

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2007.07.25</b>	(73) Titular(es): <b>MINTAKA FOUNDATION FOR MEDICAL RESEARCH CHEMIN DES AULX 14 1228 PLAN-LES-OUATES CH</b>
(30) Prioridade(s): <b>2006.07.25 GB 0614755</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2009.07.08</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2010.12.01 043/2011</b>	(72) Inventor(es): <b>OLIVER HARTLEY</b> CH
	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA</b> PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE CITOCINA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A POLIPÉPTIDOS QUE COMPREENDEM UMA PORÇÃO N-TERMINAL E UMA PORÇÃO C-TERMINAL, EM QUE A DITA PORÇÃO N-TERMINAL COMPREENDE A SEQUÊNCIA ASSINATURA QGP[P OU L] E A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA DITA PORÇÃO CTERMINAL É PELO MENOS 70% IDÊNTICA A SEQ ID NO: 1, E UTILIZAÇÕES DOS MESMOS.

**RESUMO****"DERIVADOS DE CITOCINA"**

A invenção refere-se a polipéptidos que compreendem uma porção N-terminal e uma porção C-terminal, em que a dita porção N-terminal compreende a sequência assinatura QGP[P ou L] e a sequência de aminoácidos da dita porção C-terminal é pelo menos 70% idêntica a SEQ ID NO: 1, e utilizações dos mesmos.

## **DESCRIÇÃO**

### **"DERIVADOS DE CITOCINA"**

#### **CAMPO TÉCNICO**

Esta invenção refere-se a derivados de citocina que têm actividades anti-VIH, anti-inflamatórias ou outras.

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Nenhum fármaco é conhecido por ser capaz de curar infecções por Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e a Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Até o momento, nenhuma vacina capaz de prevenir a infecção por VIH aparece ao alcance.

As infecções por VIH existentes podem hoje, em muitos casos, ser controladas por terapêutica anti-retroviral altamente activa (HAART) que envolve uma combinação de três ou mais fármacos anti-retrovirais. Contudo, a ocorrência de estirpes de VIH resistentes a fármacos de classe única dupla, ou tripla está crescendo constantemente sob a pressão selectiva dos inibidores da transcriptase reversa e protease (ITR e IP) actualmente empregada em HAART.

Portanto, há uma necessidade urgente por novos tipos de fármacos anti-VIH. Preferentemente, tais novos fármacos teriam como objectivo aspectos do vírus que são menos vulneráveis ao desenvolvimento de resistência que processos de transcrição reversa e maturação viral que são os objectivos dos ITR e IP mencionados acima. Na ausência de uma vacina contra o VIH, existe além disso uma necessidade por agentes que são capazes de prevenir a transmissão de VIH durante o contacto sexual.

Esta necessidade poderia potencialmente ser preenchida pelos agentes que inibem a entrada de VIH em células alvo, isto é, agentes da classe de "inibidores de entrada" (IE). Tais agentes poderiam, por exemplo, ser localmente e topicamente aplicados aos genitais humanos a fim de

prevenir a infecção de células pelo VIH durante o contacto sexual. Os agentes que podem prevenir a transmissão de VIH durante o contacto sexual são frequentemente (embora inapropriadamente) denominados como "microbicidas".

A entrada de VIH em células alvo humanas depende da união do VIH virião à proteína de superfície celular humana CD4 e um assim chamado co-receptor. Os co-receptores principais utilizados pelo VIH incluem os sete receptores transmembrana acoplados à proteína G CXCR4 e CCR5. Encontrou-se que os ligandos de quimiocina naturais de CCR5, em particular RANTES (CCR5), inibem a entrada de estirpes de VIH tróficos ao R5 (estirpes de VIH que utilizam o CCR5 como um co-receptor) em células humanas [1]. A RANTES é uma citocina pró-inflamatória que é conhecida por promover a acumulação e activação de células em doenças inflamatórias crónicas.

Certos derivados de RANTES com modificações no terminal N mostrou actividade anti-VIH aumentada, por exemplo, AOP-RANTES, a oxima de amino oxipentano de [glio xilil]<sup>1</sup>RANTES(2-68) [2] em que "(2-68)" denota resíduos 2 a 68 do péptido RANTES de ocorrência natural. Ademais, derivados de RANTES quimicamente modificados com actividade anti-VIH incluem NNY-RANTES (n-nonanoil-RANTES(2-68) [3, 4]) e PSC-RANTES [5].

Contudo, os derivados de RANTES quimicamente modificados mencionados acima não somente inibem a entrada de VIH em células, mas são também agonistas relativamente fortes de CCR5: AOP-, NNY- e PSC-RANTES provocam uma cascata de sinalização pró-inflamatória que envolve influxo de cálcio citosólico. A utilização de agentes com tal actividade de sinalização como fármacos anti-VIH poderia levar a efeitos secundários não desejados que envolvem, por exemplo, a inflamação. A indução da inflamação é um efeito secundário altamente indesejável para agentes anti-VIH profilácticos, uma vez que foi reconhecido que o risco de

infecção pelo VIH pode de facto ser aumentado no tecido inflamado.

Os agentes tais como derivados de RANTES podem também induzir a sinalização em células alvo devido à falta de selectividade ou especificidade do agente para CCR5, isto é, em que o agente se une também as proteínas de receptor CCR1 e CCR3.

Uma desvantagem dos polipéptidos quimicamente modificados é o facto de não poderem ser produzidos por meios biotecnológicos à vista (expressão e fermentação). Os derivados de RANTES anti-VIH completamente codificados, isto é, derivados que consistem somente em aminoácidos naturalmente codificados foram também reportados [6, 7]. Contudo, a potência anti-VIH de todos os inicialmente reportados derivados de RANTES completamente codificados foi menor que aquela do variante quimicamente modificado PSC-RANTES [5].

#### **REVELAÇÃO DA INVENÇÃO**

##### **Moléculas da invenção**

Os agentes peptídicos completamente codificados com alta potência anti-VIH foram agora identificados. Estes agentes peptídicos podem facilmente ser produzidos por meio de métodos biotecnológicos padrão, evitando a despesa e o esforço requeridos para síntese ou modificação química. De maneira inesperada, encontrou-se que, em concretizações preferidas, os agentes peptídicos da presente invenção combinam alta potência anti-VIH com uma capacidade para provocar somente um baixo grau de sinalização pró-inflamatória, evitando assim efeitos secundários inflamatórios.

Em concretizações adicionais, os agentes da invenção levar à internalização de CCR5 na célula (regulação negativa ou modulação negativa da sequestração de receptor). Este mecanismo de acção surpreendente é vantajoso, como (i) protecção de duração comparativamente

larga pode ser alcançada por uma dose única do fármaco, e (ii) estirpes de VIH tróficas ao R5 resistentes são menos prováveis de evoluir se nem o CCR5 nem sua forma unida ao fármaco são acessíveis na superfície da célula alvo para interacção com o vírus.

Os agentes peptídicos particularmente preferidos combinam alta potência anti-VIH com tanto alta actividade de sequestração de receptor como baixa actividade de sinalização. Os agentes peptídicos preferidos adicionais da invenção combinam pelo menos uma propriedade desejável seleccionada do grupo que consiste em alta potência anti-VIH, alta actividade de sequestração de receptor e baixa actividade de sinalização com alta selectividade de receptor, isto é, união preferida a CCR5 mais que a CCR1 e/ou CCR3.

Os agentes peptídicos da invenção compreendem uma sequência assinatura que compreende QGP[P ou L], isto é, a quarta posição da sequência assinatura pode ser ou P ou L. Preferentemente, esta sequência assinatura está localizada próxima ao terminal N do polipéptido. Preferentemente, a sequência assinatura está localizada tal que o começo da sequência assinatura situa-se dentro de 15 resíduos do terminal N do polipéptido, mais preferentemente dentro dos resíduos 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1 do terminal N. No presente documento, a expressão "o começo da sequência assinatura" refere-se ao terminal N da sequência assinatura. A sequência assinatura pode também estar localizada na extremidade terminal N do polipéptido, isto é, os terminais N do polipéptido como um todo e a sequência assinatura pode coincidir.

Assim, a invenção refere-se a um polipéptido que compreende uma porção N-terminal e uma porção C-terminal, em que a dita porção N-terminal compreende a sequência assinatura QGP[P ou L] e a sequência de aminoácidos da dita porção C-terminal é pelo menos 70% idêntica a SEQ ID NO: 1.

Preferentemente, a dita sequência assinatura é

QGP[P ou L][L ou G ou S ou M][M ou D ou S ou Q ou G], ou numa concretização preferida adicional,  
QGP[P ou L][L ou G][M ou D ou S].

Mais preferentemente, a dita sequência 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, ou numa concretização preferida adicional,

QGP[P ou L][L ou G][M ou D ou S]XX[Q ou L]X, em que X denota qualquer aminoácido natural ou modificado.

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

Mais preferentemente, a dita sequência assinatura é QGPPLM ou QGPPGD.

Numa concretização, a dita sequência 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 T ou G], ou em concretizações preferidas adicionais,

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]].

Preferentemente, a dita sequência assinatura é QGPPLM[A ou W][L ou T ou M][[Q ou G][S ou V ou T ou G]].

Numa concretização adicional, a dita sequência 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 concretizações preferidas adicionais,

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

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

Preferentemente, a dita sequência assinatura é QGPPGD[T ou I]VL[W ou A].

Numa concretização adicional, a dita sequência assinatura é

QGPP[G ou L][M ou Q]XX[Q ou S][S ou V], ou em concretizações preferidas adicionais,

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].

De acordo com concretizações preferidas, o polipéptido da presente invenção compreende uma sequência assinatura seleccionada do grupo QGPPLMALQS, QGPPLMWMQV, QGPPLMWLQV, QGPPLMWTQS, QGPPLMWLQT, QGPPLMWTQV, QGPPLMWMQS, QGPPLMATQS, QGPPLMWLQS, QGPPLMALQV, QGPPLMWLGG, QGPPLMWRGS, QGPPLMWLQV, QGPPLMQTTP, QGPPLSWLQV, QGPPLSWLQS, QGPPGQWSQV, QGPPLMAGLS, QGPPLSWQQS, QGPPLMWSQS, QGPPLQWRQS, QGPPLMGTQS, QGPPLMQLQV, QGPPLSWSQV, QGPPLMWSQS, QGPPLMNLQV, QGPPLMAYQV e QGPPLMQGLS.

De acordo com concretizações preferidas adicionais, o polipéptido da presente invenção compreende uma sequência

assinatura seleccionada do grupo QGPPGDTVWL, QGPPGDIVLA, QGPPGSYDYS, QGPPGDGGSV, QGPLSGQSTP, QGPPGDWLQV, QGPPLMSLAV, QGPPLMSLTV, QGPLSGWAQV, QGPLSQSSQV, QGPLSSQSQV e QGPLGQQGQV.

De acordo com concretizações preferidas adicionais, o polipéptido da presente invenção compreende uma sequência assinatura seleccionada do grupo QGPPLMSFQS, QGPPLMSTQS, QGPPLMSLQV, QGPPLMGLQV, QGPLSGWLQV, QGPPLQWFQV, QGPPLQWTQV, QGPPLMALSV, QGPPLMWSQV, QGPPGQWGQV, QGPPGSWSQV, QGPPLMSSQS, QGPPLMGLSV, QGPPLMTLQV e QGPPGQWYQS.

De acordo com concretizações preferidas adicionais, o polipéptido da presente invenção compreende uma sequência assinatura seleccionada do grupo QGPPLMSVLA, QGPPGSWSSV, QGPPLGSMGP, QGPPLQWMA, QGPPLQWMQV, QGPPLMSTQV, QGPPLMSLSV, QGPPLMSLQS, QGPPLMSLQA, QGPPLMSVQS, QGPPLMSAQS, QGPPLMSGQS e QGPPLMSGQV.

Numa concretização adicional, a dita porção N-terminal consiste em não mais que 15 aminoácidos, preferentemente não mais que 14, 13, 12, 11, 10 aminoácidos. De acordo com uma concretização preferida, a dita porção N-terminal consiste em 10 aminoácidos.

De acordo com uma concretização, o terminal-N da porção C-terminal junta-se directamente ao terminal-C da porção N-terminal, isto é, a porção N-terminal e a porção C-terminal são directamente juntas.

Numa concretização adicional, a dita porção C-terminal da cadeia de polipéptidos é idêntica a SEQ ID NO: 1.

Numa concretização adicional, a sequência assinatura está localizada na extremidade terminal N.

As concretizações preferidas das sequências assinaturas dos derivados de RANTES da presente invenção são exibidas no Quadro 1:

**Quadro 1**

<b>SEQ ID NO</b>	<b>Sequência assinatura</b>
SEQ ID NO: 2	QGPPLMALQS
SEQ ID NO: 3	QGPPLMWMQV
SEQ ID NO: 4	QGPPLMWLQV
SEQ ID NO: 5	QGPPLMWTQS
SEQ ID NO: 6	QGPPLMWLQT
SEQ ID NO: 7	QGPPLMWTQV
SEQ ID NO: 8	QGPPLMWMQS
SEQ ID NO: 9	QGPPLMATQS
SEQ ID NO: 10	QGPPLMWLQS
SEQ ID NO: 11	QGPPLMALQV
SEQ ID NO: 12	QGPPLMWLGG
SEQ ID NO: 13	QGPPLMWRGS
SEQ ID NO: 14	QGPPLMWLQV
SEQ ID NO: 15	QGPPLMQTTP
SEQ ID NO: 16	QGP PGDTV LW
SEQ ID NO: 17	QGP PGDIV LA
SEQ ID NO: 18	QGP PGSYDYS
SEQ ID NO: 19	QGP PGDGGSV
SEQ ID NO: 20	QGP LSGQSTP
SEQ ID NO: 21	QGP PGDWLQV
SEQ ID NO: 22	QGP PLMSFQS
SEQ ID NO: 23	QGP PLMSTQS
SEQ ID NO: 24	QGP PLMSLQV
SEQ ID NO: 25	QGP PLMGLQV
SEQ ID NO: 26	QGP LSGWLQV
SEQ ID NO: 27	QGP PLMSVLA
SEQ ID NO: 28	QGP PGSWSSV
SEQ ID NO: 29	QGP PLGSMGP
SEQ ID NO: 30	QGP PLSWLQV
SEQ ID NO: 31	QGP PLSWLQS
SEQ ID NO: 32	QGP PGQWSQV
SEQ ID NO: 33	QGP PMMAGLS
SEQ ID NO: 34	QGP PLSWQQS

(continuação)

<b>SEQ ID NO</b>	<b>Sequência assinatura</b>
SEQ ID NO: 35	QGPPGMWSQS
SEQ ID NO: 36	QGPPPLQWRQS
SEQ ID NO: 37	QGPPPLMGTQS
SEQ ID NO: 38	QGPPPLMQLQV
SEQ ID NO: 39	QGPPLSWSQV
SEQ ID NO: 40	QGPPMSWSQS
SEQ ID NO: 41	QGPPLMNLQV
SEQ ID NO: 42	QGPPMSAYQV
SEQ ID NO: 43	QGPPMQGGLS
SEQ ID NO: 44	QGPPLMSLAV
SEQ ID NO: 45	QGPPLMSLTV
SEQ ID NO: 46	QGPLSGWAQV
SEQ ID NO: 47	QGPLSQSSQV
SEQ ID NO: 48	QGPLSSQSQV
SEQ ID NO: 49	QGPLGQQGQV
SEQ ID NO: 50	QGPPPLQWFQV
SEQ ID NO: 51	QGPPPLQWTQV
SEQ ID NO: 52	QGPPLMALSV
SEQ ID NO: 53	QGPPLMWSQV
SEQ ID NO: 54	QGPPGQWGQV
SEQ ID NO: 55	QGPPGSWSQV
SEQ ID NO: 56	QGPPLMSSQS
SEQ ID NO: 57	QGPPLMGLSV
SEQ ID NO: 58	QGPPMLTLQV
SEQ ID NO: 59	QGPPGQWYQS
SEQ ID NO: 60	QGPPPLQWMA
SEQ ID NO: 61	QGPPPLQWMQV
SEQ ID NO: 62	QGPPLMSTQV
SEQ ID NO: 63	QGPPLMSLSV
SEQ ID NO: 64	QGPPLMSLQS
SEQ ID NO: 65	QGPPLMSLQA
SEQ ID NO: 66	QGPPLMVQS
SEQ ID NO: 67	QGPPLMSAQS

(continuação)

**SEQ ID NO                      Sequência assinatura**

SEQ ID NO: 68    QGPPLMSGQS

SEQ ID NO: 69    QGPPLMSGQV

A presente invenção proporciona os agentes peptídicos como revelado acima e, além disso, os ácidos nucleicos que codificam os ditos agentes peptídicos. Os ditos ácidos nucleicos podem ser denominados como "ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção". No seguinte, o termo "agente" abrange tanto agentes peptídicos da presente invenção como os ácidos nucleicos que codificam os ditos agentes peptídicos. O perito na especialidade saberia como desenhar ou identificar os ácidos nucleicos que codificam os ditos agentes peptídicos, de acordo com o código genético.

A presente invenção assim revela ácidos nucleicos que compreendem um ou mais segmentos que codificam um ou mais agentes peptídicos de acordo com a presente invenção. O dito ácido nucleico pode ser ARN ou ADN. O dito ácido nucleico pode além disso ser um vector, isto é, os ácidos nucleicos que codificam os péptidos da presente invenção podem ser incorporados dentro de um vector. Os ácidos nucleicos que codificam os péptidos da presente invenção podem além disso ser incorporados num vírus. A invenção assim também proporciona um vírus que contém, dentro do seu genoma, que compreende um ou mais segmentos que codificam um ou mais agentes peptídicos de acordo com a presente invenção.

Preferentemente, os agentes peptídicos da presente invenção são inibidores altamente potentes de entrada de VIH em células, isto é, têm alta potência anti-VIH. De acordo com a presente invenção, as expressões "alta potência anti-VIH", "alta potência" ou "altamente potente" são utilizados em relação aos agentes ou agentes peptídicos

que têm um valor de CI50, como medido pelos ensaios de fusão celular e replicação de VIH descritos em Materiais e Métodos, de 1000 pM (1 nM) ou inferior, preferentemente menos 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.

Na literatura, a potência de agentes é algumas vezes expressa em termos de valores de "CI50" obtidos a partir de um ensaio de ligação competitiva, isto é, tipicamente, com relação à competição com uma molécula traçadora marcada para a ligação ao receptor de interesse. Em cujo caso, a CI50 é definida como a concentração do agente a qual 50% do traçador é deslocada do receptor pelo dito agente, e é algumas vezes também denominada como uma "afinidade aparente". Contudo, para os agentes da presente invenção, encontrou-se que tais valores de CI50 de afinidade aparente, obtidos, por exemplo, com relação ao MIP-1 beta ou RANTES nativo, não são sempre proporcionais à potência anti-VIH da molécula. É assim preferente utilizar valores de CI50 obtidos dos ensaios descritos sob Material & Métodos.

Em concretizações preferidas, os agentes peptídicos são péptidos ou polipéptidos que estão relacionados com o péptido RANTES. Os agentes peptídicos podem compreender a sequência SEQ ID NO: 1, ou uma variante, homólogo (ortólogo, variante alélica, derivado, mutante funcional) ou fragmento do mesmo. Preferentemente, a dita sequência ou a variante, homólogo, ou fragmento ou do mesmo constitui, ou está localizada dentro de, uma parte diferente do agente peptídico que a sequência assinatura. Contudo, a sequência assinatura pode também estar contida dentro da variante ou homólogo SEQ ID NO: 1.

As ditas variantes, homólogos ou fragmentos podem conter substituições, inserções, deleções, adições ou trunicações de sequência.

De acordo com a presente invenção, diz-se que uma sequência possui similaridade a, ou é uma homóloga de, SEQ ID NO: 1, se a dita sequência é mais que 70% idêntica a SEQ ID NO: 1. Preferentemente, a dita sequência tem mais que 70% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 1, mais preferentemente mais que 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 99,9% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 1.

Diz-se que uma sequência também possui similaridade a ou é uma homóloga da SEQ ID NO: 1, se contém uma ou mais substituições conservativas com respeito a SEQ ID NO: 1. Substituições conservativas são substituições na sequência de um agente peptídico ou polipeptídico que não levam a uma significativa perda de função do dito agente, ou que levem somente a uma pequena perda de função. Tal perda de função devido a uma ou mais substituições conservativas pode não ser considerada significativa se a dita perda representa menos que 20% (preferentemente menos que 15%, 10%, 6% ou 4%) com relação à função do agente que têm a sequência não substituída. As substituições conservativas são frequentemente substituições em que uma cadeia lateral de aminoácidos é substituída por uma cadeia lateral de aminoácidos que está relacionada, ou é similar em propriedades físico-químicas, ao resíduo substituído. Tais substituições conservativas podem ser feitas, por exemplo, de acordo com o Quadro a seguir. Os aminoácidos no mesmo bloco na coluna do meio e preferentemente na mesma linha na coluna da direita podem ser substituídos entre si:

**Quadro 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 sequência possui similaridade a, ou é uma homóloga de, SEQ ID NO: 1, se mais que 30% de resíduos na dita sequência são idênticos ou conservativamente substituídos com respeito a SEQ ID NO: 1. Preferentemente, mais que 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% da dita sequência são idênticos ou conservativamente substituídos com respeito a SEQ ID NO: 1.

A invenção ademais proporciona polipéptidos que compreendem fragmentos da SEQ ID NO: 1 ou os ditos homólogos do mesmo. Os fragmentos devem compreender pelo menos  $n$  aminoácidos consecutivos da SEQ ID NO: 1 ou os ditos homólogos do mesmo e, dependendo da sequência particular,  $n$  é 5 ou mais (preferentemente mais 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 peptídicos da invenção preferentemente têm baixa actividade de sinalização, isto é, sua administração e/ou ligação a CCR5 causa somente um baixo grau de sinalização pró-inflamatória em células alvo. Agentes peptídicos com "baixa actividade de sinalização" de acordo com a presente invenção levam a uma resposta de sinalização de 30% ou menos da resposta máxima ( $E_{\max}$ ) provocada por PSC-RANTES, quando testados a uma concentração de 300 nM no ensaio de sinalização de Fluxo de Cálcio (veja-se sob Materiais e Métodos). Preferentemente, os agentes peptídicos da invenção têm actividades de sinalização, como medido no dito ensaio, de menos que 30%, mais preferentemente menos que 26%, 22%, 20%, 18%, 16%, 14%, 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1%.

Os agentes peptídicos da invenção preferentemente são selectivos para CCR5 mais que os receptores CCR1 e CCR3. De acordo com a presente invenção, um agente que se une a CCR1 e/ou CCR3 bem como CCR5 é considerado como tendo selectividade para CCR5 mais que CCR1 e CCR3 se não

substancialmente activar o CCR1 ou CCR3. Mais preferentemente, os agentes da presente invenção não são substancialmente ligados a e nem substancialmente activam o 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  $CI_{50}$  do agente com respeito à ligação de CCR1 e/ou CCR3 é maior que 50 nM, mais preferentemente maior que 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 nM, como medido utilizando o Ensaio de Ligação para Discriminação de CCR1 e/ou o Ensaio de Ligação para Discriminação de CCR3 (veja-se Materiais e Métodos). A selectividade de activação de CCR5 mais que a activação de CCR1 e/ou CCR3 pode ser avaliada por meio do Ensaio de Fluxo de Cálcio como descritos sob Materiais e Métodos. No contexto da presente invenção, considera-se que um agente substancialmente não activa o CCR1 e/ou CCR3 se a sua actividade de sinalização é inferior a 30%, mais preferentemente inferior a 26%, 22%, 20%, 18%, 16%, 14%, 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% da  $E_{max}$  provocada naquele receptor pelo RANTES/CCL5 nativo, como medido pelo Ensaio de Fluxo de Cálcio.

Os agentes peptídicos da invenção preferentemente têm alta actividade de sequestração de receptor, isto é, a administração e/ou ligação a CCR5 causa um alto grau de sequestração de receptor. A dita sequestração é preferentemente a internalização de receptor, regulação negativa ou modulação negativa. Os agentes peptídicos com "alta actividade de sequestração de receptor" de acordo com a presente invenção levam à sequestração de pelo menos 50% do nível de controlo de moléculas CCR5 de superfície, quando testados no Ensaio de sequestração de receptor / modulação negativa de superfície de CCR5 (veja-se sob Materiais e Métodos). Preferentemente, os agentes peptídicos da invenção têm actividade de sequestração de receptores de mais que 50% do nível de controlo de CCR5 de

superfície, por exemplo, pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95% do nível de controlo de CCR5 de superfície.

Preferentemente, os agentes da invenção combinam a alta potência anti-VIH com a baixa actividade de sinalização, ou combinam a alta potência anti-VIH com a alta actividade de sequestração de receptor. Mais preferentemente, os agentes da invenção combinam a alta potência anti-VIH com tanto a baixa sinalização como a alta actividade de sequestração de receptor. Além disso, os agentes da invenção preferentemente combinam pelo menos uma propriedade seleccionada do grupo que consiste em alta potência anti-VIH, alta actividade de sequestração de receptor e baixa actividade de sinalização com selectividade para CCR5. De acordo com certas concretizações preferidas da invenção, os agentes da invenção são caracterizados por uma combinação de níveis intermediários de potência anti-VIH (níveis de CI50, como 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 actividade de sinalização (por exemplo, entre 30% e 50%, ou entre 30% e 45% como medido pelo Ensaio de Fluxo de Cálcio) e níveis intermediários de actividade de sequestração de receptor (por exemplo, entre 20% e 60%, entre 30% e 50%, entre 20% e 50%, ou entre 30% e 60%, como medido pelo Ensaio de Modulação Negativa de Superfície de CCR5). Os Ensaio são descritos a seguir, sob Materiais e Métodos.

Os termos proteína, "péptido" ou "polipéptido" são utilizados intercambiavelmente e referem-se a polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender aminoácidos modificados, e pode ser interrompidos por não aminoácidos. Os termos também abrangem um polímero de aminoácido que foi modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo,

formação de ligação dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, ou qualquer outra manipulação ou modificação, tal como conjugação com um componente de marcação. Também incluídos dentro da definição estão, por exemplo, polipéptidos que contêm um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. Os polipéptidos podem ocorrer como cadeias simples ou cadeias associadas. Os polipéptidos da invenção podem ser naturalmente ou não naturalmente glicosilados (isto é, o polipéptido tem um padrão de glicosilação que difere do padrão de glicosilação encontrado no correspondente polipéptido de ocorrência natural).

#### **Preparação dos agentes peptídicos**

Os agentes peptídicos da invenção podem ser preparados de muitas maneiras, por exemplo, utilizando conhecidas técnicas de biologia molecular (isto é, engenharia genética e fermentação - em geral, biotecnologia) ou química de proteínas (por exemplo, síntese química de péptidos).

O agentes peptídicos e de ácido nucleico são preferentemente preparados utilizando as conhecidas técnicas de engenharia genética como descrito, por exemplo, em [13]. A invenção proporciona assim um processo para produzir agentes peptídicos ou polipéptidos da invenção, que compreende a etapa de cultivar uma célula hospedeira sob condições que induzem a expressão de polipéptidos.

Por exemplo, os agentes peptídicos da presente invenção podem ser preparados de forma recombinante pela expressão numa célula hospedeira. Tais métodos de expressão são bem conhecidos daqueles peritos na especialidade e muitos são descritos em detalhe em [13]. Um vector de expressão adequado pode ser escolhido pela hospedeira de escolha. O vector pode conter uma molécula de ADN recombinante que codifica um agente peptídico operativamente ligado a uma sequência de controlo de

expressão que é reconhecida pela maquinaria de transcrição da hospedeira. Quando um agente peptídico 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* [8, 9]. A invenção proporciona assim um processo para produzir um agente peptídico, em que o agente peptídico é sintetizado em parte ou por completo utilizando meios químicos. A síntese de péptidos em fase sólida é particularmente preferida, tal como métodos baseados na química de tBoc ou Fmoc [10]. A síntese enzimática [11] pode também ser utilizada em parte ou por completo.

A síntese biológica que não é pela expressão numa célula hospedeira pode ser utilizada, por exemplo, os polipéptidos podem ser produzidos por tradução de ARN *in vitro*. Os agentes peptídicos da invenção podem, por exemplo, também ser preparados pela digestão de polipéptidos maiores utilizando proteases.

Os métodos biológicos, que incluem engenharia genética, fermentação, e expressão, são em geral restritos à produção de polipéptidos baseados em L-aminoácidos, mas a manipulação de maquinaria de tradução *in vivo* ou *in vitro* (por exemplo, de moléculas tARN de aminoácido) pode ser utilizada para permitir a introdução de D-aminoácidos (ou de outros aminoácidos não naturais, tais como iodotirosina ou metilfenilalanina, azidohomoalanina, etc.) [12]. Onde D-aminoácidos estão incluídos, contudo, prefere-se utilizar a síntese química. Os polipéptidos da invenção podem ter modificações covalentes no terminal-C e/ou terminal-N.

### **Células hospedeiras**

A presente invenção também proporciona uma célula hospedeira que compreende um ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

De acordo com um aspecto da invenção, a célula hospedeira é adequada para produção biotecnológica dos agentes da presente invenção. As hospedeiras adequadas para a produção biotecnológica dos agentes da presente invenção incluem espécies procarióticas comumente utilizadas, tal como *E. coli*, ou leveduras eucarióticas que podem ser feitas para expressar altos níveis de proteínas recombinantes e que podem facilmente ser crescidas em grandes quantidades. As linhas celulares que crescem *in vitro* são também adequadas, particularmente quando são utilizados sistemas de expressão dirigidos a vírus tal como o sistema de expressão de Baculovirus que envolve a utilização de células de insecto como hospedeiras. Os agentes peptídicos podem também ser expressos *in vivo*, por exemplo, em larva de insecto ou em tecidos de mamíferos. Preferentemente, o agente peptídico é expresso em *E. coli*; por exemplo, a estirpe BLR(DE3) é adequada, embora sistemas equivalentes são igualmente apropriados, como o leitor perito estará ciente.

De acordo com um aspecto adicional da invenção, uma célula hospedeira é proporcionada de modo que seja capaz de sobreviver e ser propagada no intestino (tripa) ou vagina humana ou animal, e preferentemente de expressar na mesma o agente peptídico codificado pelo dito ácido nucleico. Preferentemente, a célula hospedeira de acordo com este aspecto da invenção também secreta o dito agente peptídico no periplasma ou meio. A seguir no presente documento, o termo "agente" além disso compreende células hospedeiras como descrito no presente documento.

Preferentemente, a célula hospedeira é um microrganismo altamente colonizador e não patogénico. Os microrganismos altamente colonizadores de acordo com a presente invenção são estirpes que são capazes de competir com micróbios nativos para a colonização prolongada das superfícies mucosas internas. A célula hospedeira é

preferentemente um microrganismo que pertence à flora intestinal ou vaginal humana, mais preferentemente um microrganismo que é comumente encontrado na flora intestinal ou vaginal humana. Mais preferentemente, a célula hospedeira é um microrganismo probiótico e/ou comensal, isto é, um género, espécie ou estirpe que é benéfica pelo menos à hospedeira humana. Preferentemente, a célula hospedeira de acordo com a presente invenção é parte da flora intestinal ou vaginal humana ou animal normal ou saudável. De acordo com uma concretização, a célula hospedeira pertence a um género seleccionado do grupo que consiste em *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia* e *Lactobacillus*. A célula hospedeira é preferentemente uma espécie seleccionada 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*. Preferentemente, o microrganismo altamente colonizador de acordo com a presente invenção é *Escherichia coli* Nissle 1917. Contudo, qualquer outra estirpe altamente colonizadora de ou *Escherichia coli* ou outras das espécies já mencionadas é também uma estirpe preferida de acordo com a presente invenção. Em outra concretização, a célula hospedeira é uma levedura. Preferentemente, a levedura é uma levedura comensal tal como *Pichia guelliermondii* ou *Saccharomyces boulardii*. Em ainda outra concretização, a célula hospedeira é uma célula humana.

O perito na especialidade está bem familiarizado com métodos de transformação de microrganismos com ácidos nucleicos exógenos e subsequentemente utilizando os

microrganismos transformados para expressar um polipéptido codificado pelos ditos ácidos nucleicos, na forma intracelular, periplásmica ou secretada [veja-se referências 13, 15, 16, 17].

### **Composições farmacêuticas**

A presente invenção proporciona composições que compreendem um agente de acordo com a presente invenção e um portador farmaceuticamente aceitável. Os agentes da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos agentes peptídicos ou correspondentes ácidos nucleicos, são proporcionados assim para a utilização como um medicamento. As composições de acordo com a presente invenção podem compreender qualquer agente da presente invenção, isto é, a seguir no presente documento, um agente peptídico, um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, um ácido nucleico, um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, ou uma célula hospedeira de acordo com a presente invenção. A preparação de composições farmacêuticas é bem conhecida a aquele perito na especialidade.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem, em particular, compreender mais que um agente (múltiplo) da presente invenção, por exemplo, dois ou mais agentes. A invenção também proporciona uma preparação ou sistema farmacêutico, que compreende (a) um primeiro agente, que é um agente da invenção; e (b) um segundo agente farmacêutico. De acordo com certas concretizações, o segundo agente farmacêutico pode incluir inibidores de transcriptase reversa (ITR), inibidores de protease (IP), inibidores de integrase e inibidores de montagem viral. De acordo com concretizações adicionais, o segundo agente farmacêutico pode incluir outros inibidores de entrada que aqueles da presente invenção, por exemplo, substâncias polianiónicas (por exemplo, sulfato de celulose), agentes de ligação a glicanos ou lectinas, ligantes de receptor de glicanos (por exemplo, manana solúvel), anticorpos,

inibidores de entrada de pequenas moléculas, inibidores de entrada de péptido, ou agentes de ligação a CXCR4 (bloqueadores de CXCR4). De acordo com ainda concretizações adicionais, o segundo agente farmacêutico pode incluir um detergente, ou um agente que modifica o pH, por exemplo, um ácido ou um agente tampão de pH. De acordo com ainda concretizações adicionais, o segundo agente farmacêutico pode incluir um ARN inibitório (siARN), em que o siARN pode ser quimicamente modificado.

De acordo com outros aspectos da invenção, o dito segundo agente pode também ser um fármaco anti-inflamatório ou um imunossupressor. Os ditos agentes múltiplos da invenção ou os ditos primeiro e segundo agentes são formulados ou em mistura ou como composições separadas, por exemplo, para administração simultânea embora separada, ou para administração sequencial (veja-se a seguir).

Os sais farmaceuticamente aceitáveis dos agentes da invenção podem claro ser feitos por procedimentos convencionais, tais como por meio da reacção da base e/ou ácido livre do agente com pelo menos uma quantidade estequiométrica do desejado ácido ou base formador de sal.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis de agentes da invenção incluem sais com catiões inorgânicos tais como sódio, potássio, cálcio, magnésio, zinco, e amónio, e sais com bases orgânicas. As bases orgânicas adequadas incluem N-metil-D-glucamina, arginina, benzetina, diolamina, olamina, procaína e trometamina. Os sais farmaceuticamente aceitáveis dos agentes da invenção também incluem sais derivados de ácidos orgânicos ou inorgânicos. Os aniões adequados incluem acetato, adipato, besilato, brometo, cansilato, cloreto, citrato, edisilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hclato, hidrobrometo, hidrocloreto, iodeto, isetionato, lactato, lactobionato, maleato, mesilato, metilbrometo, metilsulfato, napsilato, nitrato, oleato, pamoato, fosfato,

poligalacturonato, estearato, succinato, sulfato, sulfosalicilato, tanato, tartrato, tereftalato, tosilato e trietiodeto.

As formas de dosagem farmacêuticas de um agente da invenção podem ser proporcionadas numa libertação instantânea, libertação controlada, libertação sustentada, ou sistema de administração de fármacos alvo.

As formas farmacêuticas comumente utilizadas incluem, por exemplo, soluções e suspensões, (micro-) emulsões, pomadas, géis, cremes, pastas, espumas, supositórios, óvulos, implantes, pensos, lipossomas, comprimidos, drageias, pastilhas, cápsulas duras ou moles, pós amorfos ou cristalinos, pós ou comprimidos efervescentes, aerossóis, e formulações liofilizadas. Dependendo da via de administração utilizada, dispositivos especiais podem ser requeridos para aplicação ou administração do fármaco, tal como, por exemplo, seringas e agulhas, inaladores, bombas, canetas de injeção, aplicadores, frascos especiais, ou outros dispositivos para administração, que podem também ser implantados dentro do corpo. Em particular, os agentes da presente invenção podem, por exemplo, também estar compreendidos dentro de, ou associados a, um dispositivo ou agente anticoncepcional, por exemplo, um dispositivo intra-uterino ou intracervical, DIU ou diafragma, ou distribuídos num preservativo, por exemplo, contidos na forma de um líquido, solução, gel ou pó de revestimento. Contudo, de acordo com a presente invenção, os agentes da presente invenção não precisam necessariamente ser associados a um dispositivo ou agente anticoncepcional. Preferentemente, agente da invenção está compreendido dentro de e administrado por um sistema de administração depot. Preferentemente, o dito sistema de administração depot compreende um anel vaginal ou outro implante que seja adequado para inserção e/ou implantação na vagina ou colo

uterino e proporciona libertação lenta (controlada e/ou sustentada) do agente da presente invenção.

As formas de dosagem farmacêuticas são frequentemente compostas do fármaco, um(ns) excipiente(s), e um sistema recipiente/de encerramento. Um ou múltiplos excipientes, também denominados como ingredientes inactivos, podem ser adicionados a um agente da invenção para melhorar ou facilitar o fabrico, estabilidade, administração, e segurança do fármaco, e podem proporcionar um meio para alcançar um desejado perfil de libertação de fármaco. Portanto, o tipo de excipiente(s) a ser adicionado ao fármaco pode depender de vários factores, tais como, por exemplo, as propriedades físicas e químicas do fármaco, a via de administração, e o procedimento de fabrico. Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis estão disponíveis na técnica, e incluem aqueles listados em várias farmacopeias. (Veja-se, por exemplo, [18, 19])

As formas de dosagem farmacêuticas de um agente da presente invenção podem ser fabricadas por qualquer dos métodos bem conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, por processos convencionais de mistura, peneiração, dissolução, fusão, granulação, produção de drageias, produção de comprimidos, suspensão, extrusão, secagem por atomização, levigação, emulsificação, (nano/micro-) encapsulamento, compressão, ou liofilização. Como mencionado acima, as composições da presente invenção podem incluir um ou mais ingredientes inactivos fisiologicamente aceitáveis que facilitam o processamento de moléculas activas em preparações para utilização farmacêutica.

A formulação apropriada é dependente da desejada via de administração. Para injeção intravenosa, por exemplo, a composição pode ser formulada em solução aquosa, se necessário utilizando tampões fisiologicamente compatíveis, que incluem, por exemplo, fosfato, histidina, ou citrato para o ajuste do pH da formulação, e um agente de

tonicidade, tal como, por exemplo, cloreto de sódio ou dextrose. Para administração transmucosal ou nasal, as formulações semi-sólidas, líquidas, ou pensos podem ser preferidas, possivelmente que contenham melhoradores de penetração. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica. Para administração oral, os agentes podem ser formulados em formas farmacêuticas líquidas ou sólidas e como formulações instantâneas ou de libertação controlada/sustentada. As formas farmacêuticas adequadas para ingestão oral por um sujeito incluem comprimidos, pílulas, drageias, cápsulas duras e moles, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões, e emulsões. Os agentes podem também ser formulados em composições rectais, tais como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, que contêm bases de supositórios convencionais tais como manteiga de cacau ou outros glicéridos. Para supositórios vaginais, muitas diferentes bases de supositórios conhecidas ao perito na especialidade podem ser utilizadas, por exemplo, gelatina glicerínada, gelatina despolarizada, manteiga de cacau, polietileno glicol, polisorbato, ou outros.

Para administração oral, os agentes da invenção serão geralmente proporcionados em formas farmacêuticas sólidas, por exemplo, na forma de comprimidos ou cápsulas, ou como uma solução ou suspensão aquosa.

As formas farmacêuticas orais sólidas podem ser obtidas utilizando excipientes, que podem incluir diluentes, cargas, desintegrantes, ligantes (secos e húmidos), retardantes de dissolução, lubrificantes, deslizantes, antiaderentes, resinas de permuta catiónica, agentes humectantes, antioxidantes, conservantes, colorantes, adoçantes e agentes aromatizantes inertes. Estes excipientes podem ser de fonte sintética ou natural. Os 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 um sal do mesmo, açúcares (isto é, dextrose, sacarose, lactose, etc.), talco, mucilagem de tragacanto, óleos vegetais (hidrogenados), e ceras. Etanol e água podem servir como auxiliadores de granulação. Em certos exemplos, o revestimento de comprimidos com, por exemplo, um filme que mascara o sabor, um filme resistente ao ácido estomacal, ou um filme retardante de libertação é desejável. Os polímeros naturais e sintéticos, em combinação com colorantes, açúcares, e solventes orgânicos ou água, são frequentemente utilizados para revestir comprimidos, resultando em drageias. Quando uma cápsula é preferida mais que um comprimido, o pó de fármaco, suspensão, ou solução do mesmo pode ser administrado numa cápsula dura ou mole compatível.

Os diluentes inertes adequados incluem carbonato de sódio e cálcio, fosfato de sódio e cálcio e lactose. Com amido e ácido algínico são adequados agentes desintegrantes. Os agentes de ligação podem incluir amido e gelatina. O agente lubrificante, se está presente, será geralmente estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco. Se desejado, os comprimidos podem ser revestidos com um material tal como monoestearato de glicerilo ou diestearato de glicerilo, para retardar a absorção no tracto gastrointestinal.

As cápsulas para utilização oral incluem cápsulas de gelatina dura em que o ingrediente activo é misturado com um diluente sólido e cápsulas de gelatina moles em que o ingrediente activo é misturado com água ou um óleo tal como óleo de amendoim, parafina líquida ou azeite de oliva.

Numa concretização, os agentes da presente invenção pode ser administrados topicamente, via a pele ou membrana mucosa, tal como através de um penso para pele, uma formulação semi-sólida ou uma formulação líquida, por

exemplo, um gel, uma (micro-) emulsão, uma pomada, uma solução, uma (nano/micro)-suspensão, ou uma espuma. A penetração do fármaco na pele ou membrana mucosa e tecidos subjacentes pode ser regulada, por exemplo, utilizando melhoradores de penetração; a escolha e combinação apropriadas de excipientes lipofílicos, hidrofílicos, e anfifílicos, que incluem água, solventes orgânicos, ceras, óleos, polímeros sintéticos e naturais, tensioactivos, emulsificantes; por ajuste de pH; e utilização de agentes complexantes. Outras técnicas, tais como iontoforese, podem ser utilizadas para regular penetração na pele de um agente da invenção. A administração transdérmica ou tópica seriam preferidas, por exemplo, em situações em que a administração local com mínima exposição sistémica seja desejada.

Para administração por inalação, ou administração ao nariz, os agentes para utilização de acordo com a presente invenção são convenientemente administrados na forma de uma solução, suspensão, emulsão, ou aerossol semi-sólido de embalagens pressurizadas, ou um nebulizador, usualmente com a utilização de um propelente, por exemplo, carbonos halogenados derivados de metano e etano, dióxido de carbono, ou qualquer outro gás adequado. Para aerossóis tópicos, hidrocarbonetos como butano, isobuteno, e pentano são úteis. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dose apropriada pode ser determinada pela provisão de uma válvula para administrar uma quantidade medida. Podem ser formuladas cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina, para utilização num inalador ou insuflador. Estes tipicamente contêm uma mistura em pó do agente e uma adequada base de pó tal como lactose ou amido.

As composições formuladas para administração parentérica por injeção são usualmente estéreis e podem ser apresentadas em formas farmacêuticas unitárias, por exemplo, em ampolas, seringas, canetas de injeção, ou em

recipientes multi-dose, o último usualmente contendo um conservante. As composições podem tomar tais formas como suspensões, soluções, ou emulsões em óleo ou veículos aquosos, e podem conter agentes de formulação, tais como tampões, agentes de tonicidade, agentes melhoradores da viscosidade, tensioactivos, agentes de suspensão e dispersão, antioxidantes, polímeros biocompatíveis, agentes quelantes, e conservantes. Dependendo do local da injeção, o veículo pode conter água, um óleo sintético ou vegetal, e/ou co-solventes orgânicos. Em certos exemplos, tal como com um produto liofilizado ou um concentrado, a formulação parentérica seria reconstituída ou diluída antes da administração. As formulações depot, que proporcionam libertação controlada ou sustentada de um agente da invenção, podem incluir suspensões injectáveis de nano/micro partículas ou nano/micro cristais ou cristais não micronizados. Os polímeros tais como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), ou co-polímeros do mesmo, podem servir como matrizes de libertação controlada/sustentada, além de outros bem conhecidos na técnica. Outros sistemas de administração depot podem ser apresentados na forma de implantes e bombas que requerem incisão.

Os portadores adequados para injeção intravenosa para as moléculas da invenção são bem conhecidos na técnica e incluem soluções à base de água que contêm uma base, tal como, por exemplo, hidróxido de sódio, para formar um cloreto de sódio, sacarose ou agente ionizado como um agente de tonicidade, por exemplo. A solução à base de água pode compreender um tampão que contém fosfato ou histidina. Os co-solventes, tais como, por exemplo, polietileno glicóis, podem ser adicionados. Estes sistemas à base de água são efectivos em dissolver os agentes da invenção e produzem uma baixa toxicidade mediante administração sistémica. As proporções dos componentes de um sistema de

solução podem ser variadas consideravelmente, sem destruir as características de solubilidade e toxicidade. Além disso, a identidade dos componentes pode ser variada. Por exemplo, tensioactivos de baixa toxicidade, tais como polisorbatos ou poloxâmeros, podem ser utilizados, como podem o polietileno glicol ou outros co-solventes, polímeros biocompatíveis tais como polivinil pirrolidona podem ser adicionados, e outros açúcares e polióis podem substituir a dextrose.

#### **Aspectos adicionais da invenção**

A presente invenção além disso proporciona um kit, por exemplo, um kit de diagnóstico, que compreende um ou mais agentes peptídicos, os ácidos nucleicos ou células hospedeiras de acordo com a invenção.

#### **Utilizações das moléculas da invenção**

##### **Utilizações com base na função biológica; tratamento e prevenção de doenças**

A presente invenção proporciona a utilização dos agentes peptídicos da presente invenção para bloquear e/ou causar a sequestração de CCR5. A sequestração pode ser na forma de internalização de CCR5 em células alvo e/ou a regulação negativa (modulação negativa) de CCR5 em células alvo. A invenção também proporciona a utilização de ácidos nucleicos que codificam os ditos agentes peptídicos, ou de uma célula hospedeira de acordo com a presente invenção (veja-se acima que compreende um ácido nucleico da presente invenção, para a expressão e opcionalmente a secreção dos ditos agentes peptídicos).

Como mencionado acima, com relação à presente invenção, o termo "agente" abrange agentes peptídicos, os ácidos nucleicos que codificam os ditos agentes peptídicos e células hospedeiras de acordo com a invenção. A invenção proporciona a utilização dos ditos agentes para o tratamento e/ou profilaxia (prevenção) de doenças que podem ser tratadas bloqueando e/ou causando a sequestração de

CCR5. Os agentes da presente invenção são assim proporcionados para utilização como medicamentos.

Um ou mais dos agentes da presente invenção podem ser administrados a um sujeito. Quando mais de um agente é administrado, os ditos agentes podem ser administrados juntos (como uma mistura ou separadamente, embora substancialmente simultaneamente) ou sequencialmente. O dito um ou mais agentes da presente invenção podem ser administrados em combinação com um ou mais outros agentes farmacologicamente activos que não estão compreendidos dentro dos agentes da presente invenção. O agente ou agentes da presente invenção podem então também ser administrados juntos (como uma mistura ou separadamente, embora substancialmente simultaneamente) com o dito um ou mais outros agentes farmacologicamente activos, ou sequencialmente.

De acordo com um aspecto preferido, a presente invenção proporciona a utilização dos ditos agentes peptídicos, ou de ácidos nucleicos que codificam os agentes peptídicos, para o tratamento e/ou prevenção de infecções por VIH e/ou o surto da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), e/ou distúrbios e doenças associados ao mesmo, num sujeito.

A presente invenção proporciona assim um método de tratamento ou prevenção da infecção por VIH (a transmissão de VIH) num sujeito que compreende a administração de uma composição que compreende um agente da presente invenção. Além disso, proporciona-se um método de tratamento, ou prevenção do surto da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) num sujeito que compreende a administração de um que compreenda um agente da presente invenção.

Por exemplo, a transmissão de VIH, isto é, a infecção de células alvo por VIH, pode ser prevenida pela aplicação de uma composição de acordo com a invenção (por exemplo, um supositório, creme, gel, espuma, pasta, solução, líquido ou

pó que contém um agente de acordo com a presente invenção). Nesta concretização, a dita composição é preferentemente aplicada aos genitais humanos (vagina, recto, intestino) antes ou durante ou após o contacto sexual a fim de prevenir a transmissão de VIH durante o contacto sexual. Mais preferentemente, a dita composição é aplicada antes do contacto sexual.

A presente invenção também proporciona a utilização de agentes da presente invenção como agentes anti-inflamatórios. Os agentes são assim úteis para o tratamento e/ou prevenção de doenças inflamatórias e doenças auto-imunes. De acordo com um aspecto adicional 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 virais. No presente documento, o vírus pode ser VIH ou um vírus diferente do VIH.

De acordo com aspectos adicionais da invenção, proporciona-se também um método de tratamento ou prevenção da inflamação, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, ou infecções bacterianas e virais que compreende a administração de uma composição que compreende um agente da presente invenção. Em particular, por exemplo, proporciona-se um método de tratamento ou prevenção da doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide, ateroma ou arteriosclerose, asma, rinite alérgica ou dermatite atópica, a rejeição de órgãos, tecidos ou células transplantadas, esclerose múltipla e/ou outras doenças desmielinizantes, neuropatia periférica, bem como cancros, que incluem cancros metastáticos.

Numa concretização preferida da invenção, para qualquer das doenças e condições acima, proporciona-se um método de tratamento ou profilaxia, em que uma célula hospedeira como revelado anteriormente é administrada a um

sujeito, a dita célula hospedeira expressando e secretando um agente peptídico de acordo com a presente invenção.

A invenção também proporciona a utilização de ácidos nucleicos da presente invenção para terapêutica génica, em que os ditos ácidos nucleicos são incorporados num vírus para administração a um sujeito.

#### **Modos de administração**

As composições da presente invenção podem ser administradas directamente ou em composições farmacêuticas que contêm excipientes (veja-se acima), como é bem conhecido na técnica. Os presentes métodos de tratamento envolvem a administração de uma quantidade terapêuticamente efectiva de um agente da presente invenção a um sujeito.

O termo "quantidade terapêuticamente efectiva" como utilizado no presente documento refere-se a uma quantidade de um agente de acordo com a presente invenção necessária para tratar, melhorar, ou prevenir a condição patológica alvo, ou para exibir um efeito terapêutico ou preventivo detectável. Em geral, a dose terapêuticamente efectiva pode ser estimada inicialmente ou em ensaios de cultura celular ou em modelos animais, por exemplo, em primatas não humanos, ratinhos, coelhos, cães, ou porcos. O modelo animal pode também ser utilizado para determinar o intervalo de concentração e via de administração apropriados. Tal informação pode então ser utilizada para determinar doses e vias úteis para administração em seres humanos.

A exacta quantidade efectiva para um sujeito humano dependerá da gravidade do estado patológico, saúde geral do sujeito, idade, peso, e sexo do sujeito, dieta, tempo e frequência de administração, combinação(ões) de fármacos, sensibilidades de reacção, e tolerância/resposta à terapêutica. Esta quantidade pode ser determinada por experimentação de rotina e está dentro do julgamento do clínico. Geralmente, uma quantidade efectiva, isto é, dose,

de um agente, será desde 0,005 mg/kg até 50 mg/kg, preferentemente 0,125 mg/kg até 20 mg/kg.

Os regimes de tratamento efectivos para os preferidos agentes da invenção incluem a administração uma, duas ou três vezes ao dia, e/ou uma, duas, três, quatro, cinco ou seis vezes por semana). Estes regimes são, portanto, particularmente preferidos para a utilização na presente invenção.

Uma via de administração efectiva e conveniente e uma formulação apropriada dos agentes da invenção em composições farmacêuticas (veja-se acima) podem também ser prontamente determinadas por experimentação de rotina. Várias formulações e sistemas de administração de fármacos estão disponíveis na técnica (veja-se, por exemplo, [20, 21]).

As vias de administração adequadas podem, por exemplo, incluir a administração vaginal, rectal, intestinal, oral, nasal (intranasal), pulmonar ou outra administração na mucosa, tópica, transdérmica, ocular, auricular, e parentérica.

As vias primárias para administração parentérica incluem a administração intravenosa, intramuscular, e subcutânea. As vias secundárias de administração incluem a administração intraperitoneal, intra-arterial, intra-articular, 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 serem utilizados, bem como se seria preferida a administração local ou sistémica.

Para composições úteis para os presentes métodos de tratamento, uma dose terapeuticamente efectiva pode ser estimada inicialmente utilizando uma variedade de técnicas bem conhecidas na técnica. As doses iniciais utilizadas em

estudos em animais podem ser baseadas em concentrações efectivas estabelecidas em ensaios de cultura celular. Os intervalos de dosagem apropriados para sujeitos humanos podem ser determinados, por exemplo, pela utilização de dados obtidos de estudos em animais e ensaios de cultura celular.

Uma dose terapeuticamente efectiva 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 na melhoria de sintomas ou uma prolongação da sobrevivência num sujeito. Toxicidade e eficácia terapêutica de tais moléculas podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou animais de experiências, por exemplo, pela determinação da DL50 (a dose letal para 50% da população) e a DE50 (a dose terapeuticamente efectiva em 50% da população). A razão de dose de tóxicos para efeitos terapêuticos é o índice terapêutico, que pode ser expresso como a razão DL50 / DE50. Os agentes que exibem altos índices terapêuticos são preferidos.

A quantidade efectiva ou quantidade terapeuticamente efectiva é a quantidade do agente ou composição farmacêutica que provocará a resposta biológica ou médica de um tecido, sistema, animal, ou humano que está sendo procurada pelo investigador, veterinário, doutor médico, ou outro clínico, por exemplo, a regulação de metabolismo da glicose, diminuição nos níveis de glicose sanguíneos elevados ou aumentados, tratamento ou prevenção de um distúrbio associado ao metabolismo alterado da glicose, por exemplo, diabetes, etc.

As dosagens preferentemente caem dentro de um intervalo de concentrações circulantes que inclui a DE50 com pequena ou nenhuma toxicidade. As dosagens podem variar dentro deste intervalo dependendo da forma farmacêutica empregada e/ou a via de administração utilizada. A

formulação exacta, via de administração, dosagem e intervalo de dosagem devem ser escolhidos de acordo com métodos conhecidos na técnica, em vista das especificações da condição de um sujeito.

A quantidade e intervalo de dosagem podem ser ajustados individualmente para proporcionar níveis de plasma da fracção activa que são suficientes para alcançar os efeitos desejados, isto é, concentração efectiva mínima (CEM). A CEM variará para cada agente, mas pode ser estimada a partir de, por exemplo, dados *in vitro* e experiências em animal. As dosagens necessárias para alcançar a CEM dependerão das características individuais e a via de administração. Nos casos de administração local ou captação selectiva, a concentração local efectiva do fármaco pode não estar relacionada com a concentração de plasma.

A quantidade de agente ou composição administrada pode ser dependente de uma variedade de factores, que incluem o sexo, idade, e peso do sujeito a ser tratado, a gravidade da aflição, a maneira de administração, e o julgamento do clínico que prescreve.

As presentes composições podem, se desejado, ser apresentadas num pacote ou dispositivo de dosagem que contém uma ou mais formas farmacêuticas unitárias que contém o ingrediente activo. Tal pacote ou dispositivo pode, por exemplo, compreender folha metálica ou plástica, tal como um pacote de blister, ou rolhas de vidro e borracha tais como em viais. O pacote ou dispositivo de dosagem pode estar acompanhado por instruções para administração. As composições que compreendem um agente da invenção formulado num portador farmacêutico compatível podem também ser preparadas, colocadas num recipiente apropriado, e marcadas para tratamento de uma condição indicada. A presente invenção proporciona assim um agente peptídico, ácido nucleico ou célula hospedeira de acordo

com a invenção para utilização no tratamento ou na prevenção de infecções por VIH, no tratamento e/ou prevenção da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), no tratamento e/ou prevenção da transmissão do VIH, e/ou na prevenção de transmissão do VIH durante o contacto sexual.

A presente invenção proporciona assim um agente peptídico, ácido nucleico ou célula hospedeira de acordo com a invenção para utilização no tratamento e/ou prevenção da inflamação, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, infecções bacterianas e virais, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide, ateroma ou arteriosclerose, asma, rinite alérgica ou dermatite atópica, a rejeição de órgãos, tecidos ou células transplantadas, esclerose múltipla e/ou outras doenças desmielinizantes, neuropatia periférica, doenças malignas, cancros ou cancros metastáticos.

A presente invenção proporciona assim a utilização de um agente peptídico, ácido nucleico ou célula hospedeira de acordo com a invenção para o fabrico de um medicamento para tratar e/ou prevenir infecções por VIH, para tratar e/ou prevenir síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), ou o surto do mesmo, e prevenir a transmissão de VIH, por exemplo, durante o contacto sexual.

A presente invenção proporciona a utilização de um agente peptídico, ácido nucleico ou célula hospedeira de acordo com a invenção para o fabrico de um medicamento para tratar e/ou prevenir inflamação, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, ou infecções bacterianas e virais, artrite reumatóide, ateroma ou arteriosclerose, asma, rinite alérgica ou dermatite atópica, a rejeição de órgãos, tecidos ou células transplantadas, esclerose múltipla e/ou outras doenças desmielinizantes, neuropatia periférica, doenças malignas, cancros ou cancros metastáticos.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A figura 1 mostra detalhes da caracterização de um típico derivado de citocina polipeptídica, que consiste na SEQ ID NO: 21 fusionada ao terminal N da SEQ ID NO: 1. O polipéptido foi preparado pela química síntese total como descrito sob Materiais e Métodos. UA: Unidades de Absorção. O Painel A mostra o HPLC analítico de material bruto após clivagem por HF. O Painel B mostra um HPLC analítico do material desejado purificado da preparação bruta. O Painel C mostra o traço de um HPLC analítico da mistura de reacção após a purificação e redobrimento / formação de pontes dissulfeto. O Painel D mostra o traço obtido por HPLC analítico com material purificado, redobrado.

## **MODOS PARA LEVAR A CABO A INVENÇÃO**

### **Materiais e Métodos**

#### **Preparação de polipéptidos por síntese química**

A preparação de quimiocinas por síntese química total foi levada a cabo num sintetizador de péptidos ABI 430 modificado personalizado para realizar a química Boc com a neutralização *in situ* [22]. A estratégia de síntese também caracterizou uma etapa de capeamento químico (para terminar quaisquer cadeias com grupos amino livres na extremidade da etapa de acoplamento) utilizando acetilglicina em cada ciclo. Após a clivagem por HF, produtos brutos foram analisados por HPLC analítico e espectrometria de massa MALDI. Após purificação em escala preparativa do desejado produto, o redobrimento de proteínas e a formação de pontes dissulfeto foi levada a cabo de acordo com procedimentos publicados [23], e o material redobrado foi verificado por HPLC analítico (tempo de retenção mais curto) e espectrometria de massa por *electrospray* (perda de unidades de massa devido a oxidação do grupo tiol da cisteína durante a formação de pontes dissulfeto). Os produtos finais foram submetidos a purificação em escala preparativa e então liofilizados. Os detalhes da caracterização de material intermediariamente e parcialmente purificados por

HPLC para uma síntese típica, de uma proteína da invenção que consiste na SEQ ID NO: 21 fusionada ao terminal N da SEQ ID NO: 1, são mostrados na Figura 1. Os resultados da caracterização do material purificado da dita proteína por espectrometria de massa são proporcionados no seguinte quadro:

**Quadro 3 Caracterização de material purificado por espectrometria de massa**

Proteína que consiste na SEQ ID NO: 21 fusionada ao terminal-N da SEQ ID NO: 1	Massa calculada	Massa observada
Material antes do redobrimento	7976,26	7976,76 ± 0,24
Material após o redobrimento	7922,26	7972,68 ± 0,36

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

### **Preparação de polipéptidos por expressão em organismos hospedeiros**

Os agentes polipeptídicos foram preparados por expressão em organismos hospedeiros utilizando técnicas de rotina que são conhecidas na técnica, seguidas de procedimentos descritos, por exemplo, nas referências [13] e [14].

### **Ensaio de Fusão Celular**

Este procedimento foi levado a cabo como descrito em [5] utilizando as linhas de células HeLa-P5L [2] e HeLa-Env-ADA [26]. As células HeLa-P5L foram semeadas em placas de 96 poços ( $10^4$  células por poço). Vinte e quatro horas depois, o meio foi retirado e substituído por meio que contém  $10^4$  de células HeLa-Env-ADA por poço mais agentes peptídicos de quimiocina da presente invenção. Após mais 24 h, as células foram lavadas uma vez em PBS, lisadas e testadas pela actividade  $\beta$ -galactosidase pela adição do substrato colorigénico CPRG (clorofenol vermelho- $\beta$ -D-

galactopiranosídeo). Os resultados foram expressos de acordo com a seguinte fórmula:

$$100 \times (\text{absorvância média [tratado]} - \text{absorvância média [células sem envelope]}) / (\text{absorvância média [sem quimiocina]} - \text{absorvância média [células sem envelope]})$$

As medições foram realizadas em triplicado para cada experiência independente, e valores de CI50 obtidos de curvas de dose-inibição ajustadas utilizando o software Prism® (GraphPad). O valor de CI50 representa a concentração de um agente peptídico ao qual a fusão celular foi inibida em 50%, em comparação com um controlo que não foi exposto a qualquer agente inibitório.

#### **Ensaio de Replicação Viral**

A replicação viral foi testada como descrito nas referências [24] e [25], com a modificação de que as células HeLa foram utilizadas material de partida e células repórter SX22-1 foram adicionadas somente após a expressão do vírus.

#### **Ensaio de Fluxo de Cálcio**

Os agentes foram testados pela estimulação de sinalização de cálcio via ou CCR5, CCR1 ou CCR3 utilizando células (por exemplo, células de Rim Embrionário Humano (HEK)) transfectadas para dar a expressão estável de ou CCR5, CCR1 ou CCR3, respectivamente. O procedimento foi levado a cabo essencialmente como descrito na referência [6], utilizando as placas de 96 poços e um fluorímetro FLEXstation (Dispositivos Moleculares [*Molecular Devices*]). As medições fluorescentes foram levadas a cabo nas ditas células carregadas com Fluo-4 (Sondas Moleculares [*Molecular Probes*]) de acordo com as recomendações do fabricante e mantidas a 37°C. As medições foram realizadas em sextuplicado (n = 6) numa única concentração de agente

(300 nM; uma concentração que dá  $E_{\max}$  para PSC- RANTES e nativo RANTES).

#### **Ensaio de Modulação Negativa de Superfície de CCR5**

As células CHO-CCR5 [5] foram semeadas em 80.000 células/ml em placas de 96 poços. No dia seguinte, o meio foi retirado e substituído por meio que contém quimiocinas em diferentes concentrações e as células foram incubadas durante 1 h a 37°C. No final deste período, o meio foi retirado e as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%. Após duas lavagens com PBS, as soluções de ou anticorpo anti-CCR5 conjugado com ficoeritrina (clone 3A9, Pharmingen) ou anticorpo anti-CCR1 conjugado com ficoeritrina (para controlo negativo) em PBS-BSA a 1% foram adicionados às células. As placas foram deixadas em gelo durante 1 h, então lavadas três vezes com PBS-BSA a 1% antes dos valores de fluorescência serem determinados utilizando um fluorímetro FLEXstation. Os resultados foram expressos como % de nível de controlo de CCR5 de superfície:

$$100 \times \frac{(\text{fluorescência média [quimiocina adicionada, anti-CCR5]} - \text{fluorescência média de controlo negativo [anti-CCR1]})}{(\text{fluorescência média de controlo positivo [nenhuma quimiocina adicionada, anti-CCR5]} - \text{fluorescência média [anti-CCR1]})}$$

Cada determinação foi realizada em sextuplicado (n=6), e PSC-RANTES foi utilizado como uma quimiocina de referência em cada experiência.

#### **Ensaio de Discriminação de CCR1**

A selectividade para CCR5 mais que CCR1 foi medida num ensaio de ligação em competição CCR1 utilizando um ligando de CCR1 natural radiomarcado como um traçador. Ou o MIP-RANTES/CCL5 pode, por exemplo, ser utilizado como um

traçador para este Ensaio de Discriminação de CCR1. O ensaio foi levado a cabo como descrito na referência [27].

### **Ensaio de Discriminação de CCR3**

A selectividade para CCR5 mais que CCR1 foi medida num ensaio de ligação em competição de CCR3 utilizando um ligando de CCR3 natural radiomarcado como um traçador. Eotaxin/CCL11 ou RANTES/CCL5 pode, por exemplo, ser utilizado como um traçador para este Ensaio de Discriminação de CCR3. O ensaio foi levado a cabo como descrito na referência [28].

### **Exemplos**

#### **Exemplo 1 Medição da potência anti-VIH pelo Ensaio de Fusão Celular**

Os agentes peptídicos foram preparados por síntese química como descrito sob Materiais e Métodos. Os agentes foram individualmente avaliados utilizando o Ensaio de Fusão Celular como descrito sob Materiais e Métodos, e os valores de CI50 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 CI50 obtidos são listados no Quadro 4.

Em geral, baixos valores de CI50, isto é, altos valores de potência anti-VIH, foram encontrados para os agentes peptídicos que conformaram bem com à sequência assinatura 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, em que X representa qualquer aminoácido e "/" representa "ou". Os exemplos de tais compostos são aqueles derivados de RANTES que consistem nas sequências assinaturas N-terminal SEQ ID NO: 2 -69- fusionada a posições 10-68 da sequência RANTES nativa (SEQ. ID. NO: 1)

**Quadro 4 Caracterização dos agentes peptídicos da invenção**

<b>sequência assinatura SEQ ID NO:</b>	<b>potência anti-VIH (CI50, nM) por ensaio de fusão celular</b>	<b>potência anti-VIH (CI50, nM) por ensaio de replicação viral</b>	<b>sinalização CCR5 (%) <sup>(1)</sup></b>	<b>sequestração CCR5 (%) <sup>(2)</sup></b>
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

(continuação)

<b>sequência assinatura SEQ ID NO:</b>	<b>potência anti-VIH (CI50, nM) por ensaio de fusão celular</b>	<b>potência anti-VIH (CI50, nM) por ensaio de replicação viral</b>	<b>sinalização CCR5 (%) <sup>(1)</sup></b>	<b>sequestração CCR5 (%) <sup>(2)</sup></b>
28	0,03	0,213	45,0	59
29	0,39		22,6	36
30	0,01		4,1	4
31	0,02		3,6	6
32	0,03		6,0	5
33	0,03		0,2	0
34	0,03		5,1	8
35	0,05		4,9	5
36	0,05		5,1	7
37	0,09		0,7	5
38	0,10		0,3	3
39	0,10		1,7	5
40	0,11		0	6
41	0,12		0	9
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

(continuação)

<b>sequência assinatura SEQ ID NO:</b>	<b>potência anti-VIH (CI50, nM) por ensaio de fusão celular</b>	<b>potência anti-VIH (CI50, nM) por ensaio de replicação viral</b>	<b>sinalização CCR5 (%) <sup>(1)</sup></b>	<b>sequestração CCR5 (%) <sup>(2)</sup></b>
54	0,06		2,1	12
55	0,07		7,3	33
56	0,15		7,5	15
57	0,16		4,9	18
58	0,23		0,7	25
59	0,23		6,0	15
60	0,02		11,8	8
61	0,02		12,7	7
62	0,03		29,6	45
63	0,03		42,7	50
64	0,04		17,2	28
65	0,04		11,5	30
66	0,07		33,4	42
67	0,12		10,3	15
68	0,17		10,6	24
69	0,22		20,1	38
<p>(1) A % de sinalização é expressa como a % da resposta máxima (<math>E_{max}</math>) provocada por PSC-RANTES, quando testados a uma concentração de 300 nM no ensaio de sinalização de Fluxo de Cálcio como descrito sob Materiais e Métodos.</p> <p>(2) A % de sequestração é expressa como a quantidade de sequestração com respeito ao nível de controlo de moléculas CCR5 de superfície, quando testados no Ensaio de sequestração de receptor / modulação negativa de superfície de CCR5 como descrito sob Materiais e Métodos.</p>				

### **Exemplo 2 Medição da potência anti-VIH pelo Ensaio de Replicação Viral**

Os agentes peptídicos da invenção foram preparados por síntese química como descrito sob Materiais e Métodos. Os agentes foram individualmente avaliados utilizando o Ensaio de Replicação Viral como descrito sob Materiais e Métodos, e os valores de CI50 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 CI50 obtidos são listados no Quadro 4.

Em geral, os baixos valores de CI50, isto é, altos valores de potência anti-VIH, foram encontrados para os agentes peptídicos que conformaram bem com à sequência assinatura consenso N-terminal Q G P [P/L] [L/G] [M/D] X X [Q/L] X em que X representa qualquer aminoácido e "/" representa "ou". Os exemplos de tais compostos são aqueles derivados de RANTES que consistem nas sequências assinaturas N-terminal SEQ ID NO: 2 - 29 fusionada a posições 10-68 da sequência RANTES nativa (SEQ. ID. NO: 1).

### **Exemplo 3 Medição da sinalização celular pelo Ensaio de Fluxo de Cálcio**

Os agentes peptídicos preparados por síntese química como descrito sob Materiais e Métodos foram avaliados utilizando o Ensaio de Fluxo de Cálcio como descrito sob Materiais e Métodos. Os valores de "sinalização" obtidos utilizando o dito ensaio para agentes peptídicos individuais da presente invenção são listados no Quadro 4.

Em geral, os baixos valores de sinalização de, por exemplo, como máximo 6% ou 10% foram encontrados para os agentes peptídicos que conformaram bem com à sequência assinatura consenso N-terminal Q G P P L M [S/G] [L/F/T] Q [S/V] em que "/" representa "ou". Os exemplos de tais compostos são aqueles derivados de RANTES que consistem nas sequências assinaturas N-terminal SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, ou SEQ ID NO: 25 fusionadas a posições

10-68 da sequência RANTES nativa (SEQ. ID. NO: 1). Contudo, derivados de RANTES da presente invenção com outras sequências assinaturas, tais como SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 21 também mostraram baixos valores de sinalização de 20% ou menos, o agente peptídico que porta a sequência assinatura SEQ ID NO: 29 alcançou um baixo valor de sinalização de 30% ou menos, e o agente peptídico que porta a sequência assinatura SEQ ID NO: 28 alcançou um valor de sinalização abaixo de 46%. No total, os baixos valores de sinalização foram observados para agentes peptídicos que conformaram com a sequência assinatura 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, que incluem derivados de RANTES que têm as sequências assinaturas N-terminal SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, ou SEQ ID NO: 55.

#### **Exemplo 4 Ensaio de sequestração de receptor pelo Ensaio de Modulação Negativa de Superfície de CCR5**

Os agentes peptídicos preparados por síntese química como descrito sob Materiais e Métodos foram avaliados utilizando o Ensaio de Modulação Negativa de Superfície de CCR5 como descrito sob Materiais e Métodos. Os valores de "sequestração de CCR5" obtidos utilizando o dito ensaio para agentes peptídicos individuais da presente invenção são listados no Quadro 4. Os valores de sequestração de CCR5 obtidos nos testes equivalentes dos documentos da técnica anterior são listados no Quadro 5.

Em geral, altos valores de sequestração de CCR5 de, por exemplo, pelo menos 60% ou 65% ou mais foram, encontrados para agentes peptídicos que conformaram bem com à sequência assinatura consenso N-terminal Q G P P G D [T/I] V L [W/A], em que "/" representa "ou". Os exemplos de tais compostos são aqueles derivados de RANTES que consistem nas sequências assinaturas N-terminal SEQ ID NO:

16 ou SEQ ID NO: 17 fusionada a posições 10-68 da sequência RANTES nativa (SEQ. ID. NO: 1). Contudo, os derivados de RANTES da presente invenção com outras sequências assinaturas, tais como SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 foram também caracterizadas pela alta actividade de sequestração de CCR5 de, por exemplo, 60% ou 65%, ou mais. Além disso, os agentes peptídicos de derivados de RANTES com as sequências assinaturas SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 28 foram também caracterizadas pela alta actividade de sequestração de CCR5, isto é, de pelo menos 50%, ou pelo menos 54, 55 ou 59%. No total, altos valores de sequestração de CCR5 foram observados para agentes peptídicos que conformaram com a sequência assinatura 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, que incluem derivados de RANTES que têm as sequências assinaturas N-terminal SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49.

#### **Exemplo 5 Exemplo comparativo**

Os derivados de RANTES da técnica anterior como listado no Quadro 5 foram avaliados utilizando ensaios como descrito para os agentes da invenção no Exemplo 1 ao Exemplo 4. Os resultados obtidos nestes ensaios com os derivados de RANTES da técnica anterior são listados no Quadro 5.

**Quadro 5 Caracterização de derivados de citocina da técnica anterior seleccionados**

Nome do agente	potência anti-VIH (CI50, nM) por ensaio de fusão celular	potência anti-VIH (CI50, nM) por ensaio de replicação viral	sinalização de CCR5 (%) <sup>(1)</sup>	sequestração de CCR5 (%) <sup>(2)</sup>
Met-RANTES <sup>(3)</sup>	75,14		15,0	26
AOP-RANTES <sup>(4)</sup>	1,12		80,7	71
NNY-RANTES <sup>(5)</sup>	0,29		84,5	77
PSC-RANTES <sup>(6)</sup>	0,02	0,281	100,0	75
P1 <sup>(7)</sup>	6,59		0,0	5
P2 <sup>(7)</sup>	1,61		93,8	68
<p>(1) A % de sinalização é expressa como a % da resposta máxima (<math>E_{max}</math>) provocada por PSC-RANTES, quando testados a uma concentração de 300 nM no ensaio de sinalização de Fluxo de Cálcio como descrito sob Materiais e Métodos.</p> <p>(2) A % de sequestração é expressa como a quantidade de sequestração com respeito ao nível de controlo de moléculas CCR5 de superfície, quando testados no CCR5 Ensaio de sequestração de receptor / modulação negativa de superfície como descrito sob Materiais e Métodos.</p> <p>(3) composto reportado na ref. [13]</p> <p>(4) composto reportado na ref. [2]</p> <p>(5) composto reportado na ref. [3]</p> <p>(6) composto reportado na ref. [5]</p> <p>(7) composto reportado na ref. [6]</p>				

**Exemplo 6 Testagem da eficácia *in vitro* de novas moléculas contra clades mundiais de VIH**

As moléculas são testadas contra estirpes R5 representativas do mundo todo.

Em resumo, os isolados de VIH primários obtidos de diferentes locais de campo ao redor do mundo e tornados disponíveis através de repositórios de reagentes são testados pela sua sensibilidade à inibição em ensaios de replicação utilizando células primárias humanas.

O procedimento pode ser levado a cabo como descrito na referência [29], ou como segue:

Culturas celulares. As PBMC são purificadas do sangue de diferentes dadores humanos VIH-negativo pela centrifugação em gradiente Ficoll-Paque. As PBMC purificadas são ressuspendidas em RPMI (Mediatech, Inc., Herndon, Pa.) meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Life Technologies, Inc., Rockville, Md.), 100 U de penicilina e 100 µg de estreptomicina (pen/strep; Mediatech, Inc.) por ml, 1 ng de interleucina-2 recombinante humana (IL-2; Life Technologies, Inc.) por ml, e 1 U de fitohemaglutinina (PHA; Life Technologies, Inc.) por ml.

Vírus. As seguintes estirpes NSI R5 VIH-1 são obtidas da *AIDS Research and Reagent Program*: A-92RW009, A-92RW008, A-93UG075, B-92BR021, B-92TH026, B-BaL, C-92BR025, C-93IN101, D-94UG108, E/A-92TH022, E-92TH001, B/F-93BR019, F-93BR029, G-92NG083-JV1083, e G-92NG003-G3. Duas estirpes SI X4 (HXB2 e F-93BR020) são também obtidas da *AIDS Reagent Program* para utilização como controlos. Para a maioria das estirpes listadas acima, a letra antes do traço indica o subtipo do envelope viral e é seguido do ano de isolamento, país de origem, e número da estirpe, por exemplo, A-92RW009 é uma estirpe de clade A VIH-1 isolada em Ruanda em 1992. Todos estes vírus são propagados em culturas de PBMC até altos títulos de vírus (como determinado pela actividade de transcriptase reversa [RT]) serem obtidos em sobrenadantes de cultura. Os valores de dose infectiva em cultura de

tecido de 50% são então calculados para cada vírus utilizando a técnica Reed-Muench [30].

Ensaio de replicação. As PBMC tratadas com PHA/IL-2 são adicionadas a placas de 96 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço) que contêm inibidores diluídos em série. O isolado de VIH-1 apropriado em meio RPMI completo (aproximadamente 0,1 de multiplicidade de infecção [MOI]) é então adicionado. As experiências em triplicata são realizadas com todos os isolados de NSI R5 VIH-1. No dia 3 após a infecção, cada placa é centrifugada durante 5 min a  $1,200 \times g$  numa centrífuga com cesto giratório. Uma alíquota (150  $\mu$ l) de sobrenadante livre de células é então retirado de cada poço e substituído por 150  $\mu$ l de meio RPMI completo que contém as concentrações apropriadas de inibidor. Nos dias 5, 10, e 15 após a infecção, cada placa é centrifugada de novo durante 5 min, e amostras de sobrenadante livre de células (25  $\mu$ l) são retiradas e armazenadas a  $-70^\circ\text{C}$  para subsequente análise. As culturas são descartadas no dia 15.

A produção de vírus na presença de inibidores é medida em sobrenadantes livre de células utilizando ensaios RT como descrito anteriormente [31].

#### **Exemplo 7 Demonstração de eficácia *in vivo* de inibidores de CCR5 num modelo de primata não humano de transmissão vaginal de VIH**

O modelo de macaco para a prevenção de VIH descrito a seguir é utilizado para demonstrar a eficácia *in vivo* das moléculas da invenção.

Em resumo, os grupos de macacos rhesus fêmeas adultas tratados com progesterona são pré-tratados com 4 mL de ou PBS ou soluções de inibidores em PBS. Quinze minutos depois, os animais são desafiados com 300 TCID<sub>50</sub> de SVIH SF 162 e monitorizados por até 24 semanas para o desenvolvimento de viremia em plasma [32].

O procedimento pode ser levado a cabo como descrito na referência [33], ou como segue:

Os macacos rhesus fêmeas adultos de ciclo normal (*Macacca mulatta*) variando desde 5 até 12 anos de idade são utilizados. Todos os estudos aderem ao Guia para o Cuidado e Utilização de Animais de Laboratório (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals), preparados pelo Conselho de Pesquisa Nacional (*National Research Council*), Institutos Nacionais de Saúde (*National Institutes of Health*), e com as Directrizes do Comité Institucional de Utilização e Cuidado Animal do Centro Nacional de Pesquisa de Primatas de Tulane (*Tulane National Primate Research Center Institutional Animal Care e Use Committee*). Todo o pessoal chave (treinadores de animais, tratadores e técnicos de laboratório engajados na preparação de inoculação viral e em análises virológicas) desconhecem a designação do tratamento.

Os animais são tratados com uma única injeção intramuscular de 30 mg de acetato de depomedroxiprogesterona (Depo-Provera®). Após 30-33 dias, são sedados com telazol, colocados em inclinação ventral com os quadris elevados, e 4 ml de solução de inibidor em PBS, ou PBS sozinho é introduzido sem trauma na cúpula vaginal utilizando um cateter flexível francês. Este volume proporciona a cobertura mais efectiva das paredes da cúpula vaginal sem vazamentos indevidos. Os animais são desafiados 15 min depois com 300 TCID<sub>50</sub> de SVIH SF162 obtidos do Programa de Reagente de Referência e Pesquisa sobre SIDA do NIH (*NIH AIDS Research e Reference Reagent Program*) em 1 ml de meio RPMI 1640. O sangue é colectado em tubos com EDTA todas as semanas após o desafio. Os níveis virais no plasma são determinados pela quantificação de ARN SIV *gag* utilizando um ensaio de RT-PCR em tempo real, como descrito anteriormente [32]. O ensaio tem um limiar de sensibilidade de 60 cópias de ARN/ml com um co-eficiente de inter-ensaio

de variação de <25%. O status livre de infecção é definido como uma viremia no plasma consistentemente indetectável para todos das análises. A soroconversão é monitorizada por Western Blot utilizando o kit de Western Blot Zeptometrix SIV (Zeptometrix, Buffalo NI).

**REFERÊNCIAS**

1. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans 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 de Agosto de 1996;352(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 de abril de 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 de 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*. Janeiro de 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 USA*. 23 de Novembro de 2004;101(47):16460-5. Epub 15 de Novembro de 2004.
6. Hartley O, Dorgham 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. Junho de 2003;77(12):6637-44.

7. Documento 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., e 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; 3<sup>a</sup> edição (15 de Janeiro de 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 U S A. 23 de Agosto de 2005;102(34):11993-8. Epub 22 de Julho de 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 USA. 30 de Setembro de 2003;100(20):11672-7. Epub 12 de Setembro de 2003.

17. Lagenaur LA, Berger EA. An anti-HIV microbicide comes alive. *Proc Natl Acad Sci USA*. 30 de Agosto de 2005;102(35): 12294-5. Epub 23 de Agosto de 2005.
18. FDA (US Food and Drug Administration) web page. Inactive Ingredient Guide. 1996. <http://www.fda.gov/cder/drug/iig/default.htm>
19. Ash M e Ash I. Handbook of Pharmaceutical Additives. Synapse Information Resources. 2<sup>a</sup> edição. 2002. ISBN 1890595349.
20. Gennaro AR (ed.). Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott Williams & Wilkins. 21<sup>a</sup> edição. 3 de Julho de 2005. ISBN 0781763789.
21. Hardman JG, Limbird LE, Alfred G. Gilman AG. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill; 10<sup>a</sup> 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*. Setembro-Outubro de 1992;40(3-4): 180-93.
23. Wilken J, Hoover D, Thompson DA, Barlow PN, McSparron H, Picard L, Wlodawer A, Lubkowski J, Kent SB. Total chemical synthesis and high-resolution crystal structure of the potent anti-HIV protein AOP-RANTES. *Chem Biol*. Janeiro de 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*. Fevereiro de 2004;10(2):119-26.
26. Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alizon M. Identification of a chemokine receptor encoded by

human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. Science. 20 de Junho de 1997;276(5320):1874-8.

27. Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J. Y., Horuk, R., e Schall, T. J. Cell. 1993; 72: 415-425.

28. Daugherty, B. L., Siciliano, S. J., DeMartino, J. A., Malkowitz, L., Sirotina, A., e Springer, M. S. J Exp Med. 1996; 183: 2349-2354.

29. Torre VS, Marozsan AJ, Albright JL, Collins KR, Hartley O, Offord RE, Quinones-Mateu ME, Arts EJ. 2000. Variable sensitivity of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates to inhibition by RANTES analogs. J Virol 74: 4868-76.

30. Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, e R. Coico. 1999. Detection and analysis of HIV; isolation and quantitation of HIV in peripheral blood, alternate protocol: assessment of HIV titer using the Reed-Muench accumulative method, p. 12.2.5. In Current protocols in immunology, CD-ROM version. John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, N.I.

31. Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, e R. Coico. 1999. Detection and analysis of HIV; detection assays for HIV proteins, basic protocol: assay for HIV reverse transcriptase activity, p. 12.5.8. In Current protocols in immunology, CD-ROM version. John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, N.I.

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, Ghrayeb J, Bischofberger N, Nowak MA, Desrosiers RC, Wodarz D. 2001. Role of CD8 (+) lymphocytes in control of simian immunodeficiency virus infection and resistance to rechallenge after transient early antiretroviral treatment. J Virol 75: 10187-99.

33. Lederman MM, Veazey RS, Offord R, Mosier DE, Dufour J, Mefford M, Piatak M, Jr., Lifson JD, Salkowitz JR, Rodriguez B, Blauvelt A, Hartley O. 2004. Prevention of

vaginal SHIV transmission in rhesus macaques through inhibition of CCR5. Science 306: 485-7.

**LISTA DE SEQUÊNCIAS**

LISTA DE SEQUÊNCIAS

&lt;110&gt; THE MINTAKA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION

&lt;120&gt; Derivados de citocinas

&lt;130&gt; P043725WO

&lt;150&gt; GB0614755.7

&lt;151&gt; 25-06-2006

&lt;160&gt; 69

&lt;170&gt; SeqWin99, versão 1.02

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 59

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile  
Lys

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

Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser

50 55

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 2

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ala Leu Gln Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 3

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Trp	Met	Gln	Val
1				5				10	

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 4

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Trp	Leu	Gln	Val
1				5				10	

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 5

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Trp	Thr	Gln	Ser
1				5				10	

<210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<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> sintético

<400> 7

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Trp	Thr	Gln	Val
1				5				10	

<210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 8

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Trp	Met	Gln	Ser
1				5					10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 9

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ala	Thr	Gln	Ser
1				5					10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 10

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Trp	Leu	Gln	Ser
1				5					10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 11

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ala	Leu	Gln	Val
1				5					10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 12

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Trp	Leu	Gly	Gly
1				5					10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 13

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Trp	Arg	Gly	Ser
1				5					10

<210> 14

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 14

Gln	Gly	Pro	Leu	Leu	Met	Trp	Leu	Gln	Val
1				5					10

<210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 15

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Gln	Thr	Thr	Pro
1				5					10

<210> 16  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 16

Gln Gly Pro Pro Gly Asp Thr Val Leu Trp  
 1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 17

Gln Gly Pro Pro Gly Asp Ile Val Leu Ala  
 1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 18

Gln Gly Pro Pro Gly Ser Tyr Asp Tyr Ser  
 1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 19

Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Val
1				5					10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 20

Gln	Gly	Pro	Leu	Ser	Gly	Gln	Ser	Thr	Pro
1				5					10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 21

Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Asp	Trp	Leu	Gln	Val
1				5					10

<210> 22

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 22

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Phe	Gln	Ser
1				5					10

<210> 23  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 23

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Thr	Gln	Ser
1				5					10

<210> 24  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 24

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Gln Val

1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 25

Gly Gly Pro Pro Leu Met Gly Leu Gln Val

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 26

Gln Gly Pro Leu Ser Gly Trp Leu Gln Val

1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 27

Gly	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Val	Leu	Ala
1				5					10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 28

Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Ser	Trp	Ser	Ser	Val
1				5					10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 29

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Gly	Ser	Met	Gly	Pro
1				5					10

<210> 30  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 30

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Val
1				5				10	

<210> 31  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 31

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Ser
1				5				10	

<210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 32

Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Gln	Trp	Ser	Gln	Val
1				5					10

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 33

Gln	Gly	Pro	Pro	Met	Met	Ala	Gly	Leu	Ser
1				5					10

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 34

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Ser	Trp	Gln	Gln	Ser
1				5					10

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 35

Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Met	Trp	Ser	Gln	Ser
1				5					10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 36

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Gln	Trp	Arg	Gln	Ser
1				5					10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 37

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Gly	Thr	Gln	Ser
1				5					10

<210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 38

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Gln	Leu	Gln	Val
1				5					10

<210> 39  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 39

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Ser	Trp	Ser	Gln	Val
1				5					10

<210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 40

Gln Gly Pro Pro Met Ser Trp Ser Gln Ser

1 5 10

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 41

Gln Gly Pro Pro Leu Met Asn Leu Gln Val

1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 42

Gln Gly Pro Pro Met Ser Ala Tyr Gln Val

1 5 10

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 43

Gln	Gly	Pro	Pro	Met	Gln	Gly	Gly	Leu	Ser
1				5					10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 44

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Leu	Ala	Val
1				5					10

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 45

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Leu	Thr	Val
1				5					10

<210> 46

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 46

Gln	Gly	Pro	Leu	Ser	Gly	Trp	Ala	Gln	Val
1				5					10

<210> 47  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 47

Gln	Gly	Pro	Leu	Ser	Gln	Ser	Ser	Gln	Val
1				5					10

<210> 48  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 48

Gln	Gly	Pro	Leu	Ser	Ser	Gln	Ser	Gln	Val
1				5					10

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 49

Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Gln	Gln	Gly	Gln	Val
1				5					10

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 50

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Gln	Trp	Phe	Gln	Val
1				5					10

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

<223> sintético

<400> 51

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Gln	Trp	Thr	Gln	Val
1				5					10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 52

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ala	Leu	Ser	Val
1				5					10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 53

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Trp	Ser	Gln	Val
1				5					10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 54

Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Gln	Trp	Gly	Gln	Val
1				5					10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 55

Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Ser	Trp	Ser	Gln	Val
1				5					10

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 56

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Ser	Gln	Ser
1				5					10

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 57

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Gly	Leu	Ser	Val
1				5					10

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 58

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Thr	Leu	Gln	Val
1				5					10

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

<223> sintético

<400> 59

Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Gln	Trp	Tyr	Gln	Ser
1				5					10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 60

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Gln	Trp	Met	Gln	Ala
1				5					10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 61

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Gln	Trp	Met	Gln	Val
1				5					10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 62

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Thr Gln Val

1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 63

Gln Gly Pro Pro Leu Met Ser Leu Ser Val

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 64

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Leu	Gln	Ser
1				5					10

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 65

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Leu	Gln	Ala
1				5					10

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sintético

&lt;400&gt; 66

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Val	Gln	Ser
1				5					10

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

<223> sintético

<400> 67

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Ala	Gln	Ser
1				5					10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 68

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Gly	Gln	Ser
1				5					10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 69

Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Met	Ser	Gly	Gln	Val
1				5					10

**DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos referidos pelo requerente é para a conveniência do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação dos documentos, erros ou omissões não podem ser excluídos e o IEP não assume qualquer responsabilidade em relação a isso.

**Documentos de patente referidos na descrição**

- WO 03022884 A [0138]
- GB 0614755 A [0139]

**Literatura não relacionada com patentes referida na descrição**

- **Samson M; Libert F; Doranz BJ; Rucker J; Liesnard C; Farber CM; Saragosti S; Lapoumeroulie C; Cognaux J; Forceille C.** Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 22 de Agosto de 1996, vol. 352 (6593), 722-5 [0138]
- **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 de Abril de 1997, vol. 276 (5310), 276-9 [0138]
- **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 de 1999, vol. 73 (5), 3544-50 [0138]

- **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.*, Janeiro de 2001, vol. 75 (2), 661-71 [0138]
- **Hartley O; Gaertner H; Wilken J; Thompson D; Fish R; Ramos A; Pastore C; Dufour B; Cerini F; Melotti A.** Medicinal chemistry applied to a synthetic protein, development of highly potent HIV entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 15 de Novembro de 2004, vol. 101 (47), 16460-5 [0138]
- **Hartley O; Dorgham 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.*, Junho de 2003, vol. 77 (12), 6637-44 [0138]
- **Lloyd-Williams P; Albericio F; Giralt E.** Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. CRC Press, 1997 [0138]
- **Benoiton NL.** Chemistry of Peptide Synthesis. CRC Press, 2005 [0138]
- **Chan W; White P.** Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. Oxford University Press, 2000 [0138]
- **Kullmann W.** Enzymatic Peptide Synthesis. CRC Press, 1987 [0138]
- **Ibba M.** Strategies for in vitro and in vivo translation with non-natural amino acids. *Biotechnol Genet Eng Rev.*, 1996, vol. 13, 197-216 [0138]
- **Proudfoot, A. E.; Power, C. A.; Hoogewerf, A. J.; Montjovent, M. O.; Borlat, F.; Offord, R. E.; Wells, T. N.** *J Biol Chem.* 1996, vol. 271, 2599-2603 [0138]
- **Sambrook J; Russell DW.** Molecular Cloning, A

- Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15 de Janeiro de 2001 [0138]
- **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 U S A.*, 22 de Julho de 2005, vol. 102 (34), 11993-8 [0138]
  - **Chang TL; Chang CH; Simpson DA; Xu Q; Martin PK; Lagenaur LA; Schoolnik GK; Ho DD; Hillier SL; Holodniy M.** Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 12 de Setembro de 2003, vol. 100 (20), 11672-7 [0138]
  - **Lagenaur LA; Berger EA.** An anti-HIV microbicide comes alive. *Proc Natl Acad Sci USA.* 3 de Agosto de 2005, vol. 102 (35), 12294-5 [0138]
  - **Ash M; Ash I.** Handbook of Pharmaceutical Additives. Synapse Information Resources. 2002 [0138]
  - **Remington: The Science and Practice of Pharmacy.** Lippincott Williams & Wilkins, 3 de Julho de 2005 [0138]
  - **Hardman JG; Limbird LE; Alfred G. Gilman AG.** Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, 13 de Agosto de 2001 [0138]
  - **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.*, Setembro de 1992, vol. 40 (3-4), 180-93 [0138]
  - **Wilken J; Hoover D; Thompson DA; Barlow PN; McSparron H; Picard L; Wlodawer A; Lubkowski J;**

- Kent SB.** Total chemical synthesis and high-resolution crystal structure of the potent anti-HIV protein AOP-RANTES. *Chem Biol.*, Janeiro de 1999, vol. 6 (1), 43-51 [0138]
- **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, vol. 143 (11), 2109-31 [0138]
  - **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.*, Fevereiro de 2004 vol. 10 (2), 119-26 [0138]
  - **Pleskoff O; Treboute C; Brelot A; Heveker N; Seman M; Alizon M.** Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science.*, 20 de Junho de 1997, vol. 276 (5320), 1874-8 [0138]
  - **Neote, K.; DiGregorio, D.; Mak, J. Y.; Horuk, R.; Schall, T. J.** *Cell.* 1993, vol. 72, 415-425 [0138]
  - **Daugherty, B. L.; Siciliano, S. J.; DeMartino, J. A.; Malkowitz, L.; Sirotina, A.; Springer, M. S.** *J Exp Med.* 1996, vol. 183, 2349-2354 [0138]
  - **Torre VS; Marozsan AJ; Albright JL; Collins KR; Hartley O; Offord RE; Quinones-Mateu ME; Arts EJ.** Variable sensitivity of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates to inhibition by RANTES analogs. *J Virol*, 2000, vol. 74, 4868-76 [0138]
  - 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.

- Coligan, J. E.; A. M. Kruisbeek; D. H. Margulies; E. M. Shevach; W. Strober; R. Coico.** Current protocols in immunology. John Wiley & Sons, Inc, 1999, 12.2.5 [0138]
- Detection and analysis of HIV; detection assays for HIV proteins; basic protocol: assay for HIV reverse transcriptase activity. **Coligan, J. E.; A. M. Kruisbeek; D. H. Margulies; E. M. Shevach; W. Strober; R. Coico.** Current protocols in immunology. John Wiley & Sons, Inc, 1999, 12.5.8 [0138]
  - **Lifson JD; Rossio JL; Piatak M; Jr.; Parks T; Li L; Kiser R; Coalter V; Fisher B; Flynn BM; Czajak S.** Role of CD8(+) lymphocytes in control of simian immunodeficiency virus infection and resistance to rechallenge after transient early antiretroviral treatment. *J Virol*, 2001, vol. 75, 10187-99 [0138]
  - **Lederman MM; Veazey RS; Offord R; Mosier DE; Dufour J; Mefford M; Piatak M; Jr.; Lifson JD; Salkowitz JR; Rodriguez B.** Prevention of vaginal SHIV transmission in rhesus macaques through inhibition of CCR5. *Science*, 2004, vol. 306, 485-7 [0138]

**REIVINDICAÇÕES**

1. Um polipéptido que compreende uma porção N-terminal e uma porção C-terminal, em que a dita porção N-terminal compreende a sequência assinatura QGP[P ou L] e a sequência de aminoácidos da dita porção C-terminal é pelo menos 70% idêntica a SEQ ID NO: 1.
2. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência assinatura é QGP[P ou L][L ou G ou S ou M][M ou D ou S ou Q ou G].
3. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência assinatura é QGP[P ou L][L ou G][M ou D ou S].
4. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência 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, em que X denota qualquer aminoácido natural ou modificado.
5. Um polipéptido de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência assinatura é QGP[P ou L][L ou G][M ou D ou S]XX[Q ou G ou L]X, em que X denota qualquer aminoácido natural ou modificado.
6. Um polipéptido de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para utilização como um medicamento.
7. Uma molécula de ácido nucleico que compreende um ou mais segmentos/sequências que codificam os polipéptidos das reivindicações 1 a 6.
8. Um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 7, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para utilização como um medicamento.

**9.** Uma célula hospedeira que compreende um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 8.

**10.** Uma composição farmacêutica que compreende um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo; um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 8 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo; ou a célula hospedeira da reivindicação 9.

**11.** Um polipéptido como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 8 ou uma célula hospedeira como definido na reivindicação 9 para utilização no tratamento ou na prevenção de infecções por VIH, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), ou transmissão do VIH.

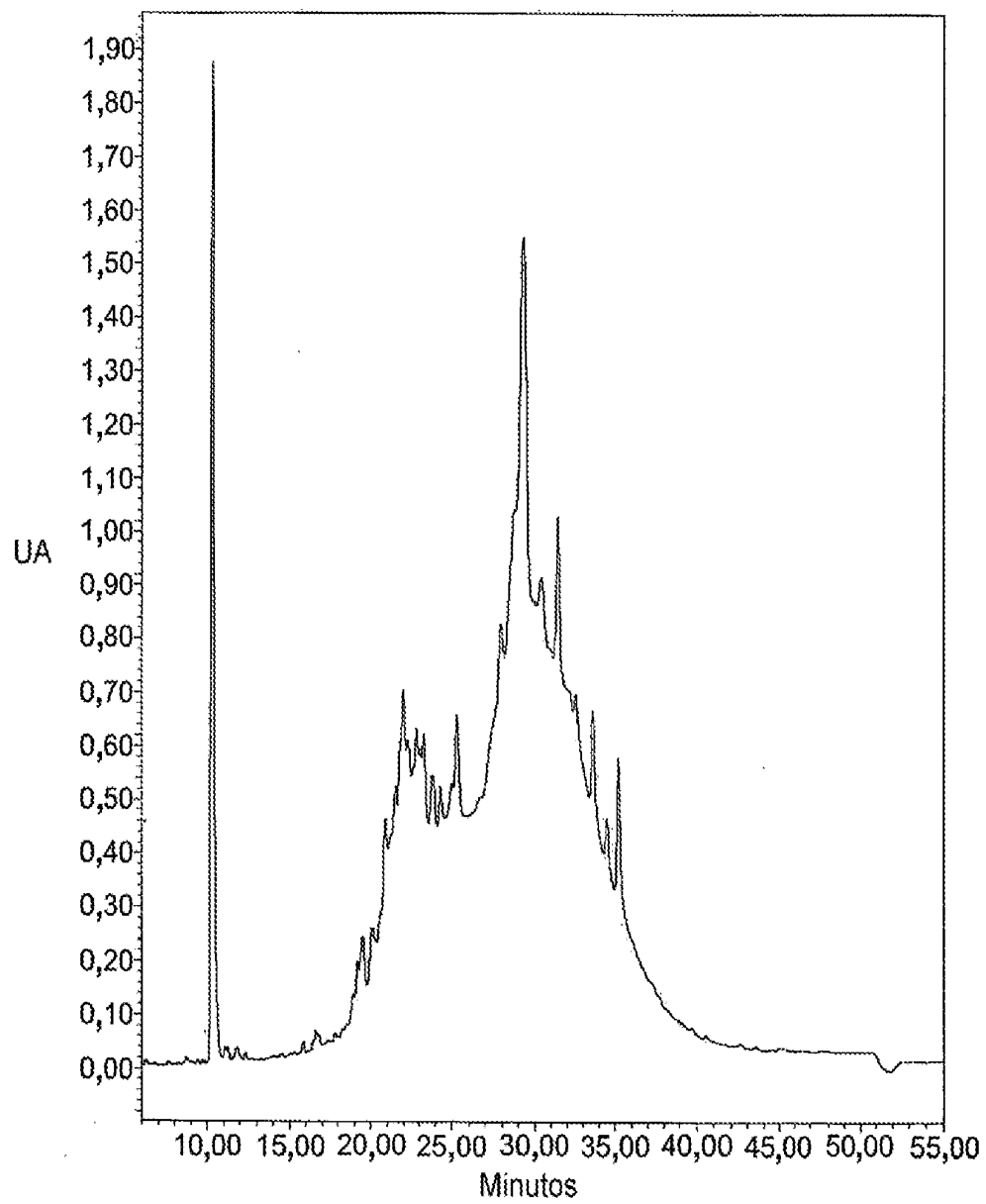
**12.** Utilização de um polipéptido como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 8 ou uma célula hospedeira como definido na reivindicação 9 para o fabrico de um medicamento para tratar ou prevenir infecções por VIH, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), ou a transmissão de VIH.

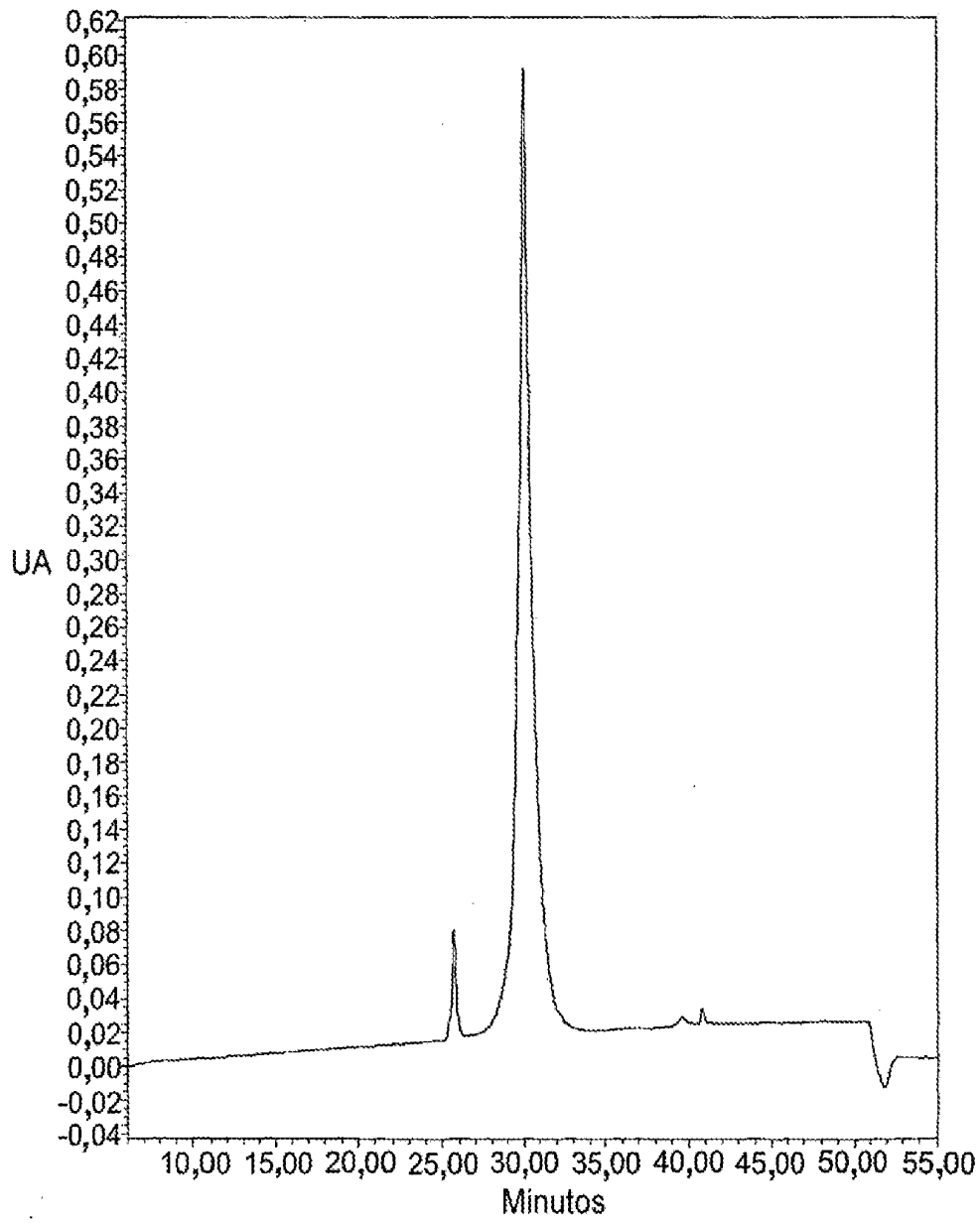
**13.** Um polipéptido como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 8 ou uma célula hospedeira como definido na reivindicação 9 para utilização no tratamento ou na prevenção de inflamação, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, infecções bacterianas e virais, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide, ateroma ou arteriosclerose, asma, rinite alérgica ou

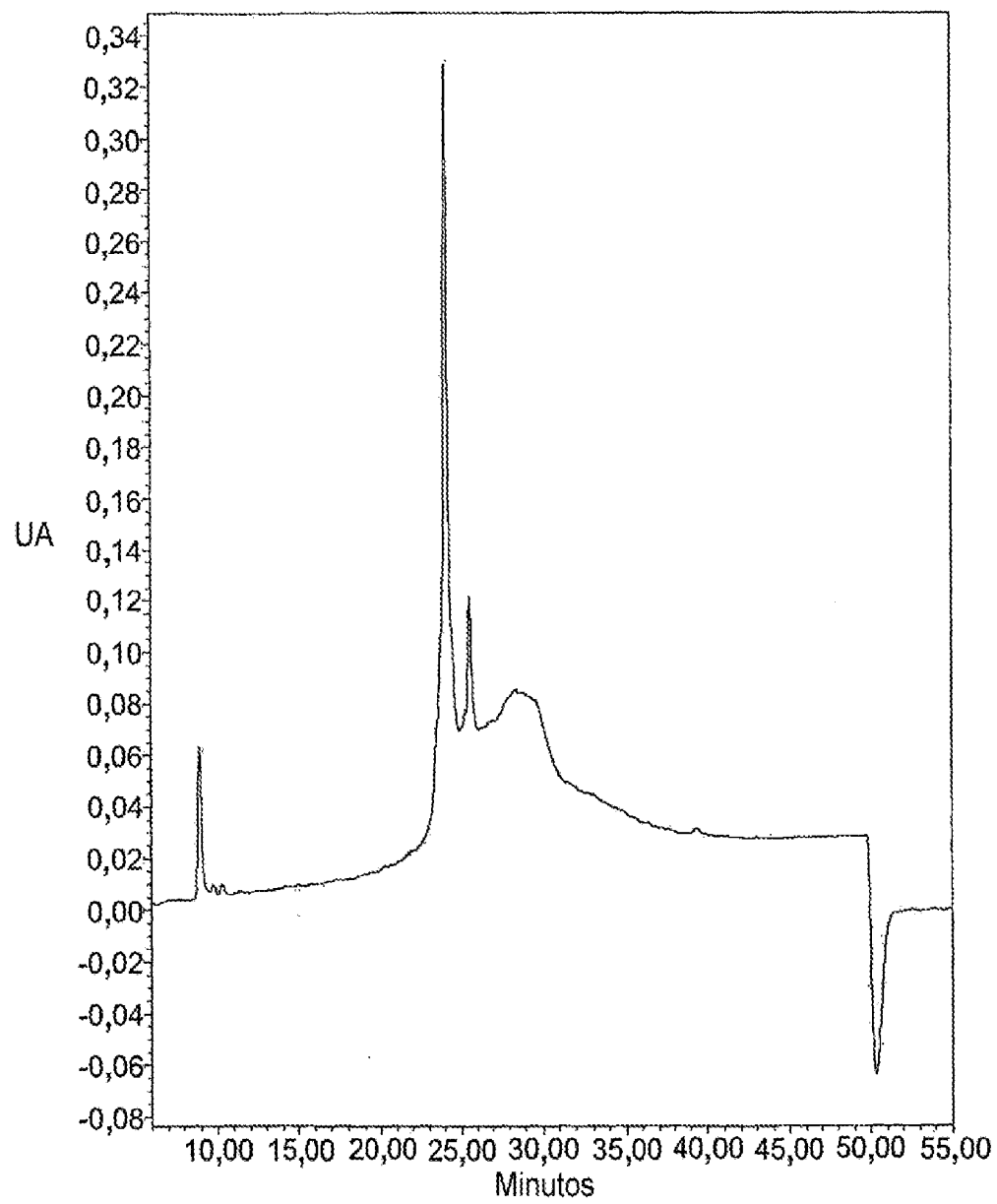
dermatite atópica, a rejeição de órgãos, tecidos ou células transplantados, esclerose múltipla e/ou outras doenças desmielinizantes, neuropatia periférica, doenças malignas, cancros ou cancros metastáticos.

**14.** Utilização de um polipéptido como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 8 ou uma célula hospedeira como definido na reivindicação 9 para o fabrico de um medicamento para tratar ou prevenir a inflamação, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, infecções bacterianas e virais, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide, ateroma ou arteriosclerose, 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, cancros ou cancros metastáticos.

**15.** Kit que compreende um polipéptido como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 8, ou uma célula hospedeira como definido na reivindicação 9.

**FIG. 1A**

**FIG. 1B**

**FIG. 1C**

**FIG. 1D**