise subsequente. Culturas são descartadas no dia 15.

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

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

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

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].

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

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.

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 Zeptomatrix SIV (Zeptomatrix, 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 U S A*. 30 Set 2003;100(20):11672-7. Epub 12 Set 2003.
- 5 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>
- 10 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.
- 15 21. Hardman JG, Limbird LE, Alfred G. Gilman AG. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill; 10ª 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 20 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. 25 *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*. Fev 2004; 10(2):119-26.
- 30 26. Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alizon M. Iden-

- tification 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
 - 5 28. Daugherty, B. L., Siciliano, S. J., DeMartino, J. A., Malkowitz, L., Sirotna, 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
 - 10 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 lorque, N.Y.
 - 15 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 lorque, N.Y.
 - 20 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
 - 25 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
 - 30

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> THE MINTAKA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION
 <120> Derivados de citoquina
 <130> P043725WO
 5 <150> GB0614755.7
 <151> 2006-06-25
 <160> 69
 <170> SeqWin99, versão 1.02
 <210> 1
 10 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys
 15 1 5 10 15
 Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe
 20 25 30
 Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp
 35 40 45
 20 Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser
 50 55
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 2
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ala Leu Gln Ser
 30 1 5 10
 <210> 3
 <211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

5 <400> 3

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Met Gln Val

1 5 10

<210> 4

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 4

15 Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Leu Gln Val

1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 5

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Thr Gln Ser

25 1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

30 <220>

<223> sintética

<400> 6

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Leu Gln Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 7

10 Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Thr Gln Val

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 8

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Met Gln Ser

20 1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

25 <220>

<223> sintética

<400> 9

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ala Thr Gln Ser

1 5 10

30 <210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 10

5 Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Leu Gln Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 11

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ala Leu Gln Val

15 1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

20 <220>

<223> sintética

<400> 12

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Leu Gly Gly

1 5 10

25 <210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

30 <223> sintética

<400> 13

Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Arg Gly Ser

	1	5	10
	<210> 14		
	<211> 10		
	<212> PRT		
5	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 14		
	Gln Gly Pro Leu Leu Met Trp Leu Gln Val		
10	1	5	10
	<210> 15		
	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> Sequência Artificial		
15	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 15		
	Gln Gly Pro Pro Leu Met Gln Thr Thr Pro		
	1	5	10
20	<210> 16		
	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
25	<223> sintética		
	<400> 16		
	Gln Gly Pro Pro Gly Asp Thr Val Leu Trp		
	1	5	10
	<210> 17		
30	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> Sequência Artificial		

<220>

<223> sintética

<400> 17

Gln Gly Pro Pro Gly Asp Ile Val Leu Ala

5

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

10

<220>

<223> sintética

<400> 18

Gln Gly Pro Pro Gly Ser Tyr Asp Tyr Ser

1 5 10

15

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

20

<223> sintética

<400> 19

Gln Gly Pro Pro Gly Asp Gly Gly Ser Val

1 5 10

<210> 20

25

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

30

<400> 20

Gln Gly Pro Leu Ser Gly Gln Ser Thr Pro

1 5 10

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <400> 21
 Gln Gly Pro Pro Gly Asp Trp Leu Gln Val
 1 5 10
 10 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 15 <223> sintética
 <400> 22
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Phe Gln Ser
 1 5 10
 <210> 23
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 25 <400> 23
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Thr Gln Ser
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>

<223> sintética

<400> 24

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Gln Val

1 5 10

5 <210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

10 <223> sintética

<400> 25

Gly Gly Pro Pro Leu Met Gly Leu Gln Val

1 5 10

<210> 26

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

20 <400> 26

Gln Gly Pro Leu Ser Gly Trp Leu Gln Val

1 5 10

<210> 27

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 27

30 Gly Gly Pro Pro Leu Met Ser Val Leu Ala

1 5 10

<210> 28

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
5 <223> sintética
 <400> 28
 Gln Gly Pro Pro Gly Ser Trp Ser Ser Val
 1 5 10
 <210> 29
10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
15 <400> 29
 Gln Gly Pro Pro Leu Gly Ser Met Gly Pro
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 10
20 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 30
25 Gln Gly Pro Pro Leu Ser Trp Leu Gln Val
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
30 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética

<400> 31
 Gln Gly Pro Pro Leu Ser Trp Leu Gln Ser
 1 5 10
 <210> 32
5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
10 <400> 32
 Gln Gly Pro Pro Gly Gln Trp Ser Gln Val
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 10
15 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 33
20 Gln Gly Pro Pro Met Met Ala Gly Leu Ser
 1 5 10
 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
25 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 34
 Gln Gly Pro Pro Leu Ser Trp Gln Gln Ser
30 1 5 10
 <210> 35
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
5 <400> 35
 Gln Gly Pro Pro Gly Met Trp Ser Gln Ser
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 10
10 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 36
15 Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Arg Gln Ser
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
20 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 37
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Gly Thr Gln Ser
25 1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
30 <220>
 <223> sintética
 <400> 38

Gln Gly Pro Pro Leu Met Gln Leu Gln Val

1 5 10

<210> 39

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 39

10 Gln Gly Pro Pro Leu Ser Trp Ser Gln Val

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 40

Gln Gly Pro Pro Met Ser Trp Ser Gln Ser

20 1 5 10

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

25 <220>

<223> sintética

<400> 41

Gln Gly Pro Pro Leu Met Asn Leu Gln Val

1 5 10

30 <210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 42

5 Gln Gly Pro Pro Met Ser Ala Tyr Gln Val

1 5 10

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Seqüência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 43

Gln Gly Pro Pro Met Gln Gly Gly Leu Ser

15 1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

20 <220>

<223> sintética

<400> 44

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Ala Val

1 5 10

25 <210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

30 <223> sintética

<400> 45

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Thr Val

	1	5	10
-	<210>	46	
	<211>	10	
-	<212>	PRT	
5	<213>	Seqüência Artificial	
	<220>		
	<223>	sintética	
	<400>	46	
	Gln Gly Pro Leu Ser Gly Trp Ala Gln Val		
10	1	5	10
	<210>	47	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
-	<213>	Seqüência Artificial	
15	<220>		
	<223>	sintética	
	<400>	47	
	Gln Gly Pro Leu Ser Gln Ser Ser Gln Val		
	1	5	10
20	<210>	48	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
	<213>	Seqüência Artificial	
	<220>		
25	<223>	sintética	
	<400>	48	
	Gln Gly Pro Leu Ser Ser Gln Ser Gln Val		
	1	5	10
	<210>	49	
30	<211>	10	
	<212>	PRT	
	<213>	Seqüência Artificial	

<220>

<223> sintética

<400> 49

Gln Gly Pro Leu Gly Gln Gln Gly Gln Val

5 1 5 10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

10 <220>

<223> sintética

<400> 50

Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Phe Gln Val

1 5 10

15 <210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

20 <223> sintética

<400> 51

Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Thr Gln Val

1 5 10

<210> 52

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

30 <400> 52

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ala Leu Ser Val

1 5 10

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
5 <220>
 <223> sintética
 <400> 53
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Trp Ser Gln Val
 1 5 10
10 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
15 <223> sintética
 <400> 54
 Gln Gly Pro Pro Gly Gln Trp Gly Gln Val
 1 5 10
 <210> 55
20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
25 <400> 55
 Gln Gly Pro Pro Gly Ser Trp Ser Gln Val
 1 5 10
 <210> 56
 <211> 10
30 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>

<223> sintética

<400> 56

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Ser Gln Ser

1 5 10

5 <210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

10 <223> sintética

<400> 57

Gln Gly Pro Pro Leu Met Gly Leu Ser Val

1 5 10

<210> 58

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

20 <400> 58

Gln Gly Pro Pro Leu Met Thr Leu Gln Val

1 5 10

<210> 59

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 59

30 Gln Gly Pro Pro Gly Gln Trp Tyr Gln Ser

1 5 10

<210> 60

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 5 <223> sintética
 <400> 60
 Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Met Gln Ala
 1 5 10
 <210> 61
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 15 <400> 61
 Gln Gly Pro Pro Leu Gln Trp Met Gln Val
 1 5 10
 <210> 62
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 62
 25 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Thr Gln Val
 1 5 10
 <210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética

<400> 63
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Ser Val
 1 5 10
 <210> 64
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 10 <400> 64
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Gln Ser
 1 5 10
 <210> 65
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 65
 20 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Gln Ala
 1 5 10
 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 66
 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Val Gln Ser
 30 1 5 10
 <210> 67
 <211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

5 <400> 67

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Ala Gln Ser

1 5 10

<210> 68

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 68

15 Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Gly Gln Ser

1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 69

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Gly Gln Val

25 1 5 10

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo que compreende uma parcela N-terminal e uma parcela C-terminal, onde a referida parcela N-terminal compreende a sequência de assinatura QGP[P ou L] e a sequência de aminoácido da referida
5 parcela C-terminal é pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 1.
2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGP[P ou L][L ou G ou S ou M][M ou D ou S ou Q ou G].
3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a se-
10 quência de assinatura é QGP[P ou L][L ou G][M ou D ou S].
4. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é 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 natural ou modificado.
- 15 5. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGP[P ou L][L ou G][M ou D ou S]XX[Q ou G ou L]X, onde X representa qualquer aminoácido natural ou modificado.
6. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGP[P ou L]LM ou QGPPG[D ou S].
- 20 7. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGPPLM ou QGPPGD.
8. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é 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 G].
- 25 9. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é 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 G].
10. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGP[P ou L]LM[A ou W][L ou T ou M][Q ou G][S ou
30 V ou T ou G].
11. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGPPLM[A ou W][L ou T ou M][Q ou G][S ou V ou T

ou G].

12. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é 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].

5 13. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGP[P ou L][L ou G ou D][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].

14. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGPPG[D ou S][T ou I]VL[W ou A].

10 15. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGPPGD[T ou I]VL[W ou A].

16. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGPP[G ou L][M ou Q]XX[Q ou S][S ou V].

15 17. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é 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].

18. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é QGPPLM[S ou G] [L ou F ou T]Q [S ou V].

20 19. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é selecionada do grupo

QGPPLMALQS, QGPPLMWMQV, QGPPLMWLQV, QGPPLMWTQS, QGP-
PLMWLQT, QGPPLMWTQV, QGPPLMWMQS, QGPPLMATQS, QGPPLM-
WLQS, QGPPLMALQV, QGPPLMWLGG, QGPPLMWRGS, QGPPLMWLQV,
QGPPLMQTTP, QGPPLSWLQV, QGPPLSWLQS, QGPPLSWLQS,
25 QGPPGQWSQV, QGPPLMAGLS, QGPPLSWQQS, QGPPLMWSQS,
QGPPLQWRQS, QGPPLMGTQS, QGPPLMQLQV, QGPPLSWSQV,
QGPPMSQS, QGPPLMNLQV, QGPPLMSAYQV e QGPPLMQGGLS.

20. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é selecionada do grupo

30 QGPPLMALQS, QGPPLMWMQV, QGPPLMWLQV, QGPPLMWTQS, QGP-
PLMWLQT, QGPPLMWTQV, QGPPLMWMQS, QGPPLMATQS, QGPPLM-
WLQS, QGPPLMALQV, QGPPLMWLGG, QGPPLMWRGS, QGPPLMWLQV

e QGPPLMQTTP.

21. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é selecionada do grupo

QGP PGDTVLW, QGP PGDIVLA, QGP PGSYDYS, QGP PGDGGSV, QG-
5 PLSGQSTP, QGP PGDWLQV, QGP PLMSLAV, QGP PLMSLTV, QGPLSG-
WAQV, QGPLSQSSQV, QGPLSSQSQV e QGPLGQQGQV.

22. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é selecionada do grupo QGP PGDTVLW, QGP PGDIVLA, QGP PGSYDYS, QGP PGDGGSV, QGPLSGQSTP, e QGP PGDWLQV.

10 23. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é selecionada do grupo QGP PLMSFQS, QGP PLMSTQS, QGP PLMSLQV, QGP PLMGLQV, QGPLSGWLQV, QGP PLQWFQV, QGP PLMALSV, QGP PLMSQV, QGP PGQWGQV, QGP PGSWSQV, QGP PLMSSQS, QGP PLMGLSV, QGP PLMTLQV, e
15 QGP PGQWYQS.

24. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é selecionada do grupo QGP PLMSFQS, QGP PLMSTQS, QGP PLMSLQV, QGP PLMGLQV e QGPLSGWLQV.

20 25. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é selecionada do grupo QGP PLMSVLA, QGP PGSWSSV, QGP PLGSMGP, QGP PLQWMQA, QGP PLQWMQV, QGP PLMSLSV, QGP PLMSLQS, QGP PLMSLQA, QGP PLMSLQA, QGP PLMSVQS, QGP PLMSAQs, QGP PLMSGQS e QGP PLMSGQV.

25 26. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, onde a sequência de assinatura é selecionada do grupo QGP PLMSVLA, QGP PGSWSSV e QGP PLGSMGP.

27. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde a porção N terminal consiste em não mais do que 15 aminoácidos.

30 28. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde a porção N terminal consiste em 10 aminoácidos.

29. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções anteriores, onde a porção C terminal da cadeia de polipeptídeo é idêntica à SEQ ID No. 1.

30. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde a sequência de assinatura está localizada no N-terminal extremo.

31. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, para uso como um fármaco.

32. Molécula de ácido nucleico, que compreende um ou mais segmentos/sequências que codificam os polipeptídeos como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 31.

33. Ácido nucleico como definido na reivindicação 32, que é RNA, DNA, um gene, um vetor, ou está incorporado a um vírus.

34. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 33, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, para uso como um fármaco.

35. Célula hospedeira, que compreende um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações de 32 até 34.

36. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 35, que é um micro-organismo.

37. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 36, onde o micro-organismo pertence à flora do intestino humano ou vagina.

38. Célula hospedeira de acordo com as reivindicações 36 ou 37, onde o micro-organismo pertence a um gene selecionado do grupo que consiste em bacterióides, clostridium, fusobacterium, eubacterium, ruminococcus, peptococcus, peptostreptococcus, bifidobacterium, streptococcus, escherichia e lactobacillus.

39. Célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 até 38, onde o micro-organismo é selecionado do grupo que consiste em lactobacillus acidophilus, lactobacillus crispatus, lactobacillus gasseri, lactobacillus iners, lactobacillus jensenii, lactobacillus casei, lactobacillus plantarum, lactobacillus rhamnosus, lactobacillus GC, bifidobacterium

bifidum, bifidobacterium breve, bifidobacterium infantis, bifidobacterium longum e streptococcus gordonii.

40. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 35, que é uma célula humana.

5 41. Célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 até 40, que expressa um polipeptídeo de acordo com as reivindicações 1 até 31.

42. Célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 até 41, a partir da qual é secretado um polipeptídeo como definido
10 em qualquer uma das reivindicações 1 até 31.

43. Composição farmacêutica, que compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 31, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

44. Composição farmacêutica, que compreende um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 32 até 34, ou um seu
15 sal farmaceuticamente aceitável.

45. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 44, que compreende a célula hospedeira de qualquer uma das reivindicações 35 até 42.

20 46. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 31, ou um ácido nucleico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 32 até 34 ou uma célula hospedeira conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 até 42, para uso no tratamento ou prevenção de infecções de HIV.

25 47. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 31, ou um ácido nucleico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 32 até 34, ou uma célula hospedeira conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 até 42, para uso no tratamento ou prevenção da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS).

30 48. Polipeptídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 31, ou um ácido nucleico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 32 até 34, ou uma célula hospedeira conforme definido

em qualquer uma das reivindicações 35 até 42, para uso no tratamento ou prevenção de transmissão de HIV.

49. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 31, ou um ácido nucleico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 32 até 34, ou uma célula hospedeira conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 até 42, para uso na prevenção de transmissão de HIV durante contato sexual.

50. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 31, ou um ácido nucleico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 32 até 34, ou uma célula hospedeira conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 até 42, para uso no tratamento ou prevenção de inflamação, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, infecções bacterianas e virais, doença inflamatória intestinal, 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 malignas, cânceres ou cânceres em metástase.

51. Processo de tratamento ou prevenção da infecção de HIV em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31 ou uma composição compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 32 até 34.

52. Processo de tratamento ou prevenção da manifestação da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição que compreende um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31, ou uma composição que compreende um ou mais ácidos nucleicos de acordo com qualquer uma das reivindicações de 32 até 34.

53. Processo de tratamento ou prevenção de doenças inflamatórias ou malignas em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31 ou uma composição compreendendo um áci-

do nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

54. Processo de tratamento ou prevenção de artrite reumatóide, aterosclerose ou arterioesclerose em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31, ou uma composição compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

55. Processo de tratamento ou prevenção de doença inflamatória do intestino em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31, ou uma composição compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

56. Processo de tratamento ou prevenção de neuropatia periférica em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31 ou uma composição compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

57. Processo de tratamento ou prevenção de câncer ou metástase em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31 ou uma composição compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

58. Processo de tratamento ou prevenção de asma, rinite alérgica ou dermatite atópica em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31 ou uma composição compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

59. Processo de tratamento ou prevenção de infecções bacterianas e virais em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31 ou uma composição compreendendo um áci-

do nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

60. Processo de tratamento ou prevenção de rejeição de órgãos, tecidos ou células transplantados em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31 ou uma composição compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

61. Processo de tratamento ou prevenção de doenças autoimunes em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31 ou uma composição compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

62. Processo de tratamento ou prevenção de esclerose múltipla e/ou outras doenças desmielinizantes em um indivíduo, que compreende a administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 até 31, ou uma composição compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34.

63. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 até 62, compreendendo a etapa de administração, em um indivíduo, de uma célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações de 35 até 42.

64. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 até 63, onde a profilaxia é obtida por aplicação de um supositório, creme, espuma, gel ou pasta.

65. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 até 64, onde mais do que uma composição é administrada.

66. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 até 65, onde o tratamento é terapia genética.

67. Kit compreendendo um polipeptídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 até 31, um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 até 34, ou uma célula hospedeira

conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 até 42.

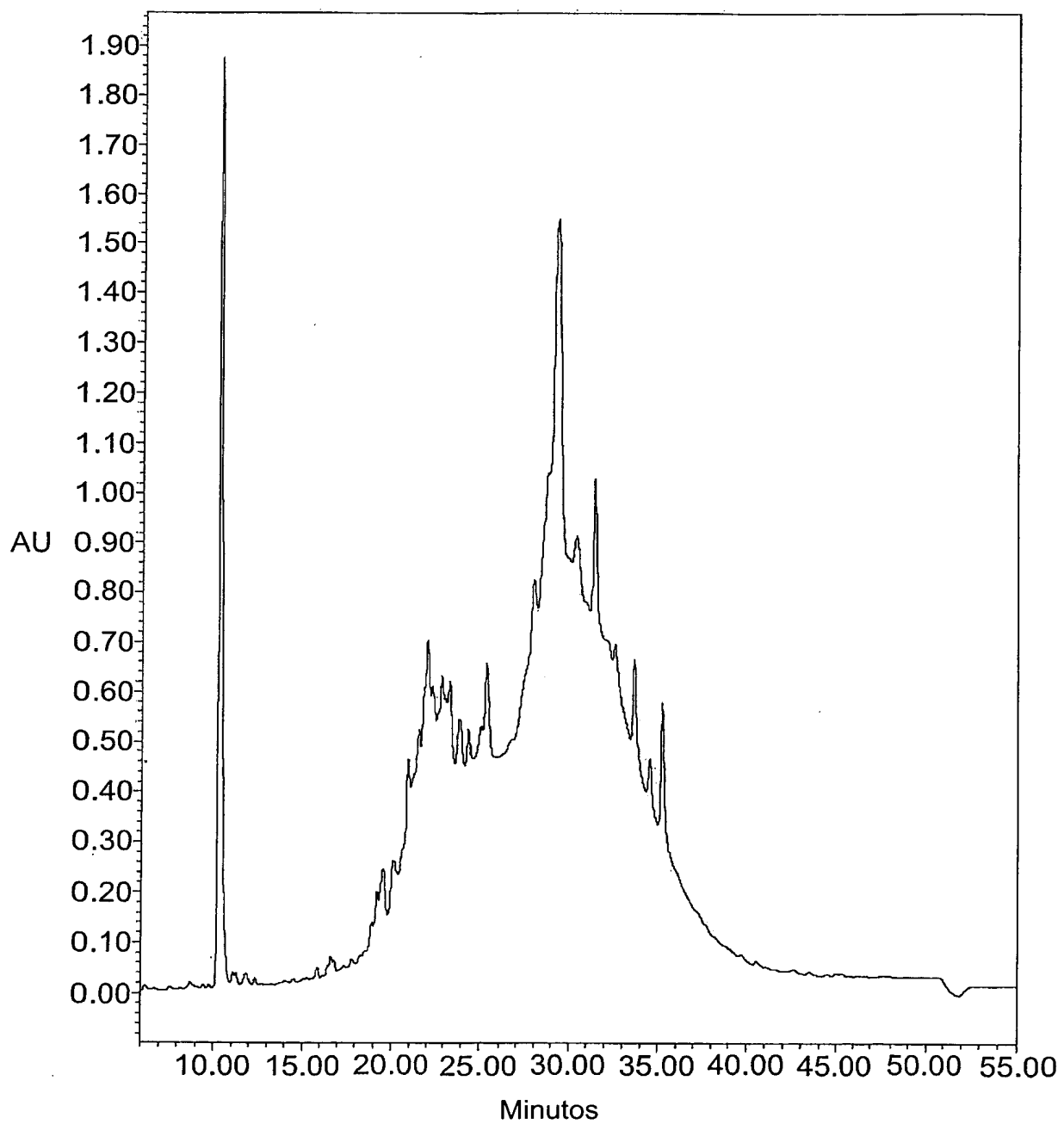
FIG. 1A

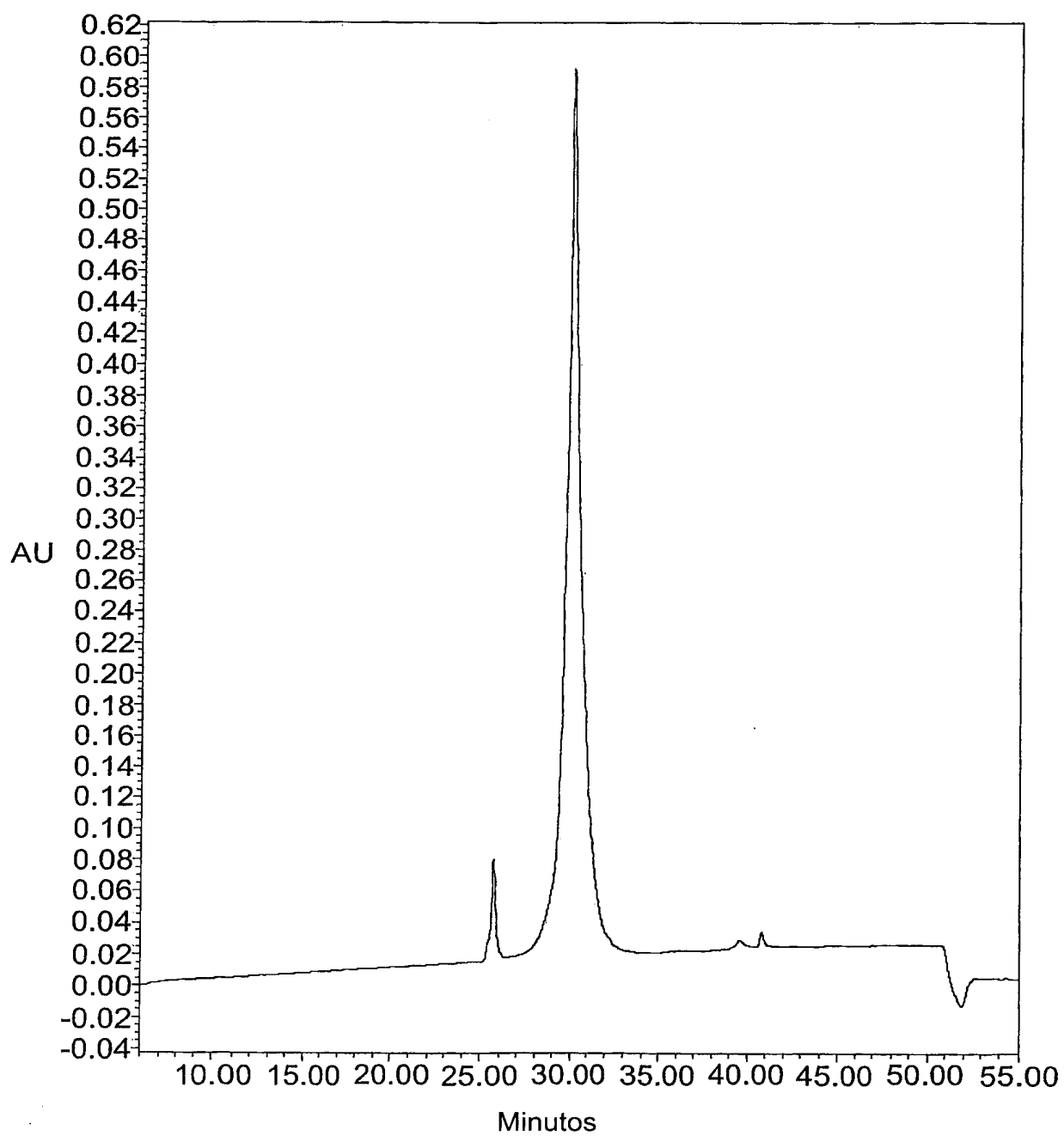
FIG. 1B

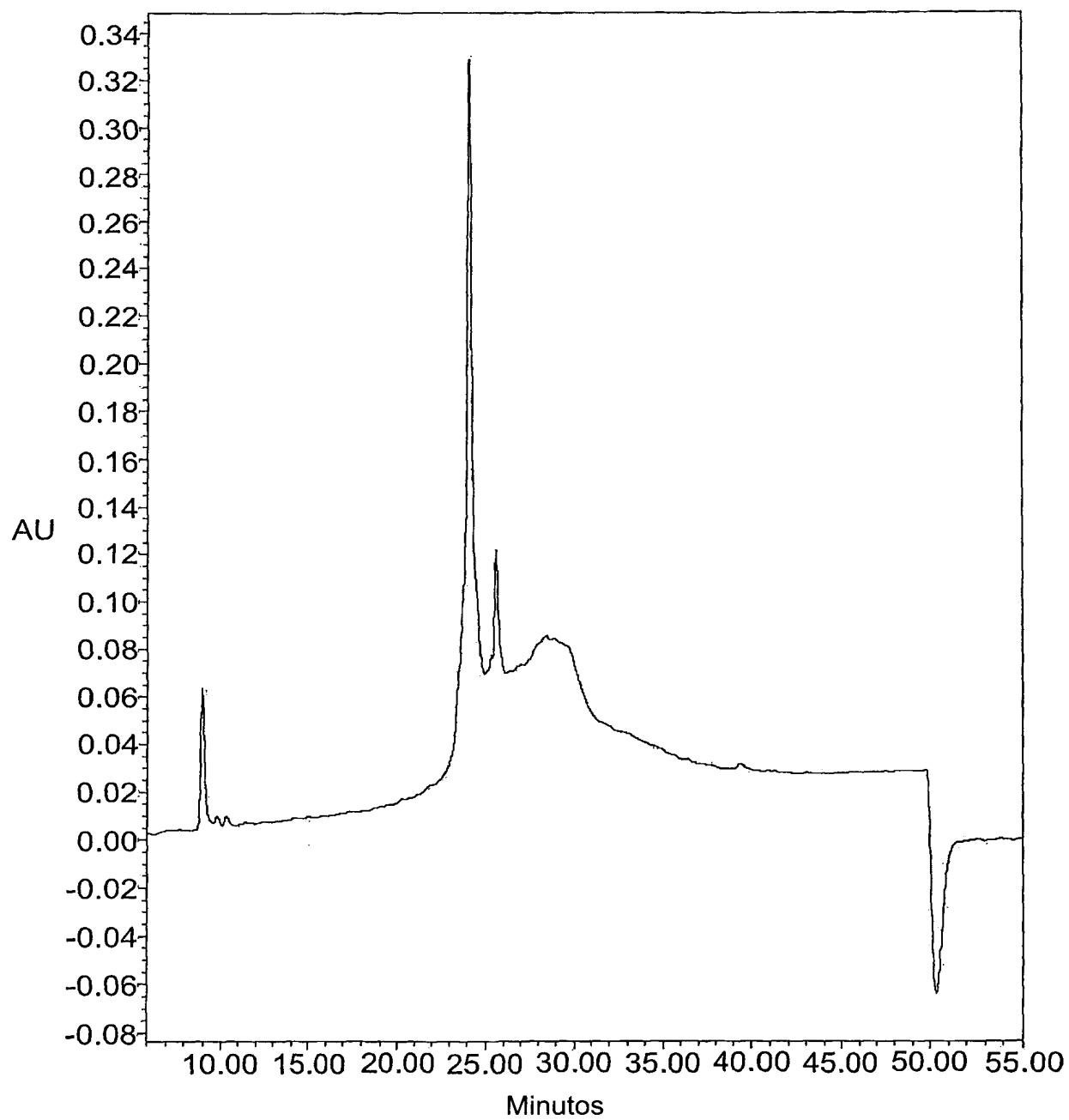
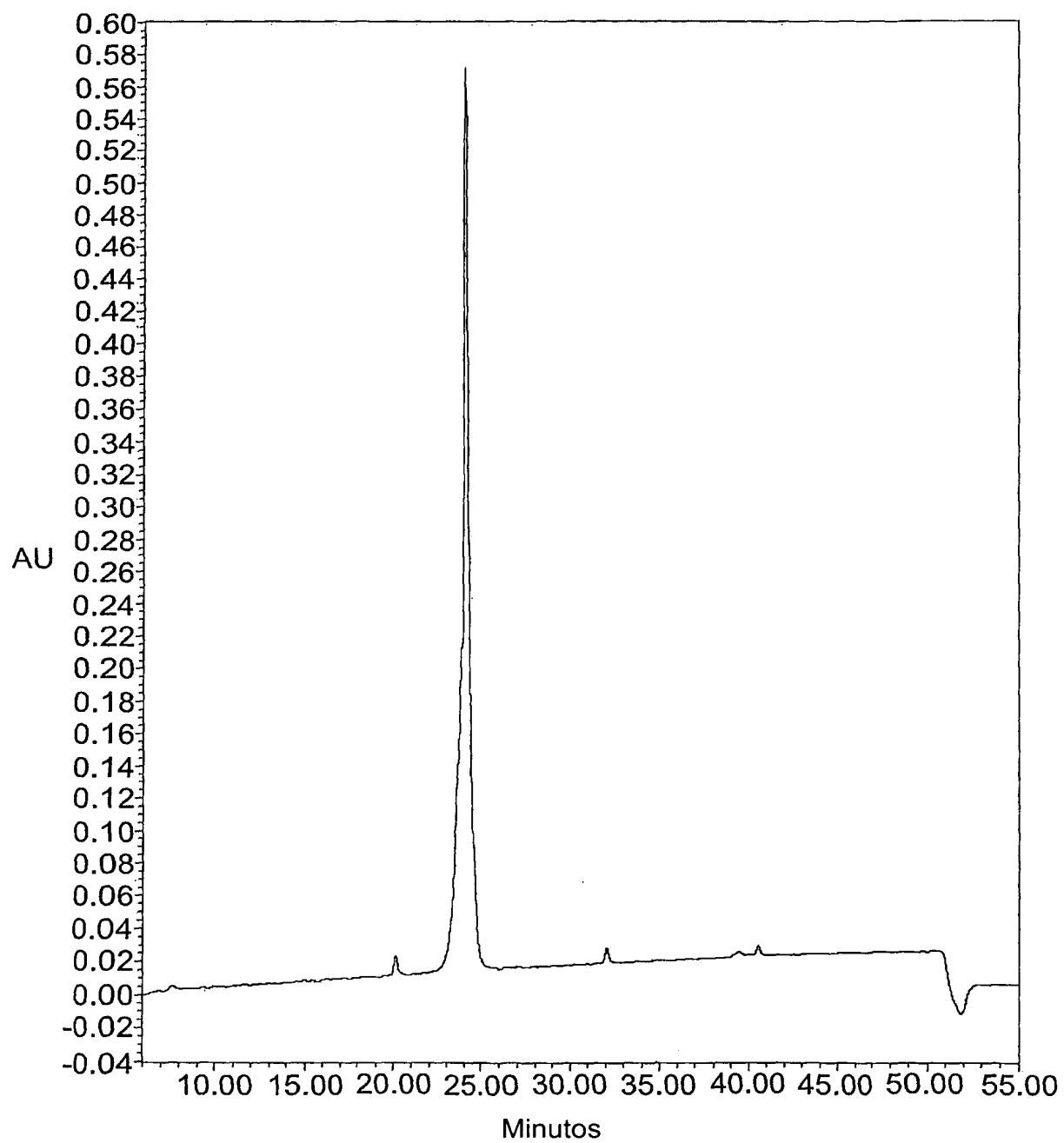
FIG. 1C

FIG. 1D

RESUMO

Patente de Invenção: **"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 ID NO: 1, e seus empregos.