

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 317 749**

21 Número de solicitud: 200601934

51 Int. Cl.:

C07K 14/035 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C12N 15/38 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **20.07.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2009**

Fecha de la concesión: **28.01.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **19.02.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
19.02.2010

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Viejo Borbolla, Abel y
Alcami Pertejo, Antonio**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Uso de un compuesto proteico derivado de la glicoproteína (gG) de HSV para la elaboración de una composición farmacéutica útil para la inducción de migración celular mediada por quimioquinas.**

57 Resumen:

Uso de un compuesto proteico derivado de la glicoproteína (gG) de HSV para la elaboración de una composición farmacéutica útil para la inducción de migración celular mediada por quimioquinas.

La invención describe el uso de un compuesto proteico derivado de la glicoproteína (gG) de HSV (HSV-1 y HSV-2) inductor de la migración celular mediada por quimioquina para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o desorden causada por un déficit de la migración celular, preferentemente del sistema inmune. Además, forman parte de la invención composiciones terapéuticas que comprenden dichos compuestos y sus aplicaciones terapéuticas.

ES 2 317 749 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de un compuesto proteico derivado de la glicoproteína (gG) de HSV para la elaboración de una composición farmacéutica útil para la inducción de migración celular mediada por quimioquinas.

5 **Sector de la técnica**

10 Biomedicina y biotecnología. Desarrollo de principios terapéuticos activos. Desarrollo de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas que cursan con alteraciones de la migración de células del sistema inmune.

Estado de la técnica

15 Durante la evolución, los virus han desarrollado numerosas estrategias para modular el sistema inmune. Entre ellas se encuentra la de inhibir la función de las quimioquinas. Las quimioquinas son una familia de citoquinas básicas de 8-10 kDa que inducen la migración de leucocitos y la infiltración de tejidos infectados o dañados (Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392: 565-568) jugando un papel fundamental en la defensa contra patógenos y en las enfermedades inflamatorias. Las quimioquinas se localizan en la superficie celular mediante su interacción con glicosaminoglicanos (GAGs), interacción necesaria para la presentación correcta de las quimioquinas a los leucocitos
20 y su función *in vivo* (Cinamon, G., Shinder, V. and Alon, R. (2001) Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat. Immunol.* 2: 515-522; Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003) Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the *in vivo* activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 1885-1890; Rot, A. (1992) Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol. Today*, 13: 291-294). El sistema de las quimioquinas es complejo, con más de 50 quimioquinas humanas identificadas clasificadas en cuatro clases (C, CC, CXC y CX3C) y alrededor de 20 receptores. El papel crítico de las quimioquinas en la defensa anti-viral y en la respuesta inmune en general se refleja en el descubrimiento de muchos mecanismos virales para modular la actividad de las quimioquinas (Alcami A. (2003). Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 36-50; Alcami, A., Symons, J.A., Collins, P.D., Williams, T.J. and Smith, G.L. (1998) Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J. Immunol.*, 160: 624-633; Lalani, A.S., Barrett, J.W. and McFadden, G. (2000) Modulating chemokines: more lessons from viruses. *Immunol. Today*, 21: 100-106; Lalani, A.S., Graham, K., Mossman, K., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., Kelvin, D. and McFadden, G. (1997) The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *J. Virol.* 71: 4356-4363; Murphy, P.M. (2001) Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat. Immunol.*, 2: 116-122; van Berkel, V., Barrett, J., Tiffany, H.L., Fremont, D.H., Murphy, P.M., McFadden, G., Speck, S.H. and Virgin, H.I. (2000) Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action. *J. Virol.*, 74: 6741-6747). Tanto poxviruses como herpesviruses codifican para proteínas secretadas con capacidad de unión e inhibición de las quimioquinas (viral chemokine-binding protein, vCKBP). Las vCKBPs no poseen homología de secuencia con los receptores celulares de quimioquinas o entre sí, por lo que cada una representa una nueva estructura capaz de unir quimioquinas (Lalani, A.S., Barrett, J.W. and McFadden, G. (2000) Modulating chemokines: more lessons from viruses. *Immunol. Today*, 21: 100-106; Murphy, P.M. (2001) Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat. Immunol.*, 2: 116-122).

45 La glicoproteína G (gG) presente en algunos herpesvirus alfa tiene esa capacidad (Bryant, N.A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., and Alcami, A. (2003) Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J.*, 22: 833-846; Costes B, Ruiz-Arguello MB, Bryant NA, Alcami A, Vanderplasschen A. (2005) Both soluble and membrane-anchored forms of Felid herpesvirus 1 glycoprotein G function as a broad-spectrum chemokine-binding protein. *J. Gen. Virol.* 86: 3209-3214). Los miembros de la subfamilia herpesvirus alpha tienen un rango de hospedador variable y la capacidad de establecer infecciones latentes de forma primaria pero no exclusiva en ganglios sensoriales (Roizman, B. and Pellet, P.E. (2001) The family herpesviridae: and introduction. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Vol. 2, pp. 2381-2397). Esta subfamilia incluye patógenos animales como los herpesvirus equino 1 y 3 (EHV-1 y EHV-3) y los herpesvirus bovino 1 y 5 (BHV-1 y BHV-5) y patógenos humanos como HSV-1 y HSV-2, que replican en mucosa oral y genital y el virus varicela zoster (VZV). Algunas de las glicoproteínas de los herpesvirus alfa presentes en la partícula viral juegan un papel fundamental en la morfogénesis viral, unión a la célula y tropismo celular. La función de la glicoproteína G (gG), sin embargo, se desconocía hasta que se descubrió que la gG codificada por los herpesvirus alfa constituye una nueva familia de proteínas virales con capacidad de unión a quimioquinas (Bryant, N.A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., and Alcami, A. (2003) Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J.*, 22: 833-846). La gG de EHV-1, EHV-3, BHV-1 y BHV-5 tiene actividad de unión a un amplio abanico de quimioquinas con alta afinidad, inhibe la interacción de quimioquinas con los receptores celulares y su actividad de inducir migración celular, a pesar de carecer de similitud de secuencia con los receptores de quimioquinas celulares. Debido a que las quimioquinas juegan un papel crítico en la activación de la respuesta inflamatoria, induciendo la migración de las células inmunes a los tejidos infectados o dañados, la capacidad de gG de inhibir quimioquinas postuló el papel antiinflamatorio de la gG. Sin embargo, no se observó tal actividad en la gG de HSV-1 y HSV-2 -que tiene muy baja similitud de secuencia con las gG de los virus equinos y bovinos- con las quimioquinas usadas en esta invención (CCL1, CCL2, CCL11, CCL17, CCL20, CXCL1, CXCL10, CXCL21, CX3CL1 (ver más adelante en la presente invención; Bryant *et al.*, 2003). En

este sentido, recientemente se ha demostrado que la gG del herpesvirus felino es capaz de unir quimioquinas (B. Costes, M. B. Ruiz-Argüello, N. A. Bryant, A. Alcami and A. Vanderplasschen. 2005. Both soluble and membrane-anchored forms of feline herpesvirus 1 glycoprotein G function as a broad spectrum chemokine binding protein. J. Gen. Virol. 86, 3209-3214).

5 Tanto HSV-1 como HSV-2 son importantes patógenos humanos. HSV-1 infecta y replica, por lo general, en la mucosa oro-labial y ocular. HSV-2 replica en la mucosa genital. Los virus herpes simplex 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) son patógenos humanos con una alta prevalencia en la población, de tal forma que HSV-1 en adultos se encuentra entre el 60 y el 90% dependiendo de la zona geográfica del mundo. La reactivación de ambos virus ocasiona la producción de partículas virales con la aparición de lesiones que tienen un gran impacto clínico. HSV-1 es el causante de queratitis en la córnea que puede ocasionar ceguera, meningitis y es la principal causa viral de encefalitis debido a su carácter neurotrópico. Tanto HSV-1 como HSV-2 pueden causar encefalitis si la infección tiene lugar en sistema nervioso central. La encefalitis herpética es un proceso encefálico focal localizado en las zonas frontotemporal y parietal del cerebro. La encefalitis subaguda asociada con HSV ha sido identificada en el 2% de los casos estudiados en pacientes con síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). HSV supone un riesgo para los neonatos ya que la infección durante el tercer trimestre de gestación y/o el parto puede dar lugar a enfermedad diseminada, fallo de múltiples órganos, incluyendo el sistema nervioso central, y muerte del feto o neonato. En ausencia de una terapia antiviral específica la mortalidad supera el 80% en la enfermedad diseminada y el 50% en aquellos pacientes que presentan síntomas únicamente en el CNS. La mayoría de los recién nacidos infectados desarrolla trastornos neurológicos. Un nuevo aspecto de la patología de HSV que ha adquirido especial relevancia en los últimos años es la asociación de infecciones de HSV con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Por desgracia, los mecanismos empleados por HSV-1 y HSV-2 en la modulación y evasión del sistema inmune, determinantes de la patogénesis viral, son poco conocidos por lo que su comprensión puede permitir desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas.

25 Descripción de la invención

Descripción breve

30 Un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto proteico derivado de la glicoproteína (gG) de HSV inductor de la actividad quimioquina, en adelante uso de una proteína gG de la presente invención, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o desorden causada por un déficit de la migración celular mediada por quimioquinas.

35 Una realización particular de la invención lo constituye el uso de la proteína gG donde el uso comprende el uso de una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la gG de HSV, ya sea la forma gG de HSV-1 o de HSV-2,
- 40 b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- 45 d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

Otro objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos caracterizada porque es un fragmento extracelular del gen gG de HSV-1 constituido, preferentemente, por la SEQ ID NO1, que codifica para la forma gG-1s del HSV-1 o por la SEQ ID NO3, que codifica para la forma gG-2s del HSV-2 (Ejemplo 1).

50 Otro objeto de la presente invención lo constituye un péptido o proteína derivada o fragmento de las gG de HSV, ya sean del tipo HSV-1 o HSV-2, inductora de la migración celular mediada por quimioquinas. Otra realización particular de la invención lo constituye una proteína fragmento extracelular de la gG de HSV-1 constituido, preferentemente, por la SEQ ID NO2, forma proteica gG-1s del HSV-1 o por la SEQ ID NO4, forma proteica gG-2s del HSV-2 (Ejemplo 1).

55 Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías causadas o asociadas con un déficit de la migración celular mediada por quimioquinas, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto proteico inductor de la migración celular mediada por quimioquina de la invención, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido gG pertenece al siguiente grupo:

- 65 a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la gG de HSV, ya sea la forma gG de HSV-1 o de HSV-2,

- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- 5 d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología que cursa con alteraciones en la migración celular mediada por quimioquinas consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita la recuperación de la capacidad de migración celular, preferentemente de células del sistema inmune.

Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de compuestos útiles para el tratamiento de infecciones provocadas por HSV caracterizado porque se utiliza la proteína gG de HSV o un fragmento extracelular de la misma, ya sea de tipo HSV-1 o HSV-1, como diana terapéutica.

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que la glicoproteína (gG) de los virus humanos HSV-1 y HSV-2, de gran relevancia clínica, se une a quimioquinas humanas con alta afinidad, con una especificidad diferente a la descrita previamente para otras gGs (Ejemplo 1). Además, en contra de lo que se describía anteriormente en el caso de las gG de los herpesvirus alpha equinos, bovinos o felinos, sorprendentemente, la gG de HSV-1 y HSV-2 aumentan la capacidad de las quimioquinas de inducir migración de células del sistema inmune, en lugar de inhibir la actividad de las quimioquinas, ya sea de linfocitos T o monocitos (ver Ejemplo 2).

Por otro lado, se ha demostrado que la capacidad de unión de las gG solubles (gGs) en membranas de células infectadas es mayor con la gG de HSV-1 que con la HSV-2, indicando que el dominio de unión a quimioquinas se encuentra en la región extracelular de la gG, que se procesa proteolíticamente y se secreta al medio (ejemplo 1.3). Además, se ha demostrado que la interacción entre la gG y las quimioquinas tiene lugar a través del dominio de unión a los glicosaminoglicanos de las quimioquinas (Ejemplo 1.4).

Por otro lado, es probable que la capacidad de unir quimioquinas y de aumentar su función juegue un papel fundamental en el ciclo viral y en la patogénesis mediada por HSV. Esta hipótesis está apoyada en dos hechos:

- (I) las quimioquinas a las que se une la gG están presentes en los tejidos donde se desarrolla el ciclo replicativo y la latencia de HSV (las mucosas y el sistema nervioso central),
- (II) la capacidad de unir quimioquinas que tiene la gG presente en la membrana de las células infectadas y en el virión (Ejemplo 1.3). Este último dato sugiere que la interacción de la gG con las quimioquinas puede jugar un papel importante en los estadios iniciales de la infección.

Hay que destacar que es la primera vez que se describe una proteína viral secretada con capacidad de activar la función de las quimioquinas. Estos resultados abren la posibilidad de desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas para distintas enfermedades y patologías humanas. En primer lugar, los resultados descritos en la presente invención permiten postular la posibilidad de utilizar la gG, preferentemente sus formas solubles, de HSV (HSV-1 y HSV-2) como compuesto farmacéutico para tratar procesos o enfermedades que requieran la migración de células del sistema inmune. Hay que tener en cuenta que la migración de células del sistema inmune y la infiltración de tejidos infectados o dañados juega un papel esencial en la defensa contra patógenos y en las enfermedades inflamatorias.

Es por tanto posible pensar que se podría utilizar esta misma proteína gG de HSV para inducir la migración celular, preferentemente de células del sistema inmune, mediada por quimioquinas mediante la aplicación terapéutica de gG o sus fragmentos extracelulares ya fuera en su forma de proteína. Esto se podría conseguir utilizando la proteína o péptido como un compuesto activo terapéutico a aplicar directamente a un paciente.

En segundo lugar, la potenciación de la función de las quimioquinas mediada por gG puede tener un gran efecto en la patogénesis de HSV debido a la presencia de un mayor infiltrado celular y la consiguiente inflamación. El diseño y la generación de compuestos que inhiban la función de la gG permitiría su uso como terapia para tratar las enfermedades infecciosas causadas por HSV, ya sea el HSV-1 o el HSV-2.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto proteico derivado de la glicoproteína (gG) de HSV inductor de la actividad quimioquina, en adelante uso de una proteína gG de la presente invención, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o desorden causada por un déficit de la migración celular mediada por quimioquinas o que se pueden tratar mediante el uso de quimioquinas *in vivo* o *ex vivo*.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto proteico derivado de la glicoproteína (gG) de HSV inductor de la actividad quimioquina” se refiere a una molécula proteica que mimetiza, incrementa la intensidad o prolonga la duración de la actividad inductora de la migración celular de una quimioquina pudiendo estar constituida

ES 2 317 749 B1

por la secuencia completa de la proteína gG o un fragmento de la misma. Como se ha comentado anteriormente el sistema de las quimioquinas es complejo, con más de 50 quimioquinas humanas identificadas clasificadas en cuatro clases (C, CC, CXC y CX3C) y alrededor de 20 receptores. En cuanto se refiere a esta patente el término “quimioquina” se refiere a una quimioquina humana, perteneciente a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: CCL22, CCL26, CCL25, CCL28, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12- α , CXCL12- β , CXCL13, CXCL14 y XCL1.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “HSV” se refiere a un virus herpes humano, ya sea un herpes virus tipo 1 (HSV-1) o tipo 2 (HSV-2) (van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carsten, E.B., Estes, M.K. *et al.*, Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses).

Tal como se utiliza en la presente invención el término “enfermedad causada por un déficit de la migración mediada por quimioquinas o que se pueden tratar mediante el uso de quimioquinas *in vivo* o *ex vivo*” se refiere a una enfermedad, desorden o patología perteneciente, entre otras a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: cardiomeopatía isquémica, terapia post-infarto con células de la médula espinal, síndromes coronarios agudos, carcinoma, carcinoma espontáneo bronquio-alveolar o fiebre crónica Q.

Una realización particular de la invención lo constituye el uso de la proteína gG que comprende el uso de una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la gG de HSV, ya sea la forma gG de HSV-1 o de HSV-2,
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia mostrada en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más aminoácidos, la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más aminoácidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que mimetice la capacidad inductora de la migración celular de una quimioquina observada en la proteína gG de HSV en la presente invención. Las formas análogas incluyen las formas de gG de las distintas cepas HSV-1 ó HSV-2 existentes en la naturaleza.

Las gG de HSV-1 y de HSV-2 (gG-1 y gG-2, respectivamente) se encuentran expresadas en la membrana de las células infectadas y también en la envuelta lipídica de la partícula viral (Figura 1A). A partir de la información descrita en la presente invención (Figura 1B) y en el estado de la técnica un técnico experto en el sector de la técnica puede aislar o construir una secuencia de nucleótidos análoga a las descritas en la presente invención para su posterior utilización.

En general, una secuencia de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 30%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la invención en el que la molécula activadora es una proteína gG cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la proteína gG de HSV-1 (número de acceso X14112; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la invención en el que la molécula activadora es una proteína gG cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la proteína gG de HSV-2 (número de acceso Z86099; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto activador de la invención donde la secuencia de aminoácidos de c) es un fragmento constituido por la SEQ ID NO2, que representa la forma gG-1s del HSV-1.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto activador de la invención donde la secuencia de aminoácidos de c) es un fragmento constituido por la SEQ ID NO4, que representa para la forma gG-2s del HSV-2.

Las secuencias de nucleótidos, fragmentos de las secuencias de los genes gG de HSV-1 y HSV-2, construidas en la presente invención o fragmentos similares de estas gG y que no existen en la naturaleza pueden utilizarse como herramientas de biología molecular para la expresión de las proteínas correspondientes. Estas secuencias de nucleó-

ES 2 317 749 B1

tidos “gG”, la construcción genética y los vectores de expresión que las contienen descritos en la invención pueden aislarse y obtenerse por un experto mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook *et al.* “Molecular cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Sping Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 vol 1-3).

Así, otro objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos caracterizada porque es un fragmento extracelular del gen gG de HSV-1 constituido, preferentemente, por la SEQ ID NO1, que codifica para la forma gG-1s del HSV-1 o por la SEQ ID NO3, que codifica para la forma gG-2s del HSV-2 (Ejemplo 1).

Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar integradas en un vector de expresión génica que permite la regulación de la expresión recombinante de la misma en condiciones adecuadas para la producción de los péptidos o proteínas correspondientes que son un principio activo farmacéutico. El uso de dichas secuencia fragmentos de HSV-1 y HSV-2 para la elaboración de herramientas biotecnológicas y para producir dichas proteínas forman parte de la presente invención.

En general, un vector de expresión gG comprende, además de la secuencia de nucleótidos gG ó de la construcción genética gG descritos en la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, *pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *pBAD*, *ret*, etc.), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (*tlt2*, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión, vectores virales (DNA o RNA), cósmidos, cromosomas artificiales, etc. que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la célula huésped y del tipo de uso que se quiera realizar. Por tanto, según un modo de realización particular de la presente invención dicho vector es un plásmido o un vector viral. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia al igual que para la transformación de microorganismos y células eucariotas se pueden utilizar diferentes métodos ampliamente conocidas -transformación química, electroporación, microinyección, etc.- descritos en diversos manuales [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.]. Una estrategia podría ser la de utilizar lentivirus para infectar las células diana, tal y como ya esta siendo intentado en otro tipo de terapias (Ralph GS, Binley K, Wong LF, Azzouz M, Mazarakis ND (2006) *Gene therapy for neurodegenerative and ocular diseases using lentiviral vectors*. *Clin Sci (Lond)* 110: 37-46). Un ejemplo de una realización particular lo constituye los vectores de expresión elaborados en la presente invención: vectores de baculovirus (pFastBac, Invitrogen) incluyendo como inserto el péptido señal de la melitina seguido de un tag de histidinas y un fragmento de la gG-1s o gG-2s.

Por tanto, otro objeto de la presente invención lo constituye un péptido o proteína derivada o fragmento de las gG de HSV, ya sean del tipo HSV-1 o HSV-2, inductora de la migración celular mediada por quimioquinas. Otra realización particular de la invención lo constituye una proteína fragmento extracelular de la gG de HSV-1 constituido, preferentemente, por la SEQ ID NO2, forma proteica gG-1s del HSV-1 o por la SEQ ID NO4, forma proteica gG-2s del HSV-2 (Ejemplo 1).

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías causadas o asociadas con un déficit de la migración celular mediada por quimioquinas, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto proteico inductor de la migración celular mediada por quimioquina de la invención, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar axones de las neuronas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

ES 2 317 749 B1

Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido gG pertenece al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la gG de HSV, ya sea la forma gG de HSV-1 o de HSV-2,
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos es una proteína gG cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la proteína gG de HSV-1.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos es una proteína gG cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la proteína gG de HSV-2.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos es una proteína gG cuya secuencia de aminoácidos de c) es un fragmento constituido por la SEQ ID NO2, que representa la forma gG-1s del HSV-1.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos es una proteína gG cuya secuencia de aminoácidos de c) es un fragmento constituido por la SEQ ID NO4, que representa la forma gG-1s del HSV-2.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología que cursa con alteraciones en la migración celular mediada por quimioquinas o que se pueden tratar mediante el uso de quimioquinas *in vivo* o *ex vivo* consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita la recuperación de la capacidad de migración celular, preferentemente de células del sistema inmune.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica en el que la enfermedad con alteraciones en la migración celular pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: cardiomeopatía isquémica, terapia post-infarto con células de la médula espinal, síndromes coronarios agudos, carcinoma, carcinoma espontáneo bronquial-alveolar o fiebre crónica Q.

La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de compuestos útiles para el tratamiento de infecciones provocadas por HSV caracterizado porque se utiliza la proteína gG de HSV o un fragmento extracelular de la misma, ya sea de tipo HSV-1 o HSV-2, como diana terapéutica.

Descripción de las figuras

Figura 1: (A) *Representación mostrando la localización de la gG-1 y gG-2 en el virión y en la membrana plasmática.* La gG-2 también se secreta al medio extracelular después de un procesamiento proteolítico. (B) Esquema de las construcciones utilizadas en esta invención. Se muestran los dominios proteicos de la gG-1 y gG-2 y las regiones de ambas proteínas clonadas, incluyendo la sustitución del péptido señal putativo de la gG por el de la melitina y la incorporación del tag de histidina.

Figura 2: *Expresión y purificación de gG-1s y gG-2s.* (A) Purificación de gG-1s y gG-2s mediante cromatografía de afinidad. Se muestran las fracciones eluidas con imidazol. La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante una tinción con Coomassie. (B) Detección de gG-1s y gG-2s purificadas por cromatografía de afinidad mediante Western blot (WB).

Figura 3: *Histograma mostrando la quimioquinas que se unen a gG-1s y gG-2s.* La leyenda indica la quimioquina inyectada en el Biacore. El aumento de las unidades relativas (R.U.) indica la existencia de una interacción entre la gG y la quimioquina inyectada.

Figura 4: *Ensayos de entrecruzamiento químico mostrando la interacción entre gG-1s y gG-2s con ¹²⁵I-CXCL10 (A) y ¹²⁵I-CCL25 (B).* La quimioquina marcada con ¹²⁵I se incubó durante 30 minutos con la gG. Posteriormente se añadió el entrecruzador BS3. La presencia de un complejo de menor movilidad que el de la quimioquina libre en los

carriles donde se cargaron las muestras conteniendo gG indica la interacción entre la gG y la quimioquina. Las flechas muestran la posición del complejo gG/quimioquina en el gel.

Figura 5: *La gG presente en el virión y en las células infectadas une quimioquinas.* (A) Ensayo de *entrecruzamiento químico* con ^{125}I -CXCL12- α y partículas virales obtenidas de células infectadas con HSV-1 salvaje (wt), HSV-1- ΔgG . La presencia de un complejo de menor movilidad sólo se observa cuando la ^{125}I -CXCL12- α se incubó con los viriones de HSV-1 salvaje (wt) pero no con los de HSV-1- ΔgG , demostrando que la gG presente en la partícula viral interacciona con quimioquinas. (B) Western blot mostrando la ausencia de expresión de gG en las partículas virales de HSV-1- ΔgG (panel superior). Western blot mostrando que tanto HSV-1 salvaje (wt) como HSV-1- ΔgG expresan de manera similar otras proteínas virales (panel inferior). (C) La gG presente en la superficie de las células infectadas une quimioquinas. Gráfica mostrando la cantidad de ^{125}I -CXCL10 unida a células sin infectar o infectadas con HSV-1 salvaje (wt), HSV-1- ΔgG y HSV-2 salvaje (wt). Las células infectadas con HSV-1 salvaje (wt) y HSV-2 salvaje (wt) unen más ^{125}I -CXCL10 que las células sin infectar o las infectadas con HSV-1- ΔgG .

Figura 6: *La interacción entre la gG y las quimioquinas tiene lugar a través del sitio de unión a heparina.* Histograma mostrando el efecto que tiene la heparina en la unión de quimioquinas a la gG. Concentraciones crecientes de heparina reducen la unión de CXCL12- α a gG-1s y de CXCL12- β a gG-2s.

Figura 7: *La gG induce la migración de células T (MOLT-4) y de monocitos (MonoMac) mediada por quimioquinas.* (A) Concentraciones crecientes de gG-1s y de gG-2s incrementan la migración mediada por hCXCL12- β , mientras que la gG-1s o la gG-2s no son capaces de inducir la migración celular. La gG de BHV-5 inhibe la migración celular. (B) El incremento en la migración celular mediada por quimioquinas sólo se aprecia cuando la quimioquina interacciona con la gG. 1:50 gG indica una relación molar 1:50 entre la quimioquina y la gG. 1:100 gG indica una relación molar 1:100 entre la quimioquina y la gG. 1:200 gG indica una relación molar 1:200 entre la quimioquina y la gG.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

Las glicoproteínas G de HSV-1 y HSV-2 une quimioquinas con alta afinidad

1.1.- Clonaje y expresión de las glicoproteínas G de HSV-1 y HSV-2

Las gG de HSV-1 y de HSV-2 (gG-1 y gG-2, respectivamente) se encuentran expresadas en la membrana de las células infectadas y también en la envuelta lipídica de la partícula viral (Figura 1A). El anclaje a la membrana se debe a la presencia de una región transmembrana en gG. En el caso de HSV-2, además, la gG se secreta al medio extracelular después de sufrir un procesamiento proteolítico. Se ha clonado la región extracelular soluble de gG-1 (aminoácidos 28-142; gG-1s contiene los nucleótidos 82-501 de gG-1 con número de acceso X14112; SEQ ID NO1 (nucleótidos) y SEQ ID N2 (aminoácidos)) y de gG-2 (aminoácidos 33-444, incluyendo el sitio de procesamiento proteolítico; gG-2s contiene los nucleótidos 100-584 de gG-2 con número de acceso Z86099; SEQ ID NO3 (nucleótidos) y SEQ ID NO4 (aminoácidos)) (gG-1s y gG-2s, respectivamente) en vectores de expresión de baculovirus que permiten expresar las proteínas en células de insecto (Figura 1B). Para mejorar la secreción de las proteínas en las células de insecto se ha sustituido el péptido señal de la gG por el de la melitina. Además, para permitir la purificación de las proteínas por cromatografía de afinidad, se ha incorporado un tag de histidinas 6x en el extremo N-terminal, a continuación del sitio de corte proteolítico del péptido señal (Figura 1B). En la Figura 2A se puede observar la purificación por cromatografía de afinidad de la gG-1s (SEQ ID NO 2) y gG-2s (SEQ ID NO 4). Tanto la gG-1s como la gG-2s purificadas son reconocidas por un anticuerpo monoclonal anti-histidinas (Figura 2B). Sin embargo, sólo la gG-1s es reconocida por un anticuerpo monoclonal anti-gG-1 (Figura 2B) (cedido por la Dra. Helena Browne, Cambridge, U.K.).

1.2.- Las gGs de HSV-1 y HSV-2 unen quimioquinas con alta afinidad

Tanto la gG-1s (SEQ ID NO 2) como la gG-2s (SEQ ID NO 4), purificadas por cromatografía de afinidad, fueron acopladas covalentemente a un chip CM5 de Biacore con objeto de testar la posible unión de quimioquinas por la técnica de Surface Plasmon Resonance (SPR). Posteriormente, se realizó un ensayo de unión con todas las quimioquinas humanas disponibles comercialmente para determinar si la gG (gG-1s y gG-2s) era capaz de unir quimioquinas. Las quimioquinas fueron obtenidas de la casa comercial Peptotech EC, Londres, Reino Unido. Como se muestra en la Figura 3A, la gG-1s y la gG-2s interaccionan con las quimioquinas humanas CCL22, CCL26, CCL25, CCL28, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12- α , CXCL12- β , CXCL13, CXCL14 y CL1. Las afinidades de unión de algunas de estas interacciones se muestran en la Tabla 1. Como se puede observar, la afinidad de la interacción es alta, en el rango nanomolar.

ES 2 317 749 B1

TABLA 1

Quimioquinas utilizadas en el Biacore para determinar su posible interacción con gG-1s o gG-2s. El signo (+) indica unión. El signo (-) indica falta de unión. Se muestran las constantes de afinidad (KD) para algunas de las interacciones. Abreviación: n.c: no calculado

	gG-1s	KD (M)	gG-2s	KD (M)
hCCL1	-		-	
hCCL2	-		-	
hCCL3	-		-	
hCCL3L1	-		-	
hCCL4	-		-	
hCCL4L1	-		-	
hCCL5	-		-	
hCCL6	-		-	
hCCL7	-		-	
hCCL8	-		-	
hCCL11	-		-	
hCCL13	-		-	
hCCL14	-		-	
hCCL15	-		-	
hCCL16	-		-	
hCCL17	-		-	
hCCL18	-		-	
hCCL19	-		-	
hCCL20	-		-	
hCCL21	-		-	
hCCL22	+	n.c.	+	n.c.
hCCL23	-		-	
hCCL24	-		-	
hCCL25	+	5,95e-9	+	2,98e-9
hCCL26	+	7,8e-8	+	1,72e-9
hCCL27	-		-	
hCCL28	+	n.c.	+	1,8e-9

	gG-1s	KD	gG-2s	KD
5	hCXCL1	-	-	
	hCXCL2	-	-	
	hCXCL3	-	-	
	hCXCL4	-	-	
10	hCXCL5	-	-	
	hCXCL6	-	-	
	hCXCL7	-	-	
	hCXCL8	-	-	
	hCXCL9	+	n. c.	n. c.
20	hCXCL10	+	n. c.	n. c.
	hCXCL11	+	n. c.	n. c.
	hCXCL12-α	+	n. c.	6,5e-9
25	hCXCL12-β	+	2,17e-8	4,05e-9
	hCXCL13	+	n. c.	4,14e-9
	hCXCL14	+	n. c.	3,5e-9
30	hCXCL16	-	-	
	hXCL1	+	+/-	n. c.
35	hCX3CL1	-	-	

Posteriormente, la interacción entre las gGs de HSV-1 y de HSV-2 y algunas quimioquinas (CCL25 y CXCL10) fue corroborada experimentalmente mediante la realización de experimentos de entrecruzamiento químico, utilizando quimioquinas marcadas con ^{125}I y BS3 como entrecruzador químico. Las quimioquinas marcadas con ^{125}I fueron obtenidas de la casa comercial Amersham Biosciences. La presencia de un complejo de menor movilidad electroforética indica la formación de un complejo entre la gG-1s y gG-2s con ^{125}I -CCL25 y ^{125}I -CXCL10 (Figura 4).

1.3.- La gG presente en la partícula viral y en células infectadas interacciona con quimioquinas

Debido a que la gG se encuentra en la envuelta lipídica de la partícula viral de HSV se decidió comprobar si la gG presente en el virión también era capaz de unir quimioquinas. Para ello, se utilizó HSV-1 salvaje de la cepa SC16 y con HSV-1 de la misma cepa en el que el gen US4, que codifica para la gG, ha sido interrumpido mediante la inserción del gen lacZ (HSV-1- ΔgG) (Balan P, Davis-Poynter N, Bell S, Atkinson H, Browne H, Minson T. (1994). An analysis of the *in vitro* and *in vivo* phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *J. Gen. Virol.* **75**: 1245-1258). Se recogió el sobrenadante de células BSC-1 sin infectar o infectadas con HSV-1 salvaje o con HSV-1- ΔgG y, después de clarificar el sobrenadante mediante una centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos, se pasó el sobrenadante a través de un colchón de sacarosa al 45% preparado en 0,02 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl (22000 rpm, durante 1 hora, rotor SW28). El virus purificado fue resuspendido en Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl. Experimentos de entrecruzamiento químico realizados con viriones purificados y ^{125}I -CXCL12- α muestran la interacción entre HSV-1 salvaje y ^{125}I -CXCL12- α (Figura 5A). Esta interacción no se observa con viriones defectivos para la gG-1 (HSV-1- ΔgG , Figura 5A). La ausencia de gG-1 en los viriones purificados a partir de sobrenadante de células infectadas con HSV-1- ΔgG fue demostrada con la utilización de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la gG-1 (Figura 5B). Sin embargo, sí que se observa la expresión de otras proteínas virales tanto en HSV-1 salvaje como en HSV-1- ΔgG cuando se utilizó un anticuerpo policlonal anti-HSV-1 (Figura 5B).

La gG de HSV-1 y HSV-2 también se encuentra presente en la membrana de las células infectadas pero su función se desconoce. Se ha llevado a cabo experimentos de unión de quimioquinas marcadas con ^{125}I a células infectadas con HSV (HSV-1 salvaje (wt), HSV-1- ΔgG y HSV-2 salvaje). Después de 1 hora de incubación a 4°C, las células se pasaron por una mezcla de aceite (1,5 partes de dibutil talato, Sigma D-2270; 1 parte de bis(2ethylhexyl)talato, Aldrich D20,115-4) y se lavaron con PBS para eliminar la quimioquina libre no unida a las células (Dower SK, Kronheim SR,

March CJ, Conlon PJ, Hopp TP, Gillis S, Urdal DL. (1985). Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J. Exp. Med.* 162: 501-515). Posteriormente, se procedió a determinar el número de cuentas en cada muestra con un contador de isótopos gamma. Como se puede apreciar en la Figura 5C, ¹²⁵I-CXCL10 se une a las células infectadas con HSV-1 con mayor eficacia que a las células sin infectar o que a las células infectadas con el virus HSV-1-ΔgG. La unión de ¹²⁵I-CXCL10 a las células infectadas con HSV-2 no fue tan elevada como en el caso de HSV-1. Esto puede ser debido a que el dominio de unión a quimioquinas de la gG-2 se encuentra en la región extracelular, que se procesa proteolíticamente y se secreta al medio, reduciendo así la cantidad de gG-2 en la superficie celular. Estos experimentos también se han llevado a cabo con ¹²⁵I-CXCL12-α obteniendo un resultado similar (datos no mostrados).

1.4.- *La interacción entre la gG de HSV-1 y HSV-2 con las quimioquinas tiene lugar a través del dominio de unión a glicosaminoglicanos presente en las quimioquinas*

Las interacción entre las quimioquinas y los glicosaminoglicanos (GAGs) es necesaria para su correcta presentación a los receptores de 7 dominios transmembrana acoplado a proteína G (GPCR) presentes en las células del sistema inmune y su función *in vivo* (Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003) Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the *in vivo* activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 1885-1890). La interacción de la quimioquina con el receptor desencadena una cascada de señales intracelulares que desemboca en la migración celular. En la presente invención se ha caracterizado el dominio de las quimioquinas responsable para la interacción con la gG. La presencia de concentraciones crecientes de un GAG como la heparina compite por la unión de la gG-1 (Figura 6A) y gG-2 (Figura 6B) con las quimioquinas sugiriendo que tanto como la gG como la heparina se unen a las quimioquinas por el mismo dominio (Figura 6). La gG y la heparina no interactúan (resultado no mostrado). Se han obtenido resultados similares con CCL25, CCL28 y CXCL10 (resultado no mostrado). Para determinar si la gG interactúa con la quimioquina por el dominio de unión al receptor, se realizaron ensayos de unión de ¹²⁵I-CXCL12-α a CXCR4 y de ¹²⁵I-CCL25 a CCR9 en presencia de gG-1s o gG-2. La presencia de cantidades crecientes de gG-1s o gG-2s (hasta 20 μg de proteína) no afectó la unión de las quimioquinas a su receptor, mientras que la gG del herpesvirus bovino 5 (BHV-5) inhibió en un 80% la unión de ¹²⁵I-CXCL12-α a CXCR4 (resultado no mostrado).

Ejemplo 2

La gG de HSV-1 y HSV-2 induce la migración de linfocitos T y monocitos mediada por quimioquinas

Las quimioquinas inducen la migración de las células del sistema inmune. En todos los casos en los que se ha investigado la capacidad de las proteínas virales que unen quimioquinas descritas hasta la fecha de modular la actividad de las quimioquinas mediante el uso de ensayos *in vitro* se ha observado que las vCKBP inhiben la migración mediada por quimioquinas (Alejo A, Ruiz-Arguello MB, Ho Y, Smith VP, Saraiva M, Alcami A. (2006) A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 5995-6000; Webb LM, Alcami A. (2005). Virally encoded chemokine binding proteins. *Mini. Rev. Med. Chem.* 5: 833-848). En el caso de los herpesvirus alpha no humanos, la presencia de la gG inhibe la migración mediada por quimioquinas. En la presente invención se ha investigado la capacidad de gG-1s y gGs-2 de HSV-1 y HSV-2, respectivamente, de inhibir la migración mediada por las quimioquinas en ensayos de migración *in vitro* utilizando filtros con un tamaño de poro de 3 μm. La presencia de la quimioquina en el fondo del pocillo induce la migración de las células a través de los poros. La incubación previa de las gGs de HSV-1 y HSV-2 con la quimioquina no inhibe la migración de células T (MOLT-4) mediada por CXCL12-β (Figura 7A). Por el contrario, las gGs de HSV-1 y HSV-2 inducen la migración mediada por quimioquina (Figura 7A). Sin embargo, la gG de BHV-5 es capaz de inhibir esta migración. Las gGs de HSV-1 o HSV-2 no son capaces de inducir la migración de las células T por si solas, sin la presencia de la quimioquina (Figura 7A). La inducción de la migración mediada por la quimioquina no es dependiente del tipo celular, ya que también se aprecia al utilizar monocitos maduros (Figura 7B). Además, es necesaria la interacción entre la gGs de HSV-1 o HSV-2 y la quimioquina. La inducción de la migración se aprecia únicamente cuando la quimioquina que induce la migración es una de las que interactúa con la gG (ej. CXCL12-β) pero no cuando la gG no es capaz de unirla (ej. CCL2) (Figura 7B).

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un compuesto proteico derivado de la glicoproteína (gG) de HSV perteneciente al siguiente grupo: la proteína gG-1s del HSV-1 (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO2) y la proteína gG-2s del HSV-2 (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO4), para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica útil para la inducción de migración celular mediada por quimioquinas.

10 2. Secuencia de nucleótidos útil para la expresión de un péptido **caracterizada** porque es codificante de un fragmento extracelular de la proteína gG de HSV-1 constituido por la SEQ ID NO1, que codifica para la forma gG-1s del HSV-1 (SEQ ID NO2).

15 3. Secuencia de nucleótidos útil para la expresión de un péptido **caracterizada** porque es codificante de un fragmento extracelular de la proteína gG de HSV-2 constituido por la SEQ ID NO3, que codifica para la forma gG-2s del HSV-2 (SEQ ID NO4).

20 4. Vector de expresión recombinante útil para la expresión de un péptido **caracterizado** porque comprende una secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 2 y 3.

25 5. Célula transformada o transfectada útil para la producción de un péptido **caracterizada** porque comprende una secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 2 y 3 ó un vector según la reivindicación 4.

30 6. Proteína derivada o fragmento de las gG de HSV, ya sean del tipo HSV-1 o HSV-2, útil como inductora de la migración celular mediada por quimioquinas **caracterizada** porque pertenece al siguiente grupo: SEQ ID NO2, forma proteica gG-1s del HSV-1, y SEQ ID NO4, forma proteica gG-2s del HSV-2.

35 7. Composición farmacéutica o medicamento útil para la inducción de migración celular mediada por quimioquinas **caracterizada** porque comprende una secuencia de aminoácidos perteneciente al siguiente grupo: secuencia de aminoácidos constituida por la SEQ ID NO2, que codifica para la forma gG-1s del HSV-1 y secuencia de aminoácidos constituida por la SEQ ID NO4, que codifica para la forma gG-2s del HSV-2, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

40 8. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 7 en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología que cursa con alteraciones en la migración celular mediada por quimioquinas consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita la recuperación de la capacidad de migración celular, preferentemente de células del sistema inmune.

45 9. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 8 **caracterizado** porque la enfermedad con alteraciones en la migración celular pertenece al siguiente grupo: cardiomiopatía isquémica, terapia post-infarto con células de la médula espinal, síndromes coronarios agudos, carcinoma, carcinoma espontáneo bronquio-alveolar o fiebre crónica Q.

50 10. Procedimiento de identificación de compuestos útiles para el tratamiento de infecciones provocadas por HSV **caracterizado** porque se utiliza una proteína perteneciente al siguiente grupo: proteína gG-1s de HSV-1 (SEQ ID NO2) y proteína gG-2s de HSV-2 (SEQ ID NO4).

50

55

60

65

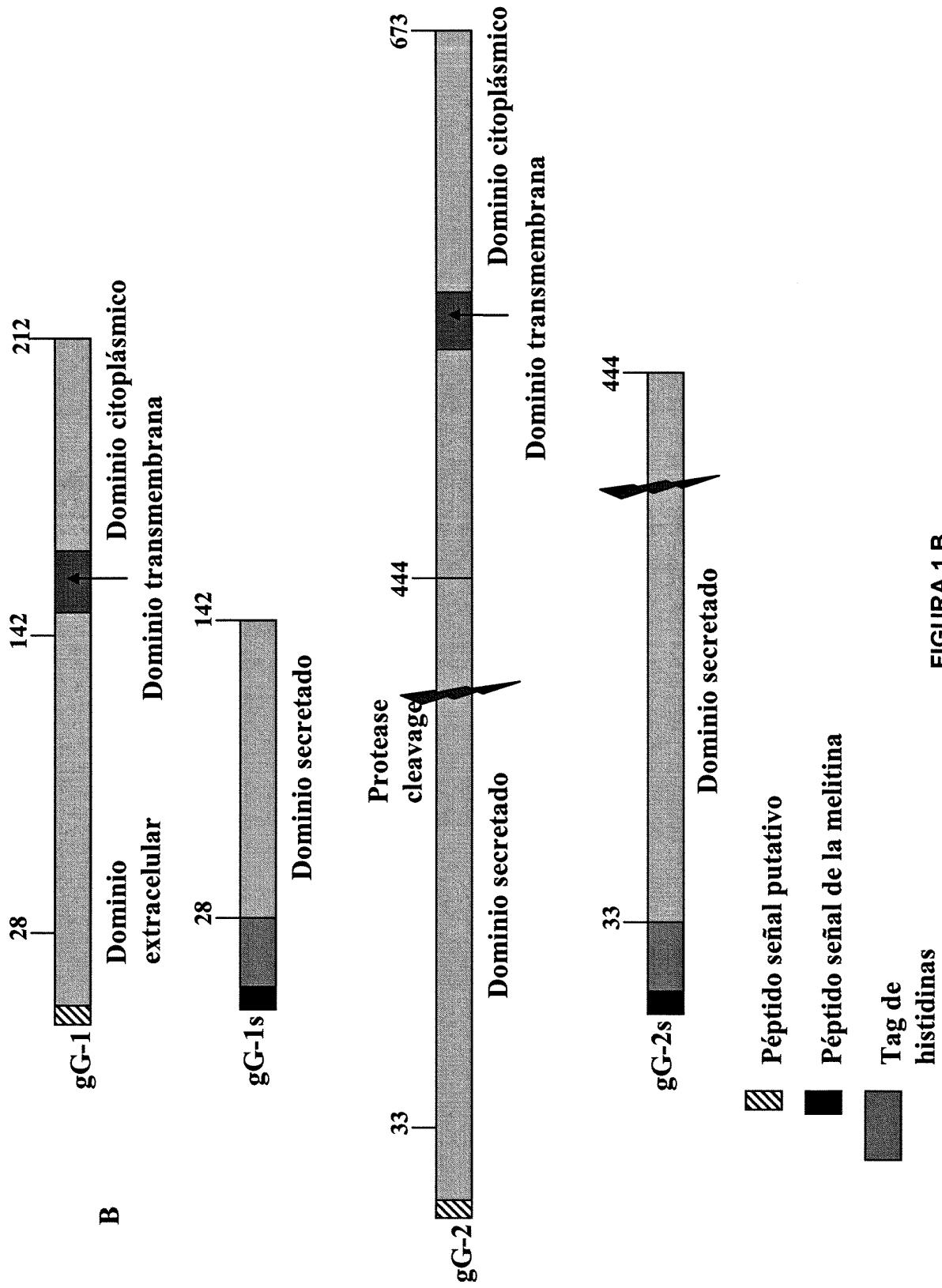


FIGURA 1 B

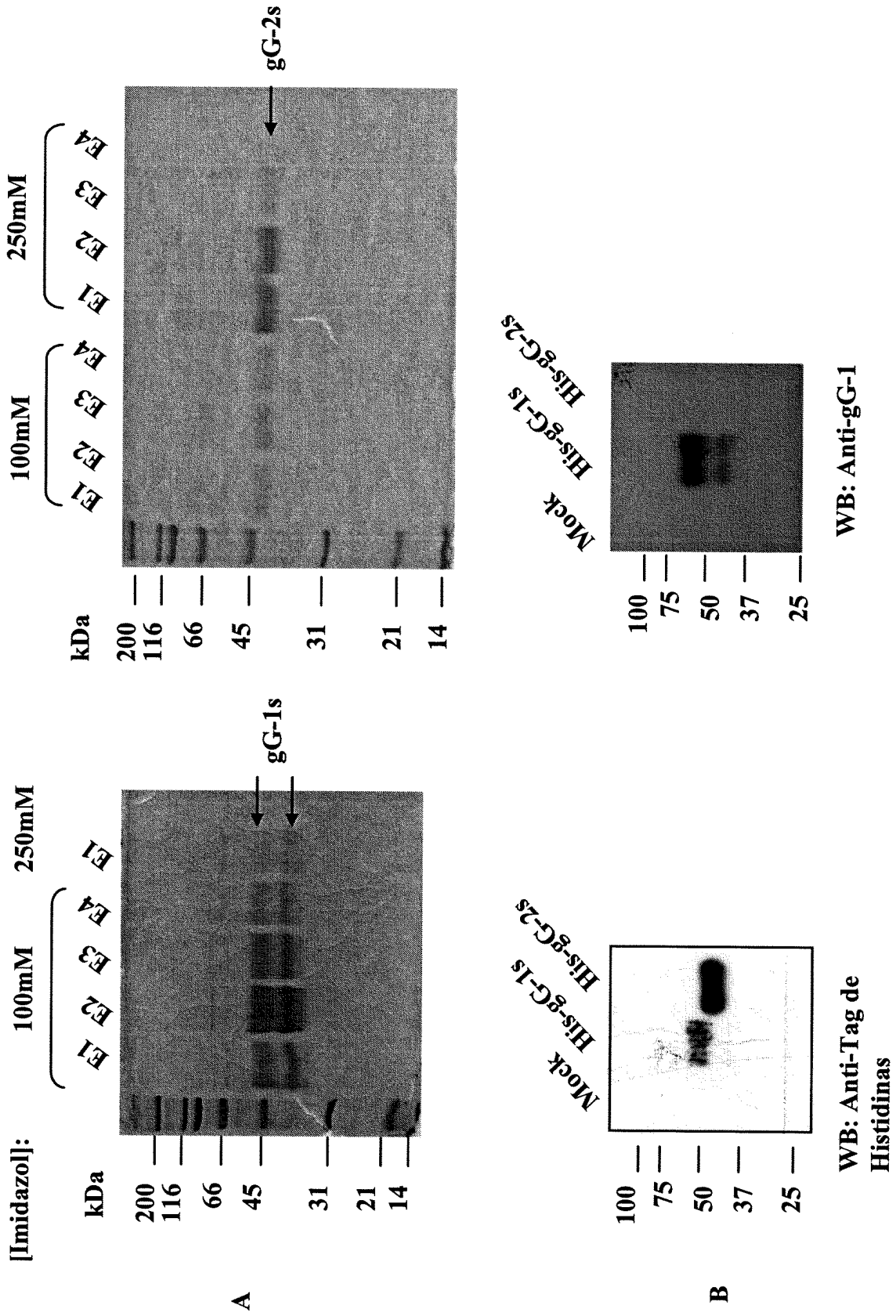


Figura 2

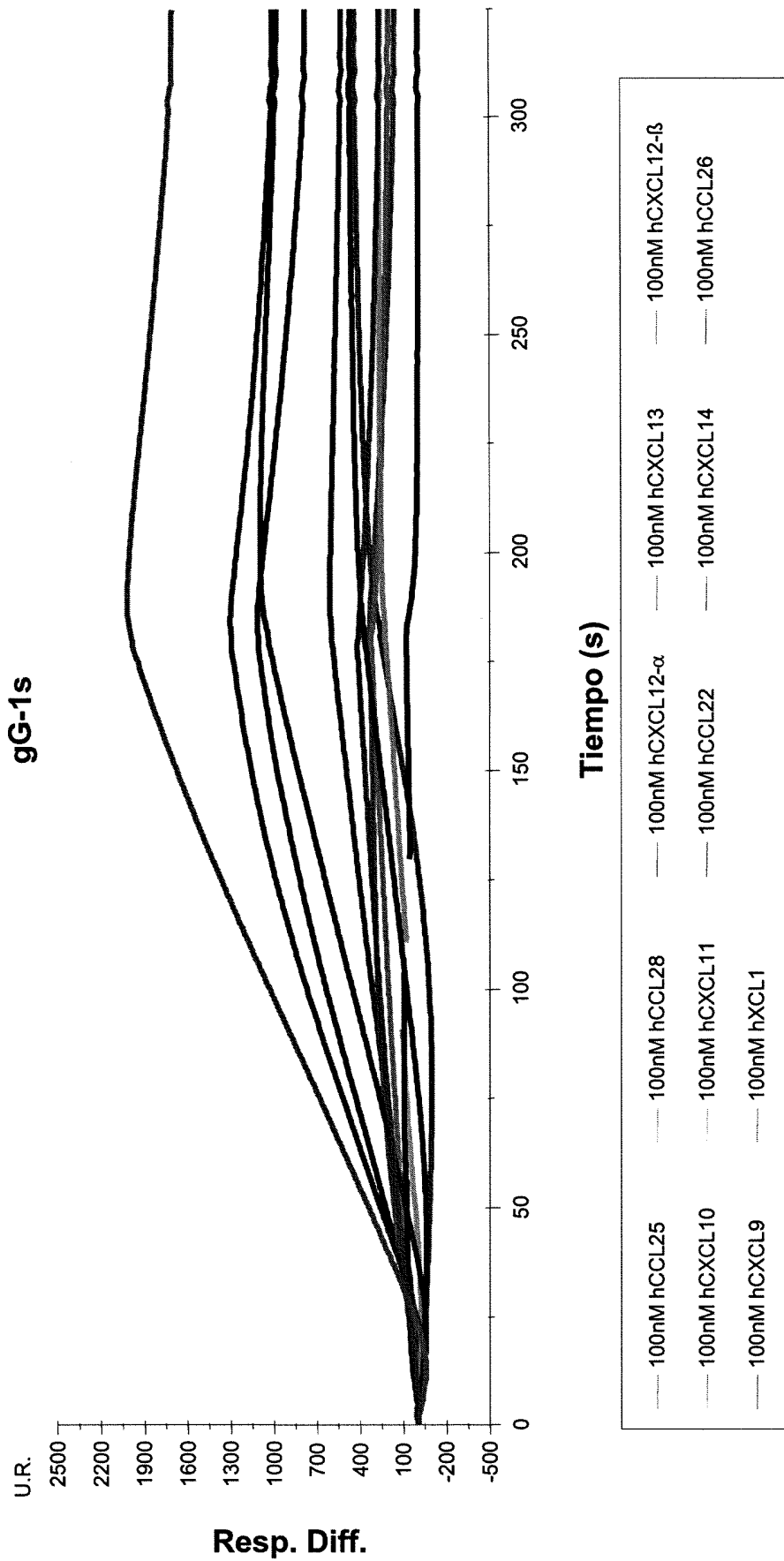


FIGURA 3 A

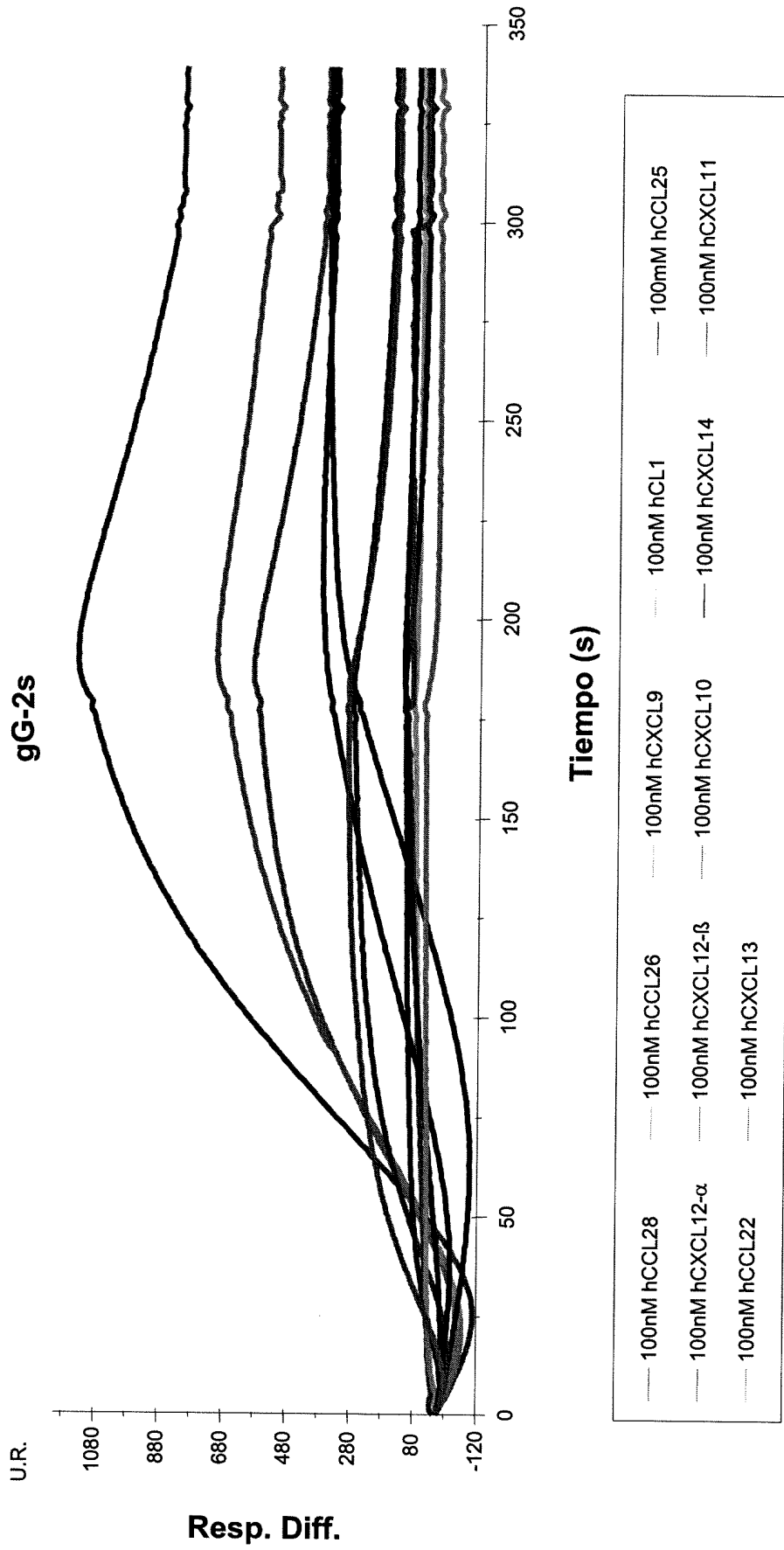


FIGURA 3 B

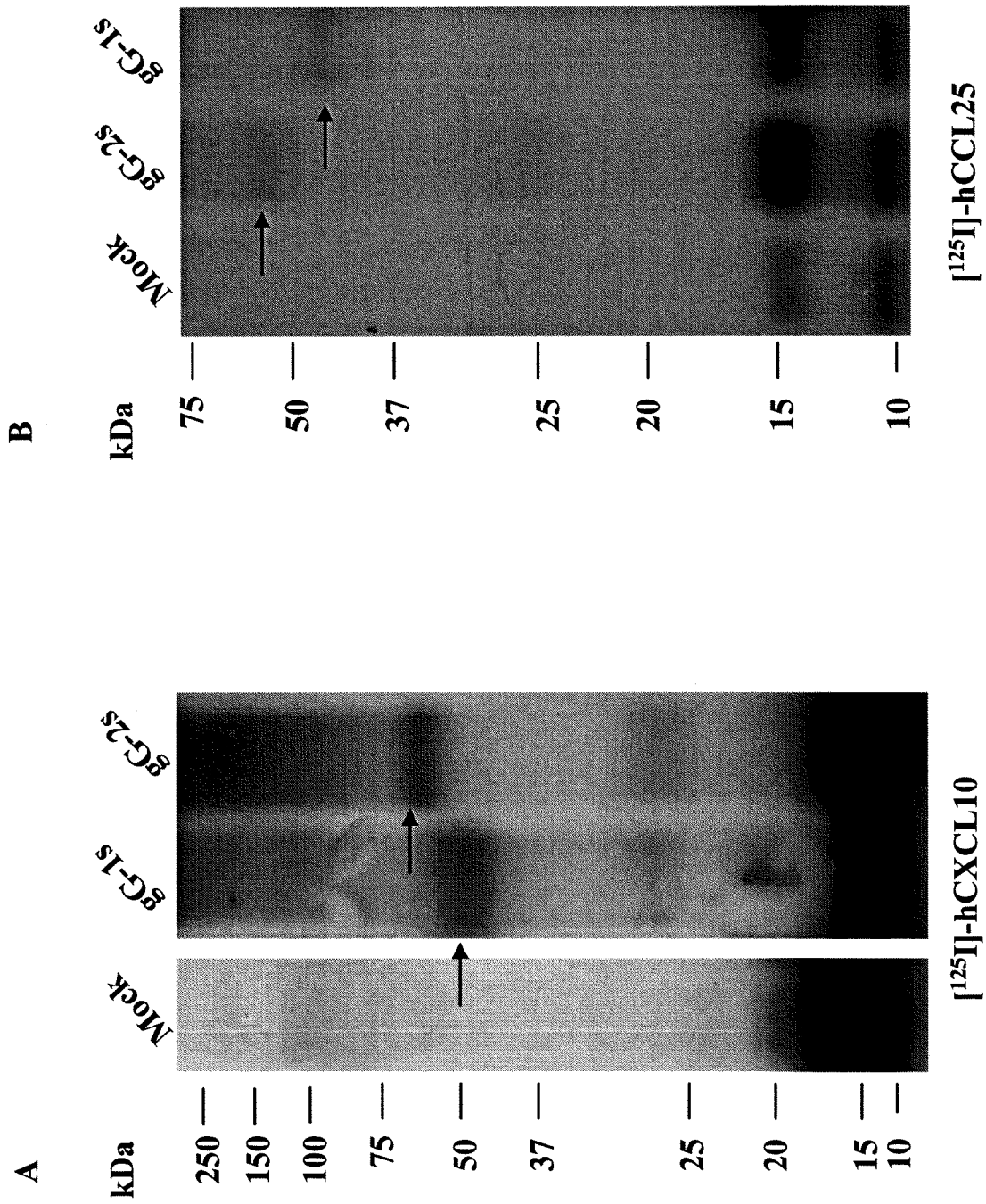


FIGURA 4

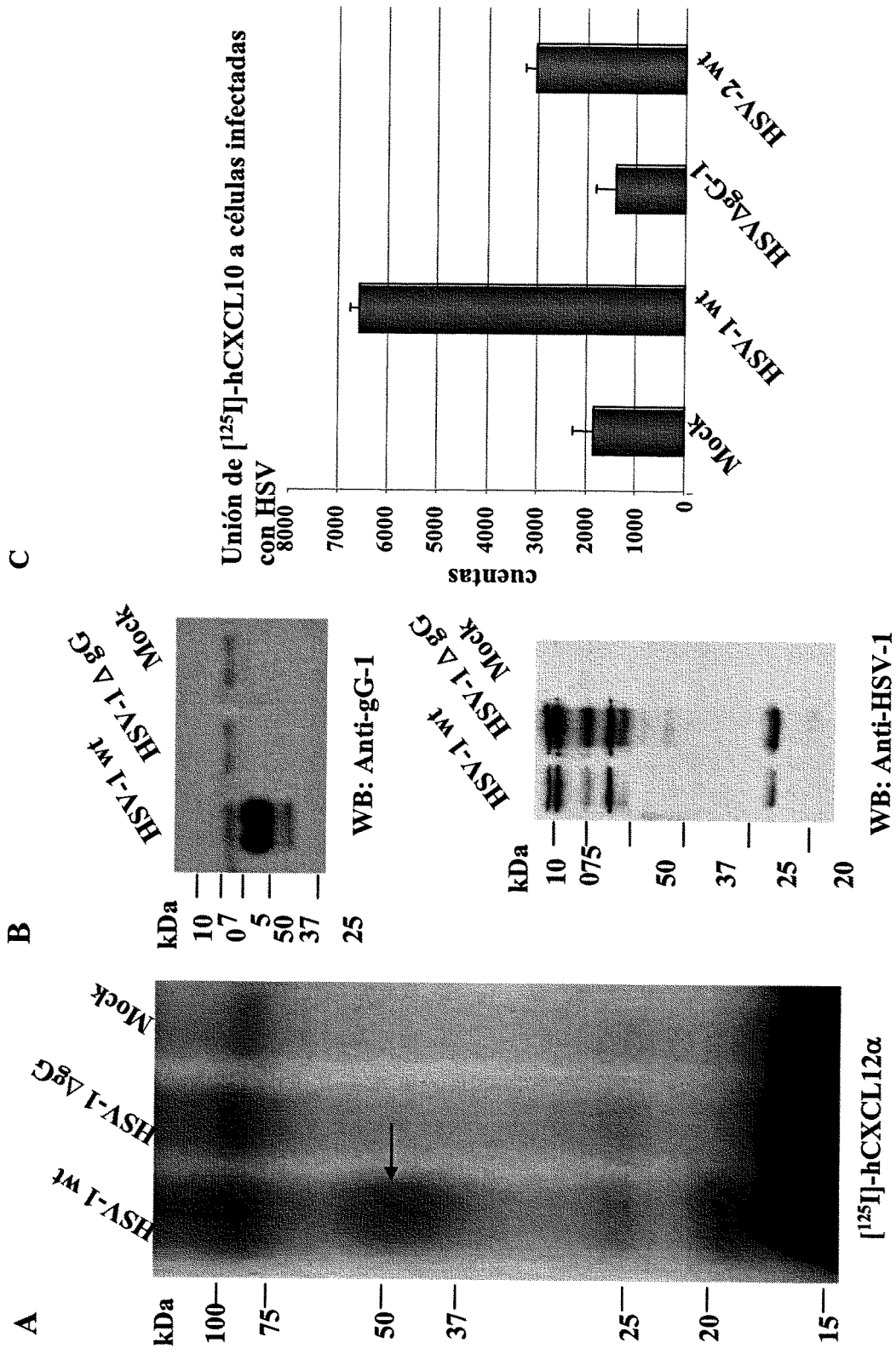


FIGURA 5

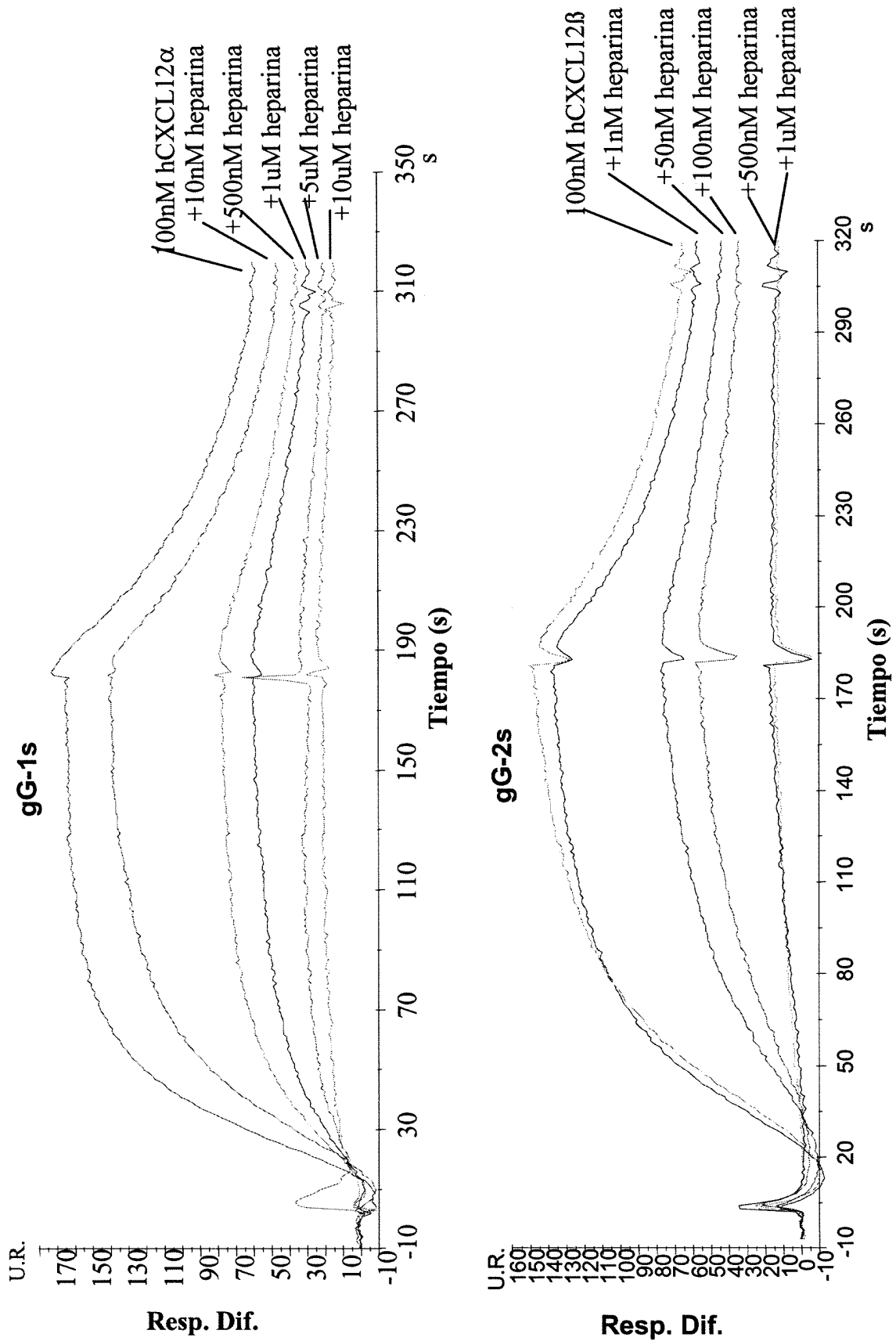


Figura 6

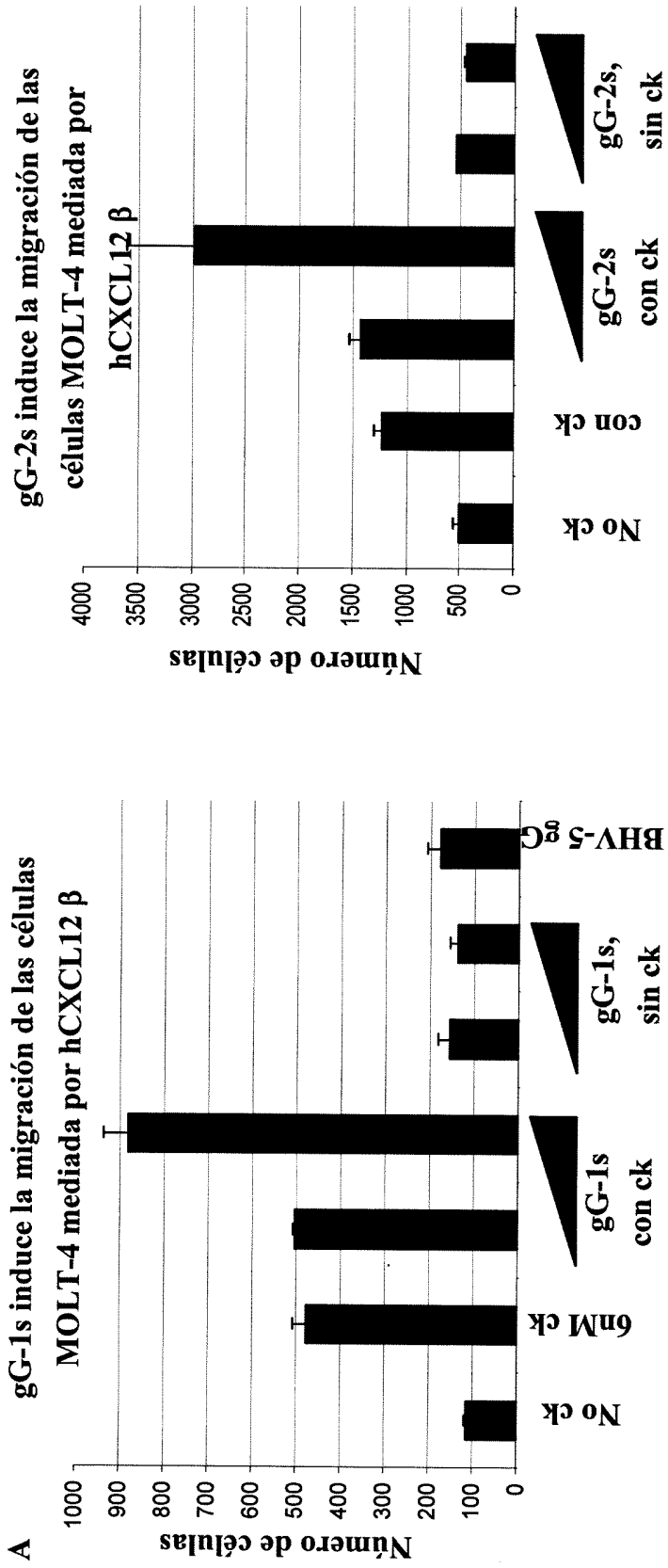


FIGURA 7 A

B
 gG-2s induce la migración de las células MonoMac mediada por
 hCXCL12 pero no por hCCL2

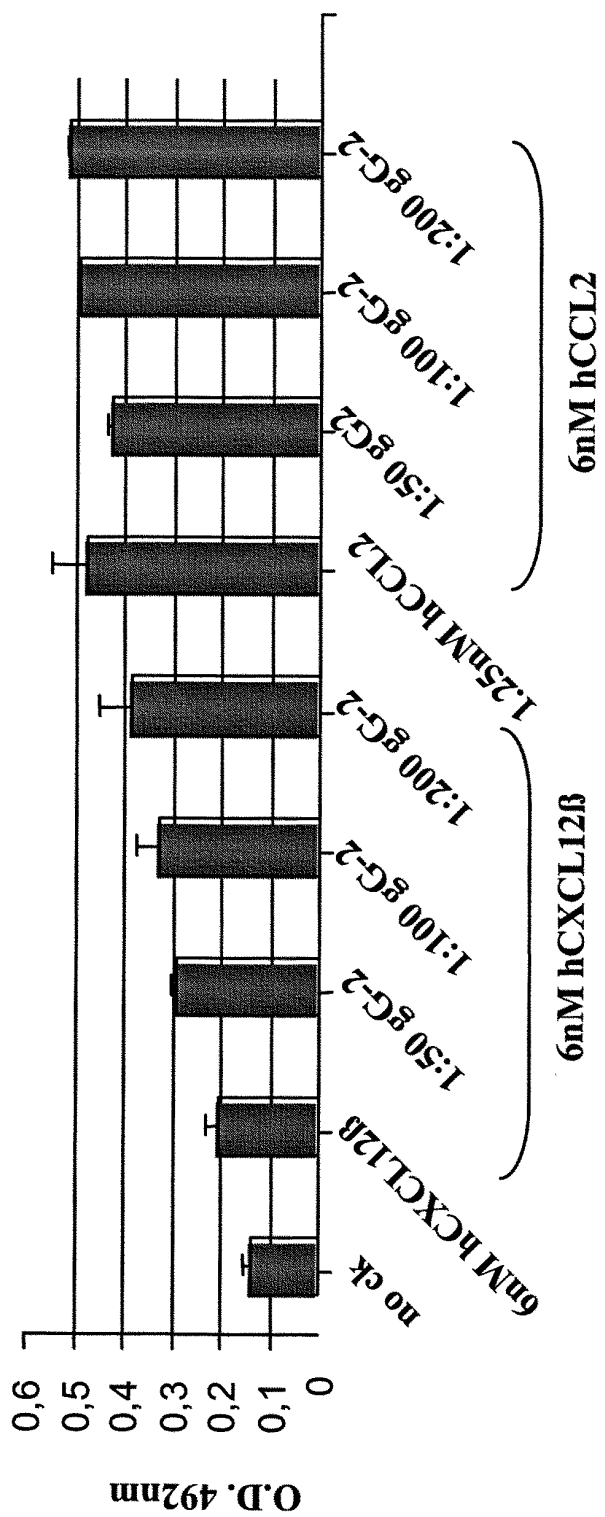


FIGURA 7 B



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 317 749

② Nº de solicitud: 200601934

③ Fecha de presentación de la solicitud: **20.07.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BRYANT NEIL A. et al. "Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins". The EMBO Journal England. 17 Feb 2003. Vol. 22, Nº. 4, páginas 833-846. Figura 10B.	9,11,13,14,15
X	BASE DE DATOS EMBL "ON LINE"! 06.10.2005, WO 2005092374 A2 (IST SUPERIORE SANITA). SEC.ID.Nº 9. Recuperado de EBI nº.de acceso: EMBL_PAT: CS176891.	9,13,14
X	BASE DE DATOS EMBL "ON LINE!. NORBERG, P.R et al. "Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses." J. Virol. 2004 Vol. 78, nº. 19, páginas 10755-10764. Recuperad de EBI nº. Acceso: EMBL_VI: AJ626502.	9,13,14
X	BASE DE DATOS EMBL "ON LINE"! 12 AGO 1997 (12.06.1997), US 5656457 A (PARKERS D.). Recuperado de EBI nº. ACCESO: EMBL_PAT: I60459.	11,13,14
A	SEET BRUCE T. et al. "Viral chemokine-binding proteins". Journa of leukocyte biology. 01.07.2002. Vol. 72. Nº. 1, páginas 24-34. ISSN 0741-5400 .	1-8,10,12,16,17
A	WEBB LM. et al. "Virally encoded chemokine binding proteins". Mini_Rev. Med. Chem. 2005. Vol. 5; Nº. 9; páginas 833-848.	1-8,10,12,16,17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

18.03.2009

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/035 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C12N 15/38 (2006.01)