



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 319 838**

② Número de solicitud: 200602494

⑤ Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **29.09.2006**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2009**

Fecha de la concesión: **29.01.2010**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **11.02.2010**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.02.2010

⑦ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑧ Inventor/es: **Mañes Brotón, Santos;
Jiménez Baranda, Sonia;
Gómez Moutón, Concepción y
Martínez Alonso, Carlos**

⑨ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑩ Título: **Uso de inhibidores de la actividad de la proteína Filamina A para la elaboración de composiciones farmacéuticas, compuestos inhibidores de dicha actividad, composiciones farmacéuticas y sus aplicaciones terapéuticas y procedimiento identificación de dichos compuestos inhibidores.**

⑪ Resumen:

Uso de inhibidores de la actividad de la proteína Filamina A para la elaboración de composiciones farmacéuticas, compuestos inhibidores de dicha actividad, composiciones farmacéuticas y sus aplicaciones terapéuticas y procedimiento de identificación de dichos compuestos inhibidores.

La presente invención describe por primera vez la actividad inductora de la infección del VIH-1 de la proteína Filamina A (FLNa) como regulador de las interacciones de la proteína CD4 y de los coreceptores CXCR4 y CCR5, convirtiéndose de esta forma en una diana terapéutica. Además, se han identificado los dominios de estas proteínas reguladores de dichas interacciones identificándose moléculas inhibidoras de las mismas que pueden ser utilizadas para la elaboración de composiciones terapéuticas útiles para el tratamiento y prevención de la infección por VIH-1, entre otras enfermedades. Finalmente, la FLNa puede convertirse en la base de un procedimiento de identificación de nuevos compuestos inhibidores de la infección por VIH-1.

ES 2 319 838 B1

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

DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores de la actividad de la proteína Filamina A para la elaboración de composiciones farmacéuticas, compuestos inhibidores de dicha actividad, composiciones farmacéuticas y sus aplicaciones terapéuticas y procedimiento de identificación de dichos compuestos inhibidores.

Campo de la técnica

La presente invención se enmarca en el desarrollo de nuevas composiciones farmacéuticas para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades provocadas por el virus VIH-1 o que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune. Por lo tanto, debe adscribirse al sector farmacológico y biomédico de las enfermedades virales.

Estado de la técnica

El VIH-1 se disemina por la interacción del virus con una célula diana, o mediante la transmisión directa entre una célula infectada con una célula sana. En ambas situaciones, la infección de las células dianas por VIH-1 requiere que la proteína de la envuelta (Env) gp120 induzca el agrupamiento de numerosas moléculas de CD4 y de co-receptor en la superficie celular. Esto permite la activación de la glicoproteína transmembrana gp41 de la envuelta viral, y la formación de un complejo que fusiona las membranas que contienen Env con la membrana de la célula diana (1). Estas interacciones dependen en gran medida de la concentración y distribución de los receptores celulares, y del contenido de colesterol de la membrana (2-9). Estudios cinéticos han demostrado que el agrupamiento de los receptores virales en la superficie de la célula diana no ocurre por difusión pasiva, sino que necesitan ser transportados activamente a la zona de contacto Env/receptor por el citoesqueleto de actina (10, 11). De hecho, el tratamiento de la célula diana con inhibidores de la remodelación de F-actina o con inhibidores de la proteína miosina, reduce la fusión mediada por Env y/o el agrupamiento de receptores (7, 10, 12).

Aunque se conocen los elementos básicos implicados en las etapas iniciales de la infección, los eventos moleculares que subyacen a la formación del complejo de fusión viral no están esclarecidos (13). Por ejemplo, están poco definidos los mecanismos por los cuales el VIH estimula la remodelación del citoesqueleto de la célula huésped durante la infección; las evidencias obtenidas son débiles y ocasionalmente contradictorias. Existe un fuerte debate sobre la importancia relativa de las interacciones necesarias para el agrupamiento de los receptores virales. Se ha sugerido que la acumulación de F-actina en la zona de contacto entre la célula diana y el virus o la célula infectada requiere las señales mediadas por Env-CD4 y Env-co-receptor (10); no obstante, el entrecruzamiento de CD4 puede ser suficiente para promover el agrupamiento de los receptores de quimioquinas, F-actina, el colesterol y otros componentes de las balsas lipídicas en células T (11). Más importante, se desconocen las vías de señalización específicas que conducen a la remodelación de F-actina tras la unión del VIH a los receptores, si bien se sabe que ni la señalización de CD4 vía p56Lck ni el acoplamiento de los co-receptores a las proteínas G heterotriméricas son necesarias para la infección (14-16). La identidad de las Rho GTPasas activadas por los receptores virales también es un tema de conflicto; un estudio ha asociado Rac (pero no RhoA) con la fusión mediada por Env (17), mientras que otro ha implicado a RhoA (pero no Rac) en dicho proceso (18). Finalmente, aunque CD4 y los co-receptores co-localizan en estructuras ricas en ezrina y talina (19), no se ha demostrado la interacción directa de los receptores virales con estas proteínas de unión a actina, ni tampoco se ha probado las consecuencias de dichas hipotéticas interacciones en la reorganización de F-actina o la infección por el VIH-1.

Una posibilidad es que CD4 y/o los co-receptores se encuentren unidos a una proteína adaptadora que conecte dichos receptores al citoesqueleto de actina y que, al mismo tiempo, organice la señalización requerida para la reorganización de F-actina; dicho "partner" molecular no se ha descrito hasta la fecha. Las proteínas de unión a actina de la familia de las filaminas pueden llevar a cabo dicha función. Un miembro de esta familia, filamina A (FLNa), está presente en la periferia del citoplasma. FLNa entrecruza filamentos de actina en redes ortogonales y ancla dichas redes a la membrana celular y a los intermediarios de señalización (20). FLNa consiste en dos subunidades de masa molecular relativa 280.000, cada una de las cuales contiene 24 repeticiones en tandem de aproximadamente 96 aminoácidos con estructura de hoja semejante a las inmunoglobulinas. El dominio de unión a actina de FLNa está en el N-terminal, mientras que el dominio de dimerización se localiza en la repetición 24 en el C-terminal (21). Ambos dominios son esenciales para la ramificación de los filamentos de actina. FLNa interacciona con un número de receptores de membrana y proteínas de transducción de señales intracelulares, lo que sugiere su función como adaptadores de señalización conectando y coordinando procesos celulares con la regulación dinámica del citoesqueleto de actina (22). La familia de las Rho GTPasas (23) y algunos de sus co- factores reguladores se ensamblan con FLNa que, a su vez, regula la actividad GTPasa, permitiendo a FLNa participar en la remodelación espacio-temporal de F-actina.

Una aproximación terapéutica sería el uso de compuestos que interaccionan con los receptores del VIH-1, capaces de regular los eventos tempranos en la reorganización de F-actina inducidos por la unión del virus a la célula huésped.

Las etapas iniciales de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) requieren el agrupamiento de numerosas moléculas del receptor CD4 y de los co-receptores CXCR4 y CCR5, en un proceso mediado por la glicoproteína viral gp120 y el citoesqueleto de actina. Los mecanismos por los cuales el VIH-1 induce la reorganización de F-actina (actina filamentosa) en la célula diana son desconocidos.

ES 2 319 838 B1

Aunque ha sido descrita la co-localización de CD4 y de los co-receptores del VIH-1 en estructuras ricas en ezrina y talina (19), la interacción directa entre estas proteínas de unión a actina y los receptores no ha sido establecida.

Descripción de la patente

5

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína FLNa (en adelante, FLNa), en adelante uso de un compuesto inhibidor de la presente invención, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de la infección por VIH-1 y de enfermedades que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune.

Un objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos como compuesto inhibidor, en adelante secuencia de nucleótidos FLNa de la presente invención, que permite la expresión de una proteína o péptido en células humanas, y que está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio 10 de la FLNa humana (FLNa^{D10}) de SEQ ID NO1,
- b) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio 13-16 de la FLNa humana (FLNa^{D13-16}) de SEQ ID NO9,
- c) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a) y b),
- d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos FLNa derivada de CD4 como compuesto inhibidor que está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO7),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos FLNa derivada de CXCR4 como compuesto inhibidor que está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO11,
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

55

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos FLNa derivada de CCR5 como compuesto inhibidor que está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO13),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

ES 2 319 838 B1

Por tanto, otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos FLNa como compuesto inhibidor que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína FLNa humana constituido por una o varias secuencias de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína FLNa,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína FLNa,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína FLNa, y
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína FLNa.

Además, otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor es una o varias proteínas o péptidos, en adelante uso de la proteína FLNa de la presente invención, y que está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos del dominio 10 de la FLNa humana (FLNa^{D10}) (SEQ ID NO2),
- b) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos del dominio 13-16 de la FLNa humana (FLNa^{D13-16}) (SEQ ID NO10),
- c) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a) y b), y
- d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO8),
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO12,
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO14),
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

Por otro lado, otro objeto adicional de la presente invención lo constituye el uso de células, ya sean eucariotas -preferentemente humanas- o procariotas, en adelante células FLNa de la invención, modificadas genéticamente y que comprenden la secuencia de nucleótidos, la construcción o el vector de expresión FLNa de la invención -en donde puede expresarse de forma adecuada el péptido o proteína FLNa de la invención- para la elaboración de un compuesto inhibidor de la invención y su posterior purificación y aplicación.

ES 2 319 838 B1

Por otro lado, varios de los compuestos inhibidores de la actividad FLNa, como por ejemplo los dominios mínimos de las proteínas FLNa, CD4, CXCR4 y CCR5 y las secuencias de nucleótidos codificantes de las mismas, no existen como tales en la naturaleza y han sido identificados y aislados por primera vez en la presente invención. Por lo tanto, otro objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos FLNa/dominio perteneciente, a título
5 ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

a) la secuencia de nucleótidos FLNa constituida por el dominio mínimo de FLNa, (FLNa^{D10}) de SEQ ID NO1,

b) la secuencia de nucleótidos FLNa constituida por el dominio 10-12 de FLNa, (FLNa^{D10-12}) de SEQ ID NO3,

c) la secuencia de nucleótidos FLNa constituida por el dominio 8-10 de FLNa, (FLNa^{D8-10}) de SEQ ID NO5,

d) la secuencia de nucleótidos FLNa constituida por el dominio 13-16 de FLNa, (FLNa^{D13-16}) de SEQ ID NO9

e) la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID
15 NO7),

f) la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CXCR4 constituido por la secuencia SEQ ID NO11,

g) la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID
20 NO13)

h) una secuencia de nucleótidos análoga a las secuencias de a), b), c), d), e), f), y g), y

i) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera de a), b), c), d), e), f), g) y h).

Además, otro objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de aminoácidos FLNa/dominio pertene-
30 ciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

a) la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio mínimo de FLNa, (FLNa^{D10}) de SEQ ID NO2,

b) la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 10-12 de FLNa, (FLNa^{D10-12}) de SEQ ID NO4,

c) la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 8-10 de FLNa, (FLNa^{D8-10}) de SEQ ID NO6,

d) la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 13-16 de FLNa, (FLNa^{D13-16}) de SEQ ID NO10,

e) la secuencia de aminoácidos del dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO8),

f) la secuencia de aminoácidos del dominio de CXCR4 constituido por la secuencia SEQ ID NO12,

g) la secuencia de aminoácidos del dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO14)

h) una secuencia de aminoácidos análoga a las secuencias de a), b), c), d), e), f), y g), y

i) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera de a), b), c), d), e), f), g) y h).

De la misma manera forma parte de la presente invención un vector de expresión génica, en adelante vector de ex-
50 presión FLNa/dominio, que comprende una secuencia de nucleótidos FLNa/dominio. Igualmente, forma parte de la in-
vención una célula, procariota o eucariota, transformada o transfectada con la secuencia de nucleótidos FLNa/dominio
o con el vector de expresión FLNa/dominio.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el trata-
55 miento de la infección del VIH-1 y de enfermedades que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune, en
adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto ó agente inhibidor de la ac-
tividad FLNa de la invención, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes
y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso
60 de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferen-
temente un ser humano, afectado por la infección de VIH-1 o por enfermedades que cursen con una estimulación
alterada del sistema inmune consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el
65 que la enfermedad que se trata o se previene es la infección por VIH-1.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que la enfermedad que se trata o se previene es una enfermedad que cursa con una estimulación alterada del sistema inmune.

5 Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de identificación de compuestos inhibidores de la actividad FLNa de la proteína FLNa humana, en adelante procedimiento de identificación de la invención, basado en la interacción de varias proteínas con FLNa y que comprende los siguientes pasos:

- 10 a) generar una preparación biológica que mimetice la interacción proteína-proteína que mimetice la interacción FLNa con CD4, CXCR4 y CCR5, respectivamente, o en combinación con varias de ellas,
- b) puesta en contacto del compuesto candidato con la preparación de a),
- 15 c) determinación de la inhibición de la interacción o no de la proteína FLNa con las otras proteínas mencionadas, y
- d) la identificación de un inhibidor de la interacción de la proteína FLNa con las mencionadas proteínas cuando no se observa dicha interacción.

20 Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que CD4 y los dos principales co-receptores del VIH-1, CXCR4 y CCR5, interaccionan con la proteína dimérica de unión a actina, filamina A (en adelante, FLNa) regulando de esta manera su agrupamiento en la superficie celular. La unión de FLNa a estos receptores es necesaria para que la proteína gp120 del VIH-1 inicie la cascada de señalización RhoA \leftrightarrow ROCK \leftrightarrow LIMK \leftrightarrow cofilin, integrando de esta manera la unión de la proteína Env a los receptores celulares virales con las señales que controlan el remodelado de F-actina. Más aún, se ha demostrado que el bloqueo de la interacción de FLNa con los receptores del VIH-1 impide la concentración del complejo Env/CD4/co-receptor en la sinapsis viral e inhibe la infección por cepas virales X4 y R5.

30 De esta forma se puede afirmar que la proteína FLNa es un adaptador estructural y funcional para CD4 y CXCR4 que organiza el reordenamiento de F-actina necesario para que se produzca el agrupamiento de los receptores del VIH-1, en la zona de sinapsis del VIH-1, y la infección celular por HIV-1, especialmente en los estadios iniciales de la infección. Estos resultados identifican a FLNa como una diana terapéutica para el tratamiento y prevención de la infección por el virus del VIH-1. Estos datos muestran sorprendentemente una función previamente desconocida para la proteína FLNa en la entrada del VIH-1, e identifica un mecanismo celular que es usurpado por el virus durante los estadios iniciales de la infección.

En este sentido, se identificó la repetición 10 de FLNa (FLNa^{D10}, residuos 1158-1252: SEQ ID NO1) como el dominio mínimo de FLNa que retiene la capacidad de interacción con CD4IC (Figura 3a), lo que sugirió que FLNa^{D10} interacciona con CD4 *in vivo*. Y más concretamente, se identificaron tres residuos en el dominio 10 (E¹²¹⁷, F¹²⁴³ y S¹²⁴⁵) que diferían de las secuencias del resto de los dominios de FLNa en el alineamiento global. Mediante análisis de mutagénesis se identificaron los residuos F¹²⁴³ y S¹²⁴⁵ del ordenamiento F-P-S específico de la repetición 10 como críticos para la unión de FLNa con CD4. El motivo F-P-S implicado en la unión de FLNa con CD4 está en la cara opuesta de esta superficie común de interacción. El análisis bioinformática identificó, con una alta probabilidad, que el residuo F de este motivo está implicado en la unión con el ligando. Esto sugiere que las hojas β A y B, que comprenden la secuencia F-P-S, representarían una superficie adicional de unión en la repetición 10 de FLNa con CD4 (Figura 3d).

El motivo de CD4 implicado en la unión con FLNa es compartido por CXCR4, lo que sugiere que existe un determinante molecular común para la interacción con FLNa. En este sentido, se identificó el sitio de unión de CD4 a FLNa dentro de los residuos 415-421 de CD4, cerca del motivo di-leucina implicado en la endocitosis de CD4, y más concretamente, se observó que los aminoácidos E⁴¹⁶-K⁴¹⁷, localizados cerca del motivo implicado en la internalización de CD4 L⁴¹³L⁴¹⁴ (31), son críticos en el motivo de CD4 que interacciona con FLNa.

La interacción de CD4 y CXCR4 con la repetición FLNa^{D10} es sorprendente, ya que la mayoría de las más de 30 proteínas conocidas, sino todas, que se unen directamente con FLNa lo hacen en una región comprendida entre la repetición 15 a la 24.

El bloqueo específico de la interacción CXCR4-FLNa por la sobre-expresión del fragmento de FLNa que contenía los dominios 10-12 (FLNa^{D10-12}) inhibió la quimiotaxis en células Jurkat (Figura 5e). Estos resultados indican que FLNa es necesaria para activar vías de señalización específicas mediadas por CXCR4. Además, el bloqueo de la interacción entre FLNa y los receptores del VIH-1 previene la activación de RhoA inducida por la unión de la envuelta viral, un paso clave para que se produzca la remodelación de F-actina necesaria para la infección viral. En este mismo sentido, se analizó la fusión inducida por la Env en células diana que sobre-expresaban el fragmento FLNa^{D10-12}, el cual bloquea específicamente la interacción de CD4 y CXCR4. El bloqueo de la interacción de FLNa con los receptores del VIH-1 inhibió fuertemente la fusión entre las células HEK-293CD4 y las células que expresaban Env (Figura 6c). Por el contrario, la expresión del fragmento FLNa^{D8-9} o del mutante de intercambio FLNa^{D10(F1243S, S1245F)} no afectó a la fusión mediada por Env (Figura 6c). Estos datos implican fuertemente a FLNa como una molécula clave en los estadios iniciales de la infección por VIH-1, regulando la función de los receptores CD4 y CXCR4.

Además, como se predijo por el análisis de secuencia, el ensayo de dos híbridos demostró que el dominio 10 de FLNa (FLNa^{D10}) interactuaba con CXCR4 pero no con CCR5, un receptor en que no se había detectado dicho motivo (Figura 5a). Sin embargo, se observó que CCR5 se une a un fragmento de FLNa que contiene las repeticiones 13-16 de la proteína (Figura 9).

El segundo descubrimiento importante de la presente invención es la identificación de una cascada de señalización mediada por RhoA que tiene lugar en los pasos iniciales de la infección por el VIH-1. Los resultados indican que la unión de gp120 a los receptores celulares del virus induce la cascada de señalización RhoA/ROCK/LIMK/cofilina en líneas celulares y en linfocitos primarios. La inhibición de ROCK disminuye la fusión célula-célula mediada por gp41, lo que evidencia la importancia de esta ruta en el proceso de infección viral; por el contrario, el bloqueo de PAK-1, otra molécula efectora de LIMK, no tiene ningún efecto sobre la fusión mediada por la envuelta, aunque PAK-1 se ha visto implicado en otros pasos del ciclo del VIH-1 (39, 40). Estos resultados confirman y amplían la implicación de RhoA, pero no de Rac, en la infección por el VIH-1 (18), y apuntan a los inhibidores de FLNa y de ROCK como drogas potenciales para inhibir la infección del virus.

En resumen, se ha identificado que la proteína FLNa es una diana terapéutica para la identificación de compuestos, que al inhibir su interacción de FLNa con CD4 y con los co-receptores del VIH-1 (CXCR4 y CCR5), se convierten en inhibidores de la entrada celular del VIH-1 y, por tanto, útiles como medicamentos para la prevención y tratamiento de la infección del VIH-1. Estos inhibidores impedirían la unión de los receptores de VIH-1 al citoesqueleto de actina, así como la iniciación de una cascada de señalización implicada en la remodelación de F-actina tras la activación de los receptores del VIH-1 por la envuelta viral.

CD4, CXCR4 y CCR5 co-agregan en la sinapsis inmunológica formada entre una célula T y una célula presentadora de antígeno; dicha co-agregación de receptores es importante para la co-estimulación de la célula T (45). Es por tanto posible especular que el VIH-1 podría desarrollar un mecanismo dependiente de FLNa implicado en la activación de la célula T para la posterior entrada en la célula diana. Igualmente, el conocimiento detallado de los residuos implicados en dicha interacción -ya sea FLNa-CD4, FLNa-CXCR4 o FLNa-CCR5- entre las cuatro proteínas permite utilizar una familia de péptidos o proteínas que inhiben dicha interacción -constituidas o que comprenden la región mínima implicada en dichas interacciones- como medicamentos para la prevención y tratamiento de la infección del VIH-1 y, de forma más general, para la prevención y tratamiento de enfermedades que cursan con la inducción o estimulación de la respuesta inmune a partir de la interacción entre un linfocito T y una célula presentadora de antígeno. En este mismo sentido, las secuencias de nucleótidos que codifican dichos péptidos o proteínas pueden ser utilizadas para la producción de las mismas así como medicamentos en aproximaciones de terapia génica de la infección del VIH-1. En este sentido, son útiles como inhibidores de la infección de VIH-1 y potencialmente podrían actuar como inmunosupresores en situaciones de hiperactivación del sistema inmune tales como enfermedades autoinmunes, o rechazo de trasplantes, además de las descritas, secuencias de nucleótidos que inhiban la expresión intracelular endógena de la proteína FLNa en células del sistema inmune.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína FLNa (en adelante, FLNa), en adelante uso de un compuesto inhibidor de la presente invención, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de la infección por VIH-1 y de enfermedades que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa” se refiere a una molécula que inhibe la estimulación de la respuesta inmune a partir de la interacción entre un linfocito T y una célula presentadora de antígeno, o que inhibe la intensidad o disminuye la duración de la actividad inductora de la infección de VIH-1 de la proteína FLNa tal como se ha descrito en la presente invención. Un compuesto inhibidor puede estar constituido por un péptido, una proteína o una secuencia de nucleótidos, moléculas que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad FLNa, un anticuerpo, así como un compuesto químico. En esta definición de inhibidor se incluye además aquellos compuestos que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína FLNa humana, es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm y la modificación post-traducciona de la proteína. En este sentido cualquier péptido o proteína constituida o que comprenda los dominios mínimos de las proteínas FLNa, CD4, CXCR4 o CCR5 que permitan su interacción - FLNa-CD4 ó FLNa-CXCR4 o FLNa-CCR5 - pueden convertirse en antagonista de la misma y constituir un fármaco para el tratamiento de la infección del VIH-1.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “virus VIH-1” se refiere a cualquiera de las cepas existentes del virus VIH-1 y VIH-2.

Así, un objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos como compuesto inhibidor, en adelante secuencia de nucleótidos FLNa de la presente invención, que permite la expresión de una proteína o péptido en células humanas, y que está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio 10 de la FLNa humana (FLNa^{D10}) de SEQ ID NO1,

ES 2 319 838 B1

- b) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio 13-16 de la FLNa humana (FLNa^{D13-16}) de SEQ ID NO9,
- c) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a) y b),
- d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

5

10

15

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia mostrada en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que permita la codificación de un péptido o proteína capaz de inhibir la actividad FLNa de la proteína FLNa humana (NM 001456).

20

25

A partir de la información descrita en la presente invención 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 nucleótidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos 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%. Las formas preferentes de la secuencia de nucleótidos a utilizar son secuencias de nucleótidos de origen humano que comprendan el dominio 10 de la FLNa (FLNa^{D10}), pudiendo ser, entre otras alternativas, cualquier fragmento de la propia FLNa humana que no mantenga su actividad FLNa.

30

Tal como se utiliza en la presente invención el término “secuencia de nucleótidos” se refiere a una secuencia de DNA, cDNA o mRNA.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por el dominio mínimo de FLNa, (FLNa^{D10}) de SEQ ID NO1.

35

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos FLNa de d) está constituida por el dominio 10-12 de FLNa, (FLNa^{D10-12}) de SEQ ID NO3.

40

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos FLNa de d) está constituida por el dominio 8-10 de FLNa, (FLNa^{D8-10}) de SEQ ID NO5.

45

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por el dominio 13-16 de FLNa, (FLNa^{D13-16}) de SEQ ID NO9.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos FLNa derivada de CD4 como compuesto inhibidor que está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

50

55

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO7),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

60

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO7).

65

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos FLNa derivada de CXCR4 como compuesto inhibidor que está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO11,

ES 2 319 838 B1

- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

5

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO11.

10

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos FLNa derivada de CCR5 como compuesto inhibidor que está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

15

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO13),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

20

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO13).

25

Por otro lado, pueden existir moléculas capaces de impedir o disminuir la expresión del gen codificante de la proteína FLNa humana, es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm y la modificación post-traducciona de la proteína. A modo ilustrativo, dichas moléculas pueden ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína FLNa, o bien una secuencia de nucleótidos que codifica una ribozima específica del mRNA de la proteína FLNa, o bien una secuencia de nucleótidos que codifica un aptámero específico del mRNA de la proteína FLNa, o bien una secuencia de nucleótidos que codifica un RNA de interferencia ("small interference RNA" o siRNA) específico del mRNA de la proteína FLNa. Estas secuencias de nucleótidos mencionados pueden ser utilizadas en un proceso de terapia génica en el que mediante cualquier técnica o procedimiento se permita la integración de los mismos en las células de un paciente humano. Este objetivo puede conseguirse mediante la administración a estas células de una construcción génica que comprende una o varias de dichas secuencias de nucleótidos mencionados con el fin de transformar dichas células permitiendo su expresión en el interior de las mismas de manera que se inhiba la expresión de la proteína FLNa. Ventajosamente, dicha construcción génica puede estar incluida dentro de un vector, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia.

30

35

40

Por tanto, otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la FLNa basado en el uso de una secuencia de nucleótidos FLNa como compuesto inhibidor que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína FLNa humana constituido por una o varias secuencias de nucleótidos seleccionada entre:

45

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína FLNa,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína FLNa,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína FLNa, y
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína FLNa.

50

55

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por un ARN de interferencia (ARNi) específico de FLNa como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, los descritos en la siguiente lista: SEQ ID NO19, SEQ ID NO20; SEQ ID NO21, SEQ ID NO22, SEQ ID NO23, SEQ ID NO24; SEQ ID NO25 y SEQ ID NO26. (ver Ejemplo 2.1; Tabla III).

60

Las secuencias de nucleótidos a)-d) mencionadas previamente impiden la expresión del gen en mRNA o del mRNA en la proteína FLNa, y, por tanto, anulan su función biológica, y pueden ser desarrolladas por un experto en el sector de ingeniería genética en función del conocimiento existente en el estado del arte sobre transgénesis y anulación de la expresión génica (Clarke, A.R. (2002) Transgenesis Techniques. Principles and Protocols, 2ª Ed. Humana Press, Cardiff University; Patente US20020128220. Gleave, Martin. TRPM-2 antisense therapy; Puerta-Ferández E *et al.* (2003) Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. FEMS Microbiology Reviews 27: 75-97; Kikuchi, *et*

65

al., 2003. RNA aptamers targeted to domain II of Hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J. Biochem.* 133, 263-270; Reynolds A. *et al.*, 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22 (3): 326-330).

5 La secuencia de nucleótidos FLNa definida anteriormente como construcción génica FLNa se corresponde con una construcción génica que permite la expresión de una proteína FLNa. Esta construcción génica FLNa de la invención, también puede comprender, en caso necesario y para permitir un mejor aislamiento, detección o secreción al exterior de la célula del péptido expresado, a una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento, detección o secreción de dicho péptido. Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye una construcción génica FLNa que comprende, además de la secuencia de nucleótidos FLNa de la invención, cualquier otra secuencia de nucleótidos codificante de un péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento, la detección o la secreción al exterior de la célula celular del péptido expresado, por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, una secuencia de polihistidina (6xHis), una secuencia peptídica reconocible por un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, para su identificación, o cualquier otra que sirva para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad: péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E-tag) (Using antibodies: a laboratory manual. Ed. Harlow and David Lane (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: Tagging proteins. Pp. 347-377).

20 La secuencia de nucleótidos FLNa y la construcción génica FLNa descritas previamente 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 Aed., Cold Sping Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 vol 1-3). Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar integradas en un vector de expresión génica que permite la regulación de la expresión de la misma en condiciones adecuadas en el interior de las células.

25 Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la invención donde la secuencia de nucleótidos FLNa es un vector de expresión, en adelante vector de expresión FLNa de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos FLNa o una construcción génica FLNa, descritas en la presente invención, y que permite la expresión de una proteína o péptido capaz de inhibir la infección del VIH-1 en células humanas. Un ejemplo de una realización particular, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, lo constituyen los vectores de expresión elaborados en la presente invención: por ejemplo los retrovirus recombinantes pRV-FLNa^{D8-9}IRESGFP o pRV-FLNa^{D10-12}-IRESGFP (ver Ejemplos, Material y Métodos).

30 En general, un vector de expresión comprende, además de la secuencia de nucleótidos FLNa ó de la construcción génica FLNa descritos en la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, *pT7*, *plac*, *ptac*, *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).

55 Además, otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor es una o varias proteínas o péptidos, en adelante uso de la proteína FLNa de la presente invención, y que está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos del dominio 10 de la FLNa humana (FLNa^{D10}) (SEQ ID NO2),
- 60 b) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos del dominio 13-16 de la FLNa humana (FLNa^{D13-16}) (SEQ ID NO10),
- c) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a) y b), y
- 65 d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

ES 2 319 838 B1

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 inhibe la actividad FLNa, infección de VIH en células humanas, de la FLNa humana.

A partir de la información descrita en la presente invención y un técnico experto en el sector de la técnica puede aislar o construir una secuencia de aminoácidos análoga a las descritas en la presente invención.

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%.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor es una proteína FLNa cuya secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio 10 de la FLNa humana (FLNa^{D10}) (SEQ ID NO2).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor es una proteína FLNa cuya secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio 10-12 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D10-12}) (SEQ ID NO4).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor es una proteína FLNa cuya secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio 8-10 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D8-10}) (SEQ ID NO6).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor es una proteína FLNa cuya secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio 13-16 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D13-16}) (SEQ ID NO10).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO8),
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor es una proteína FLNa cuya secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO8).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO12,
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor es una proteína FLNa cuya secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO12.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO14),
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y

ES 2 319 838 B1

- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

5 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la invención en el que el compuesto inhibidor es una proteína FLNa cuya secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO14).

10 Por otro lado, otro objeto adicional de la presente invención lo constituye el uso de células, ya sean eucariotas -preferentemente humanas- o procariotas, en adelante células FLNa de la invención, modificadas genéticamente y que comprenden la secuencia de nucleótidos, la construcción o el vector de expresión FLNa de la invención -en donde puede expresarse de forma adecuada el péptido o proteína FLNa de la invención- para la elaboración de un compuesto inhibidor de la invención y su posterior purificación y aplicación. Estas células pueden ser transformadas, infectadas o transfectadas mediante dichas secuencias de nucleótidos por técnicas de ingeniería genética conocidas por un experto en la materia. [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. 15 Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. Los sistemas de expresión génica pueden permitir o no la integración del nuevo material genético en el genoma de la célula huésped. Estas células pueden ser útiles para la producción de los péptidos con actividad inhibitora de la infección de VIH-1 de células humanas que pueden ser la base de una composición farmacéutica.

20 Además, tanto la secuencia de nucleótidos, construcción génica o el vector de expresión FLNa pueden utilizarse como un medicamento para proteger células humanas, preferentemente células humanas del sistema inmune, en un procedimiento de tratamiento y profilaxis de terapia génica de un paciente afectado por una infección de VIH-1, en el que se lleve a cabo la expresión génica de estas secuencias de nucleótidos en las células del sistema inmune lo que permitiría que dichas células evitaran la infección por el VIH-1. Los procedimientos de terapia génica pueden 25 aplicarse directamente sobre el paciente administrándola como un medicamento una de estas mencionadas secuencias de nucleótidos, o podría extraerse de un ser humano células del sistema inmune y una vez *ex vivo* transformarlas con las secuencias de nucleótidos y posteriormente devolverlas al ser humano o mantenerlas *ex vivo* para usos posteriores.

En este mismo sentido, las proteínas o péptidos y las propias células pueden convertirse en biofármacos.

30 Por otro lado, varios de los compuestos inhibidores de la actividad FLNa, como por ejemplo los dominios mínimos de las proteínas FLNa, CD4, CXCR4 y CCR5 y las secuencias de nucleótidos codificantes de las mismas, no existen como tales en la naturaleza y han sido identificados y aislados por primera vez en la presente invención. Por lo tanto, otro objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos FLNa/dominio perteneciente, a título 35 ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- a) la secuencia de nucleótidos FLNa constituida por el dominio mínimo de FLNa, (FLNa^{D10}) de SEQ ID NO1,
- b) la secuencia de nucleótidos FLNa constituida por el dominio 10-12 de FLNa, (FLNa^{D10-12}) de SEQ ID NO3,
- 40 c) la secuencia de nucleótidos FLNa constituida por el dominio 8-10 de FLNa, (FLNa^{D8-10}) de SEQ ID NO5,
- d) la secuencia de nucleótidos FLNa constituida por el dominio 13-16 de FLNa, (FLNa^{D13-16}) de SEQ ID NO9
- 45 e) la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO7),
- f) la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CXCR4 constituido por la secuencia SEQ ID NO11,
- 50 g) la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO13)
- h) una secuencia de nucleótidos análoga a las secuencias de a), b), c), d), e), f), y g), y
- 55 i) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera de a), b), c), d), e), f), g) y h).

Además, otro objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de aminoácidos FLNa/dominio perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- 60 a) la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio mínimo de FLNa, (FLNa^{D10}) de SEQ ID NO2,
- b) la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 10-12 de FLNa, (FLNa^{D10-12}) de SEQ ID NO4,
- 65 c) la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 8-10 de FLNa, (FLNa^{D8-10}) de SEQ ID NO6,
- d) la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 13-16 de FLNa, (FLNa^{D13-16}) de SEQ ID NO10,

ES 2 319 838 B1

- e) la secuencia de aminoácidos del dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO8),
- f) la secuencia de aminoácidos del dominio de CXCR4 constituido por la secuencia SEQ ID NO12,
- 5 g) la secuencia de aminoácidos del dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO14)
- h) una secuencia de aminoácidos análoga a las secuencias de a), b), c), d), e), f), y g), y
- i) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera de a), b), c), d), e), f), g) y h).

10 Tal como se utiliza en la presente invención el término “FLNa/dominio” se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos o aminoácidos derivadas o aisladas de FLNa, CD4, CXCR4 y CCR5, por ejemplo, cualquier fragmento de dichas proteínas que no existen como tales en la naturaleza, y que sea capaz de inhibir la actividad de la proteína FLNa humana.

15 De la misma manera forma parte de la presente invención un vector de expresión génica, en adelante vector de expresión FLNa/dominio, que comprende una secuencia de nucleótidos FLNa/dominio. Igualmente, forma parte de la invención una célula, procariota o eucariota, transformada o transfectada con la secuencia de nucleótidos FLNa/dominio o con el vector de expresión FLNa/dominio.

20 Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de la infección del VIH-1 y de enfermedades que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto ó agente inhibidor de la actividad FLNa de la invención, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

25 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.

30 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de inhibir la infección de VIH-1 y de enfermedades que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune, 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.

35 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.

40 Otro objeto particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto ó agente inhibidor está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- 50 a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio 10 de la FLNa humana (FLNa^{D10}) de SEQ ID NO1,
- b) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio 13-16 de la FLNa humana (FLNa^{D13-16}) de SEQ ID NO9,
- 55 c) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

60 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio 10 de la FLNa humana (FLNa^{D10}) de SEQ ID NO1.

65 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos FLNa de d) está constituida por el dominio 10-12 de FLNa, (FLNa^{D10-12}) de SEQ ID NO3.

ES 2 319 838 B1

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos FLNa de d) está constituida por el dominio 8-10 de FLNa, (FLNa^{D8-10}) de SEQ ID NO5.

5 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por el dominio 13-16 de FLNa, (FLNa^{D13-16}) de SEQ ID NO9.

10 Otro objeto particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto ó agente inhibidor está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO8),

15 b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y

c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

20 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO8).

25 Otro objeto particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto ó agente inhibidor está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO11,

30 b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a), y

c) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

35

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO11.

40

Otro objeto particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto ó agente inhibidor está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

45 a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO13),

b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a), y

50 c) una secuencia de nucleótidos, construcción genética, que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

55 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos FLNa está constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO13).

60 Un objeto particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos FLNa como compuesto inhibidor es una secuencia de nucleótidos que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína FLNa humana y que está constituido por una o varias secuencias de nucleótidos seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína FLNa,

65 b) una ribozima específica del mRNA de la proteína FLNa,

c) un aptámero específico del mRNA de la proteína FLNa, y

ES 2 319 838 B1

d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína FLNa.

5 Otra realización particular de la presente invención lo constituye composición farmacéutica en la que la secuencia de nucleótidos de d) está constituida por un ARN de interferencia (ARNi) específico de FLNa como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, los descritos en la siguiente lista: SEQ ID NO19, SEQ ID NO20; SEQ ID NO21, SEQ ID NO22, SEQ ID NO23, SEQ ID NO24; SEQ ID NO25 y SEQ ID NO26. (ver Ejemplo 2.1; Tabla III).

10 Otra realización particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos es un vector de expresión FLNa, que comprende una o varias de las secuencia de nucleótidos FLNa descritos en la presente invención.

15 Otro objeto particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido FLNa como compuesto inhibidor está constituido por una o varias de las secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos del dominio 10 de la FLNa humana (FLNa^{D10}) (SEQ ID NO2),
- 20 b) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos del dominio 13-16 de la FLNa humana (FLNa^{D13-16}) (SEQ ID NO10),
- c) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a) y b), y
- 25 d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

30 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos del dominio 10 de la FLNa humana (FLNa^{D10}) (SEQ ID NO2).

35 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos de d) es la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 10-12 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D10-12}) (SEQ ID NO4).

40 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos de d) es la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 8-10 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D8-10}) (SEQ ID NO6).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 13-16 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D13-16}) (SEQ ID NO10).

45 Otro objeto particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido FLNa como compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO8),
- 50 b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).
- 55

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio de CD4 constituido por los residuos 415-421 (SEQ ID NO8).

60 Otro objeto particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido FLNa como compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- 65 a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO12,
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y

ES 2 319 838 B1

- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio de CXCR4 constituido por la SEQ ID NO12.

Otro objeto particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido FLNa como compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por el dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO14),
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a), y
- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos está constituida por el dominio de CCR5 constituido por los residuos 325-352 (SEQ ID NO14).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor está constituido por una combinación cualquiera de las posibles mezclas de las secuencias de nucleótidos, una combinación cualquiera de las posibles mezclas de las secuencias de aminoácidos o cualquier mezcla posible de ambos tipos de secuencias descritas en la presente invención.

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 la infección de VIH-1 o por enfermedades que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada.

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

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que la enfermedad que se trata o se previene es la infección por VIH-1.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que la enfermedad que se trata o se previene es una enfermedad que cursa con una estimulación alterada del sistema inmune perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- desorden inflamatorio agudo o crónico o un desorden inmune, por ejemplo una enfermedad autoinmune seleccionada del grupo consistente en: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, síndrome de Sjögren, diabetes autoinmune, tiroiditis, y otras enfermedades inmunes órgano-específicas, incluyendo la psoriasis;
- desorden de tipo neurológico seleccionado del siguiente grupo: esclerosis múltiple, miastenia grave, y otras enfermedades inmunes neurológicas,
- desorden de tipo gastrointestinal seleccionado del siguiente grupo: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, y hepatitis,
- desorden de tipo respiratorio seleccionado del siguiente grupo: enfisema, infecciones de las vías respiratorias,
- desorden de tipo cardiovascular seleccionado del siguiente grupo: aterosclerosis, cardiomiopatía, fiebre reumática, endocarditis, vasculitis, y otras enfermedades cardiológicas de naturaleza inmune,
- desorden de tipo alérgico o una reacción de hipersensibilidad (tipos I, II, III, y IV), incluyendo asma, rinitis, y otras reacciones de hipersensibilidad mediadas por el sistema inmune;
- desorden del tipo rechazo de un trasplante o injerto, y
- desorden o condición perteneciente al siguiente grupo: daño de pulmón agudo, síndrome de distress respiratorio agudo, artritis (p.e., CIA), bronquitis, fibrosis quística, hepatitis, enfermedad inflamatoria intestinal, daño por reperfusión, nefritis, pancreatitis, oclusión arterial, accidente cerebro-vascular, lupus eritematoso sistémico, daño inducido por luz ultravioleta, vasculitis y sarcoidosis.

Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de identificación de compuestos inhibidores de la actividad FLNa de la proteína FLNa humana, en adelante procedimiento de identificación de la invención, basado en la interacción de varias proteínas con FLNa y que comprende los siguientes pasos:

- 5 a) generar una preparación biológica que mimetice la interacción proteína-proteína que mimetice la interacción FLNa con CD4, CXCR4 y CCR5, respectivamente, o en combinación con varias de ellas,
- b) puesta en contacto del compuesto candidato con la preparación de a),
- 10 c) determinación de la inhibición de la interacción o no de la proteína FLNa con las otras proteínas mencionadas, y
- d) la identificación de un inhibidor de la interacción de la proteína FLNa con las mencionadas proteínas cuando no se observa dicha interacción.

15

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de inhibidores de la actividad FLNa donde la interacción de las proteínas mencionadas, o fragmentos de las mismas, se analiza mediante un ensayo de dos híbridos, preferentemente en levaduras, de inmunoprecipitación entre las proteínas o analizando actividades biológicas específicas de CD4, CXCR4 y CCR5.

20

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de identificación de inhibidores de la actividad FLNa donde se analiza la interacción FLNa-CD4 *in vivo* mediante inmunoprecipitación cruzada entre ambas proteínas; o mediante la activación de CD4 inducida por anticuerpos anti-CD4 y analizando posteriormente la fosforilación de FLNa en residuos de serina, o mediante la localización y tamaño del agrupamiento de CD4 en la membrana (ver Ejemplo 1 y Figura 1).

25

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de identificación de inhibidores de la actividad FLNa donde se analiza la interacción FLNa-CXCR4 en ensayos de estimulación con su ligando, CXCL12, en células que expresan de forma estable un receptor CXCR4 marcado, por ejemplo con GFP; o analizando su acción sobre los flujos de Ca² (Figura 5c) o sobre la formación de F-actina (Figura 5d) o su actividad quimiotáctica.

30

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de identificación de inhibidores de la actividad FLNa donde se analiza el papel de FLNa en la formación de la sinapsis del VIH-1 (unión adhesiva estable entre una célula que contiene una proteína de envuelta viral y la membrana de la célula huésped) mediante la formación de conjugados entre células efectoras que expresan la proteína de la envuelta viral, por ejemplo *env_{IIIb}*, y células diana que expresan CD4 y/o CXCR4 marcados, por ejemplo con GFP, y donde se analiza la acumulación de CXCR4 en la zona de contacto entre la célula diana y efectora, así como la acumulación de FLNa y actina en el sitio de contacto.

35

Por otro lado, cualquier experto medio en este sector de la técnica y con la información proporcionada en la presente invención puede desarrollar y poner a punto otros ejemplos del procedimiento de identificación de inhibidores de la actividad FLNa de la invención.

40

45 Descripción de las figuras

Figura 1. *Identificación de FLNa como una proteína de unión a CD4*. a, Se co-transfectaron levaduras con GAD-LCK (control positivo), GAD-MyoD, GAD-ALL, GAD-HCI, GAD-FLNa y GAD-p53 (control negativo) con GBD-CD4IC (396-433). Los co-transformantes se sembraron en placas de medio sin leucina ni triptófano (-LW) o en medio sin adenina, histidina, leucina y triptófano (-LHAW). El crecimiento de las levaduras se analizó después de 72 h y las colonias se ensayaron para actividad β -galactosidasa; el color azul indica la interacción específica de las dos proteínas. b, CD4 y FLNa interactúan en un ensayo de precipitación. Las proteínas GST o GST-CD4IC se incubaron con extractos totales de proteínas y se agregaron. Los paneles superiores muestran el inmunoblot de las proteínas unidas a GST y los extractos celulares (Input), usando un anticuerpo anti-FLNa; los paneles inferiores muestran la tinción del gel con azul de Coomassie (representativo de 3 experimentos). c, Co-inmuno-aislamiento de CD4 y FLNa. Las células Jurkat se incubaron con partículas magnéticas tapizadas con anti-CD4; después de la cavitación con nitrógeno, las membranas purificadas por afinidad (izquierda) y los lisados celulares (derecha) se ensayaron con anticuerpos anti-p56Lck y anti-FLNa (representativo de dos experimentos). d, Interacción de CD4 y FLNa endógenas. Cantidades iguales de lisados de células MT-2 se inmunoprecipitaron (IP) con IgG control, anticuerpos anti-CD4 o anti-FLNa, y se analizaron para CD4 y FLNa (representativo de 4 experimentos). e, La activación de CD4 inducida por anticuerpos causa la fosforilación de FLNa. Las células MT-2 se incubaron con un anticuerpo activador anti-CD4 durante los tiempos indicados, y después de lisar las células se inmunoprecipitó CD4 a partir de idénticas cantidades de extractos celulares. Estos precipitados se resolvieron en SDS-PAGE y las membranas se ensayaron secuencialmente con anticuerpos anti-fosfoserina (P-Ser), anti-FLNa y anti-CD4 (representativo de tres experimentos).

50

Figura 2. *FLNa regula el agrupamiento de CD4*. a, Co-redistribución de CD4 endógeno y FLNa. Las células Jurkat se incubaron con esferas tapizadas con IgG o anti-CD4; las células se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo anti-FLNa (rojo). Se muestra la combinación de la imágenes de transmisión y fluorescencia roja. Se muestran células

55

representativas de más de 30 analizadas en dos experimentos: barra = 10 \square m. b-e, La expresión de FLNa regula el agrupamiento de CD4. Las células A7-CD4 y M2-CD4 se incubaron secuencialmente con anticuerpos anti-CD4 y Cy2-anti-IgG de ratón (4°C), entonces se transfirieron a 37°C (b) o a 12°C (d) durante 20 min. Las células se fijaron y se analizaron por microscopía confocal. El tamaño de los agregados se cuantificó (c,e) mediante Image J a partir de las células grabadas en dos experimentos independientes (n = 85 datos de 25 células A7-CD4 a 37°C; n = 115 (20 células) M2-CD4 a 37°C; n = 64 (19 células) A7-CD4 a 12°C; n = 128 (15 células) M2-CD4 a 12°C). Barra = 5 \square m en b, d.

Figura 3. *Identificación de los residuos de FLNa que interaccionan con CD4.* a, Crecimiento de las levaduras co-transfectadas con los fragmentos de FLNa seleccionados más el CD4IC en medio -LW o -LHAW. La actividad \square -galactosidasa (colonias azules) indica la interacción entre las dos proteínas. b, Interacción *in vivo* de CD4 y FLNa^{D10}. Las células Jurkat se transfectaron con los fragmentos FLNa^{D8-9} o FLNa^{D10} fusionados a GFP, y se indujo el entrecruzamiento de CD4 mediante la incubación secuencial con gp120 y anti-gp120 (rojo). El CD4 se tiñó con un anticuerpo que reconoce el dominio intracelular de CD4 (azul), y los fragmentos de FLNa se detectaron con la fluorescencia de la GFP (verde); (n = 14 células grabadas). Barra = 10 \square m. c, Los residuos F¹²⁴³, S¹²⁴⁵ de FLNa son críticos para la interacción con CD4. La interacción se analizó por co-transfección de levaduras con mutantes puntuales de FLNa en pGAD y pGBD-CD4IC. El crecimiento y la tinción azul de las colonias confirmaron las interacciones. d, Predicción de las regiones de unión. El dominio 17 de FLNa se usó como estructura maestra para predecir los sitios de unión en múltiples alineamientos de secuencia de los 24 dominios de FLNa (ver Métodos). El panel de la izquierda muestra la superficie de unión construida con la hojas- β C y D, mientras que la región de unión predicha construida con las hojas- β A y B se muestra en el panel de la derecha (rotación de 180° en el eje Z). Los residuos predichos en la superficie de unión se muestran como espacios rellenos, así como los aminoácidos importantes en la unión a CD4. La numeración de los aminoácidos sigue la numeración PBD para la cadena A del dominio 17. Los colores indican el grado de consistencia de la predicción: en rojo están los residuos más probables, seguido del violeta; las predicciones menos consistentes se muestran en amarillo. El color cian indica los residuos implicados en la unión a CD4; el residuo F1948 del dominio 17 de FLNa se detectó con alta probabilidad, pero se muestra en cian debido a su implicación en la interacción con CD4. Los asteriscos marcan los residuos intercambiados en el dominio 10 (S¹⁹⁴⁶ en el dominio 17 corresponde a F¹²⁴³ en el dominio 10, y F¹⁹⁴⁸ en el dominio 17 corresponde a S¹²⁴⁵ en el dominio 10).

Figura 4. *Identificación de los residuos de CD4 que interaccionan con FLNa.* a, Análisis de la interacción de los mutantes de CD4IC con el dominio 10 de FLNa por el sistema de dos híbridos en levaduras. Los asteriscos indican la terminación de la proteína; las sustituciones de aminoácidos individuales se indican en rojo. (+) indica crecimiento de colonias y (-) no crecimiento; todas las colonias que crecieron en medio selectivo -LHAW fueron positivas para actividad β -galactosidasa. b, FLNa y p56Lck se unen simultáneamente a CD4. Las células Jurkat se estimulaban durante 5 min con un anticuerpo anti-CD4 o no se trataron (-). Los lisados celulares se inmunoprecipitaron (IP) con anticuerpos anti-CD4 o anti-FLNa y las proteínas resueltas por SDS-PAGE analizadas con anticuerpos anti-p56Lck y anti-FLNa por inmunoblot. c, Estructura de los fragmentos de CD4 y p56Lck (código pbd 1Q68). El CD4 se muestra en gris y p56Lck en azul; la bola amarilla es la molécula de Zn²⁺ que coordina ambas proteínas. Los residuos de CD4 implicados en la interacción de FLNa se representan en sólido en verde (E⁴¹⁶) y rojo (K⁴¹⁷).

Figura 5. *FLNa interacciona con CXCR4.* a, Se co-transfectaron levaduras con GAD-FLNa^{D8-9} o GAD-FLNa^{D10} más GBD-CXCR4(314-360). Los co-transformantes se sembraron en medios selectivos -LW o -LHAW, el crecimiento se analizó a las 72 h y las colonias se ensayaron para actividad \square -galactosidasa. b, Interacción de FLNa y CXCR4 endógenos. Se inmunoprecipitaron cantidades similares de lisados celulares con IgG control o anticuerpos anti-CXCR4 o anti-FLNa, y se realizó inmunoblot con anticuerpos específicos anti-CXCR4 y anti-FLNa (n = 4 experimentos independientes). c,d, La expresión de FLNa es necesaria para señales específicas inducidas por CXCR4. Las células M2-CXCR4-GFP y A7-CXCR4-GFP se ensayaron para la movilización de Ca²⁺ inducida por CXCL12 (c) con la sonda Fluo-3,AM, o la formación de F-actina (d) medida como incorporación de faloidina. Para la movilización de Ca²⁺, se muestra un histograma representativo de tres experimentos independientes; para la formación de F-actina, los datos representan la media \pm SEM de triplicados en uno de tres experimentos. e, El bloqueo de la interacción entre FLNa y CXCR4 inhibe la quimiotaxis inducida por CXCL12. Las células MT2 transfectadas con los fragmentos de FLNa indicados se ensayaron para quimiotaxis frente a CXCL12 en ensayos de transwell. El índice de migración se calculó dividiendo el número de células que migraron en respuesta al agonista por el número de células que migraron en respuesta al medio basal para cada condición. Los datos son la media \pm SEM de un experimento representativo de tres.

Figura 6. *FLNa es necesaria para fusión célula-célula inducida por Env.* a, Las células diana HEK-293-CD4 se transfectaron con RNAi control o específicos para FLNa; a los tiempos indicados, las células diana se mezclaron con la efectora HEK-293-Env_{IIIb}. La fusión célula efectora-diana se cuantificó como la relación de actividad luciferasa renilla/firefly y los datos se expresan como porcentaje de inhibición, usando el valor para las células transfectadas con vector vacío como referencia. Los datos son media \pm SEM de triplicados en un experimento representativo de dos. b, La expresión de FLNa se analizó por inmunoblot en lisados totales de las células diana en a. El inmunoblot con anti-receptor de transferrina se usó como control de carga. c, Las células efectoras HEK-293-Env_{IIIb} se mezclaron con las células diana HEK-293-CD4 transfectadas con diferentes cantidades de vector vacío, FLNa^{D10-12}, FLNa^{D8-9} o FLNa^{D10(F1243S, S1245F)}. Los datos son media \pm SEM de triplicados en un experimento representativo de tres realizados.

Figura 7. *La formación de la sinapsis del VIH requiere la unión de FLNa a CD4 y CXCR4.* a, FLNa es necesaria para el agrupamiento del co-receptor inducida por Env. Las células A7-CD4-CXCR4-GFP, M2-CD4-CXCR4-GFP o A7-CXCR4-GFP se mezclaron con las células efectoras HEK-293-Env_{IIIb}. Los conjugados se tiñeron con anticuerpos

anti-FLNa (rojo); la tinción verde corresponde a CXCR4-GFP. b, Las señales de CD4 mediadas por FLNa son necesarias para la acumulación de CD4 y el co-receptor en la zona de contacto célula diana-efectora. Las células A7-CXCR4-GFP se transfectaron transitoriamente con CD4 silvestre o el mutante CD4 Δ 416, que no interacciona con FLNa, y entonces se mezclaron con las células HEK-293-Env^{IIIb}. Los conjugados se tiñeron con el anticuerpo anti-gp120 scFv-m9 (rojo). c, Las señales de CXCR4 regulan la redistribución de FLNa y CD4. Se formaron conjugados entre HEK-293-Env^{IIIb} y células HEK-293 que expresaban CD4-YFP (verde) no tratadas o tratadas con AMD3100; los conjugados se tiñeron con un anticuerpo anti-FLNa (rojo). (a, b y c, barra 10 \square m). En todos los casos, las imágenes son representativas de al menos 20 células en dos experimentos independientes.

10 Figura 8. *FLNa media la inactivación de ADF/cofilina por vía RhoA/ROCK inducida por gp120*. a, b, FLNa media la activación de RhoA y la inactivación de cofilina inducida por gp120. Las células HEK-293-CD4 transfectadas con el vector vacío, FLNa^{D10-12} o FLNa^{D8-9} se incubaron con microesferas tapizadas con gp120^{IIIb} durante los tiempos indicados. Cantidades idénticas de los extractos celulares se analizaron con los anticuerpos indicados. Los niveles de RhoA-GTP (activo) se analizaron por precipitación con el dominio de unión de rotekina acoplado a GST, seguido de inmunoblot con anticuerpos anti-RhoA. La cuantificación de los niveles relativos de Rho-GTP y fosfo-cofilina se muestran en b; cada punto representa la media \pm SEM de los valores de densitometría obtenidos en dos experimentos independientes. c, FLNa regula la formación de F-actina inducida por gp120. Las células en a se analizaron para la formación de F-actina midiendo la incorporación de faloidina; los datos son media \pm SEM de triplicados en un experimento representativo de tres. d, Las vías de señalización dependientes de RhoA regulan la fusión célula-célula mediada por Env. Las células HEK-293-CD4 se transfectaron con los plásmidos de expresión indicados o se trataron con el inhibidor de ROCK Y-27632 o con el antagonista de CXCR4 AMD3100 (control). El porcentaje de inhibición se calculó usando las células no transfectadas o células tratadas con DMSO (para Y-27632) como referencias. Los datos son media \pm SEM de los valores de inhibición obtenidos en dos experimentos independientes. e, La actividad de ROCK es necesaria para la redistribución de FLNa y el co-receptor a la sinapsis del VIH inducida por Env. Se formaron conjugados entre las células efectoras y las células diana A7-CD4-CXCR4-GFP pretratadas con vehículo o Y-27632. FLNa se tiñó con anticuerpos anti-FLNa (rojo) y CXCR4 se visualizó como una proteína de fusión con GFP (verde). Se muestran células representativas (n = 15; barra 10 \square m). f, La fosforilación de cofilina y FLNa inducida por gp120 depende de la actividad de ROCK. Las células Jurkat se trataron con vehículo o Y-27632 antes de la incubación con esferas tapizadas con gp120. Se analizaron por inmunoblot cantidades iguales de lisados celulares con anticuerpos anti-fosfo-cofilina, cofilina, fosfoserina y FLNa. La migración del marcador de 250 kDa se muestra a la izquierda en las hibridaciones de fosfoserina y FLNa. g, Cuantificación de los niveles relativos de fosfo-cofilina y fosfoserina en f. Los datos son media \pm SEM de los valores de densitometría (n=3).

35 Figura 9. *FLNa se une a CCR5 y media la infección de virus R5*. a, Se co-transfectaron levaduras con los fragmentos de FLNa indicados clonados en pGAD y el pGBD-CCR5(325-352). Los co-transformantes se sembraron en medios selectivos -LW o -LHAW, el crecimiento se analizó a las 72 h. Las colonias que crecieron en el medio -LHAW fueron positivas para actividad \square -galactosidasa. b, Interacción de CCR5 y FLNa endógena. Se inmunoprecipitaron cantidades idénticas de lisados de células Jurkat-GFP-CCR5 con anticuerpos control (IgG), anti-CCR5 o anti-FLNa, y los filtros se hibridaron con anti-CCR5 y anti-FLNa (representativo de 4 experimentos independientes). c, Las células M2-GFP-CCR5 y A7-GFP-CCR5 se ensayaron para la movilización de inducida por COLS con la sonda Fluo-3,AM. Las flechas indican la estimulación con el agonista. d, Se testó la quimiotaxis de las células M2-GFP-CCR5 y A7-GFP-CCR5 frente a medio basal (barras blancas), CCL5 (barras negras) o FCS (barras rayadas) en transwells. Los datos son media \pm SEM del índice de migración para cada línea celular. e, Las células Jurkat-GFP-CCR5 se transfectaron con RNAi control o específicos de FLNa; a las 48 h, las células se infectaron con virus VIH-1 deficientes en replicación pseudotipados con las envueltas VSV-G o una envuelta R5 de un aislado clínico de un paciente infectado con VIH-1. La infección celular es proporcional a la actividad luciferasa (en unidades arbitrarias) medida en los extractos celulares. Los datos son media \pm SEM de triplicados en un experimento representativo de tres. f, La expresión de FLNa se analizó por inmunoblot en lisados totales de las células en e. La hibridación con un anticuerpo anti-actina se usó como control de carga.

50 Figura 10.- *Alineamientos de secuencia múltiples de los dominios de FLNa*. Los alineamientos se basan en la información publicada. Los aminoácidos en la repetición 10 que difieren de las secuencias restantes están indicados en rojo. El alineamiento estructural de la repetición 17 de FLNa se muestra abajo (B, residuo en un puente beta aislado; E, hoja beta extendida; G, hélice 310; T, giro unido a hidrógeno; S, hoja beta). El residuo de leucina que interacciona con fenilalanina se muestra en rojo sobre un fondo gris.

60 Figura 11.- *Alineamientos de secuencia múltiples de la región C-terminal de CXCR4 de diferentes especies*. Los nombres de las secuencias son los números SwissProt. Las dos líneas inferiores indican la secuencia y la estructura secundaria del dominio C-terminal del CD4-HUMANO (código pbd 1Q68). Los aminoácidos de CD4 en minúscula indican regiones que no alinean, mientras que los aminoácidos en el motivo compartido entre CD4 y CXCR4 se indican en mayúsculas. Los residuos E416 y K417 de CD4 implicados en la interacción con FLNa se localizan en un giro de la hélice (la nomenclatura corresponde a la estructura 1Q68; S, hoja beta; H, alpha-hélice; T, giro).

65 Figura 12.- *Regulación de la sinapsis del VIH por FLNa*. a, FLNa es necesaria para el agrupamiento de actina y el co-receptor inducido por Env. Las células que expresan FLNa A7-CD4-CXCR4-GFP, las células deficientes en FLNa M2-CD4-CXCR4-GFP, o las células A7-CXCR4-GFP se transfectaron con actina-RFP y se mezclaron con las células efectoras. Las tinciones roja y verde corresponden a actina y CXCR4, respectivamente. b, La señalización del co-receptor es necesaria para la redistribución de FLNa la zona de contacto entre la célula diana y efectora. Las

células diana A7-CD4-CXCR4-GFP se pretrataron con el antagonista de CXCR4 AMD-3100 y los conjugados con las células efectoras que expresaban Env se tiñeron con el anticuerpo anti-FLNa (rojo); CXCR4 se visualizó en verde por la fluorescencia de GFP. Barra = 10 μ m.

5 Figura 13.- *gp120 induce la activación de RhoA y la inactivación de ADF/cofilina en células diana primarias.* a, Linfocitos humanos de sangre periférica activados se incubaron con esferas de gp120 durante los tiempos indicados, e idénticas cantidades de extractos celulares se analizaron para RhoA activado en ensayos de precipitación con el dominio de unión rhotekin unido a GST. Los filtros se hibridaron con anticuerpos anti-RhoA, anti-fosfo-cofilina y cofilina. b,c, Cuantificación de los niveles relativos de RhoA-GTP y fosfo-cofilina de las células en a; cada punto
10 representa la media \pm SEM de los valores de densitometría obtenidos en dos experimentos independientes.

Figura 14.- *La actividad de ROCK es necesaria para la redistribución de actina y el co-receptor a la sinapsis del VIH inducida por Env.* Se formaron conjugados entre las células diana A7-CD4-CXCR4-GFP no tratadas o tratadas con el inhibidor Y-27632, y las células efectoras. Actina se tiñó con faloidina-rodamina (rojo) y CXCR4 se visualizó
15 como proteína de fusión con GFP (verde). Las células mostradas son representativas de 22 (barra = 10 μ m).

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

20 *Identificación del dominio mínimo de la proteína FLNa y CD4 o CXCR4, respectivamente, implicados en la interacción entre estas proteínas*

1.1.- CD4 interacciona con FLNa

25 Para identificar nuevas proteínas de interacción con CD4, se analizó la unión de proteínas codificadas por una librería de expresión de cADN generada en la línea celular T Jurkat con el dominio intracelular de CD4 (CD4IC) mediante un ensayo de dos híbridos en levaduras. La secuenciación de los clones positivos identificó proteínas previamente descritas (p56Lck) y algunas nuevas proteínas de interacción con CD4 previamente no descritas, como un
30 fragmento del inhibidor de la familia MyoD (Gen Bank Acceso Number: BC007836), una proteína que contenía el dominio I-mfa (HIC; AY196485), la proteína kinasa 2 que interacciona con homeodominios (HIPK2; NM-O22740), y dos clones independientes de la proteína de unión a actina FLNa (NM-001456). La especificidad de la interacción se verificó por transformación “uno a uno”; la co-transfección del CD4IC con MyoD, HIC, HIPK2 o FLNa confirió a las colonias transformadas la capacidad para crecer en medio sin adenosina, histidina, triptófano y leucina, y para teñirse
35 de azul en un ensayo de α -galactosidasa (Figura 1a). De estas proteínas nuevas de unión a CD4 se decidió analizar a FLNa.

El fragmento de cADN de FLNa rescatado en el ensayo de dos híbridos codificaba para los aminoácidos 968-1252, correspondientes a las repeticiones 8-10 de FLNa. Para examinar la interacción FLNa-CD4, se probó la unión
40 de la proteína de fusión CD4IC-GST (glutathion S-transferasa) con FLNa en lisados celulares totales de células Jurkat. CD4IC-GST, pero no GST, interaccionó eficientemente con la proteína FLNa en los lisados (Figura 1b). También se comprobó que la proteína CD4 interaccionaba con el fragmento de FLNa (968-1252) fusionado a GST (no mostrado).

Se analizó la interacción FLNa-CD4 *in vivo* mediante el aislamiento por afinidad de membranas celulares que
45 contenían CD4, usando microesferas magnéticas tapizadas con anticuerpos anti-CD4 después de la cavitación con nitrógeno de células Jurkat. En células no estimuladas, p56Lck y una pequeña fracción de FLNa co-precipitaron con las microesferas de anti-CD4; el entrecruzamiento de CD4 aumentó la co-purificación de FLNa con CD4 y p56Lck (Figura 1c). Se confirmó la interacción directa de FLNa y CD4 mediante inmunoprecipitación cruzada (Figura 1d). La activación de CD4 inducida por anticuerpos causó la fosforilación de FLNa en residuos de serina (Figura 1e), pero no
50 en tirosinas (no mostrado), aunque se ha descrito que FLNa es un sustrato de p56Lck *in vitro* (25). En conjunto, estos resultados indican que CD4 interacciona con FLNa *in vivo*.

1.2.- FLNa regula el agrupamiento de CD4

55 Ya que el agrupamiento de CD4 depende de la integridad del citoesqueleto de actina (11), se estudió el efecto de la expresión de FLNa en la movilidad de CD4. Primero se analizó la distribución de FLNa y CD4 expresadas de forma endógena en células Jurkat incubadas con microesferas tapizadas con anticuerpos anti-CD4. En el 98% de los conjugados microesfera-célula, la tinción de FLNa se concentró en la zona de contacto entre la célula que expresa CD4 y la microesfera (Figura 2a). A continuación se estudió el agrupamiento de CD4 en células M2 (células
60 deficientes en FLNa) y A7 (in clon de M2 que expresan establemente FLNa (26)) transfectadas ambas con CD4. El tamaño de los agregados de CD4 a 37°C estaba fuertemente reducido en las células M2-CD4 comparado con las células A7-CD4 (Figura 2b). La cuantificación de los datos demostró que en las células M2-CD4, CD4 se distribuyó en pequeños agregados con un área media de $0,32 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$, mientras que el tamaño medio de los agregados de CD4 en las células A7-CD4 fue de $1,125 \pm 0,22 \mu\text{m}^2$. El rango de tamaño de los agregados de CD4 también fue
65 significativamente diferente entre las células M2 y A7 ($\chi^2 = 27,5$, $p = 0,001$, 4 grados de libertad; Figura 2c). Cuando el entrecruzamiento se realizó a 12°C, una temperatura en la que se impide el metabolismo celular (27), el tamaño de los agregados de CD4 fue similar entre las células M2 y A7 (áreas medias: $0,146 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ para M2-CD4; $0,155 \pm 0,022 \mu\text{m}^2$ para A7-CD4; Figura 2d, e).

1.3.- Caracterización de la región de FLNa que interacciona con CD4

Se examinó la capacidad de mutantes de acortamiento de FLNa para interaccionar con el CD4IC usando el sistema de dos híbridos, y se identificó la repetición 10 de FLNa (FLNa^{D10}, residuos 1158-1252) como el dominio mínimo de FLNa que retenía la interacción con CD4IC (Figura 3a). Todos los mutantes de acortamiento que carecían de esta repetición perdían la interacción con CD4IC (no mostrado). El dominio GFP- FLNa^{D10} co-localizó con los complejos CD4-gp120, mientras que la distribución del fragmento GFP- FLNa^{D8-9} fue nucleocitosólica y no co-localizó con CD4-gp120 (Figura 3b); esto sugirió que FLNa^{D10} interacciona con CD4 *in vivo*. El análisis de la secuencia de los 24 dominios usando la información estructural del complejo entre el dominio 17 de FLNa y la proteína GPIIb α (28), identificó tres residuos en el dominio 10 (E¹²¹⁷, F¹²⁴³ y S¹²⁴⁵) que diferían de las secuencias del resto de los dominios de FLNa en el alineamiento global (Figura 10). El remplazamiento de E1217 con prolina (FLNa^{D10(E1217P)}), el aminoácido encontrado en todos los otros dominios, no afectó a la interacción FLNa-CD4 (Figura 3c). El ordenamiento específico de los residuos F1243 y S1245 en el dominio 10 (F¹²⁴³P¹²⁴⁴S¹²⁴⁵) difiere del motivo "clásico" serina-prolina-fenilalanina (S-P-F) encontrado en las otras repeticiones (Figura 10). Se encontró que un mutante de intercambio, en el que los residuos F¹²⁴³ y S¹²⁴⁵ se cambiaron para originar el ordenamiento S-P-F (FLNa^{D10(F1243S, S1245F)}), perdió la interacción con CD4IC (Figura 3c).

Se usó la estructura del dominio 17 de FLNa para modelizar el dominio 10 (usando los servidores WHATIF y SWISSMODEL) y estimar las superficies de interacción (29). Se predijeron con alta probabilidad dos regiones principales como importantes en la unión a otras proteínas. Una implicó las hojas β C y D, las cuales interaccionan con GPIIb α y la el dominio citosólico de la integrina β 7 (28, 30); esta se consideró la superficie de unión general (30). La segunda superficie de interacción implicaba las hojas β A y B e incluía los residuos F¹²⁴³P¹²⁴⁴S¹²⁴⁵ que se habían predicho en la interacción con CD4 (Figura 3d). La predicción de esta segunda superficie de interacción sustenta por tanto la unión FLNa-CD4.

1.4.- Identificación de residuos de CD4 que interaccionan con FLNa

Para localizar la región de CD4 responsable de la interacción con FLNa, se combinó el análisis de secuencias con mutagénesis dirigida (Figura 4a). Se analizó la interacción de tres mutantes en los cuales se habían eliminado partes del C-terminal (CD4IC Δ 429, CD4IC Δ 421 y CD4IC Δ 416) con FLNa^{D10} usando el sistema de dos híbridos. Este análisis identificó el sitio de unión de FLNa dentro de los residuos 415-421 de CD4, cerca del motivo di-leucina implicado en la endocitosis de CD4 (31). Esta región también se ha implicado en la interacción de CD4 con p56Lck, además del motivo conservado CxCP que dirige la unión de alta afinidad de la quinasa (32, 33). La mutación del motivo CxCP impidió la interacción de CD4IC con p56Lck, pero no con FLNa (Figura 4a). FLNa también co-precipitó con p56Lck después del entrecruzamiento de CD4 (Figura 4b), sugiriendo la unión simultánea de CD4 con p56Lck y FLNa. Basándonos en la estructura 3D disponible del complejo p56Lck-CD4 (código PDB 1Q68), se eliminó los residuos de CD4 que interaccionan con p56Lck. Esto permitió identificar los aminoácidos E416 y K417 en el giro de la α -hélice, como potenciales sitios de interacción de CD4 con FLNa por n-capping (Figura 4c). De hecho, la sustitución de E⁴¹⁶-K⁴¹⁷ por alaninas (CD4IC^{E416A,K417A}) impidió la interacción CD4-FLNa, mientras que la sustitución de los residuos 412-415 (CD4IC^{412-415A}) o K⁴¹⁸ (CD4IC^{k418A}) por alaninas no afectó la unión de FLNa (Figura 4a). Estos resultados indican que los aminoácidos E⁴¹⁶-K⁴¹⁷ son críticos en el motivo de CD4 que interacciona con FLNa.

1.5.- El dominio 10 de FLNa también interacciona con CXCR4

Se identificó en CXCR4 un pequeño motivo con carga similar al encontrado en CD4 (Figura 11); esto indujo a estudiar la posible interacción de FLNa con este co-receptor del VIH-1. Como se predijo por el análisis de secuencia, el ensayo de dos híbridos demostró que FLNa^{D10} interaccionaba con CXCR4 pero no con CCR5, un receptor en que no se había detectado dicho motivo (Figura 5a). La co-precipitación cruzada de FLNa y CXCR4 endógenos confirmó las interacciones FLNa-co-receptor *in vivo* (Figura 5b).

Para analizar la influencia de FLNa en la funcionalidad de CXCR4, se analizaron eventos de señalización mediados por CXCR4 tras la estimulación con su ligando, CXCL12, en células M2 y A7 que expresaban de forma estable un receptor CXCR4 fusionado en el C-terminal a GFP. CXCL12 indujo flujos de Ca²⁺ comparables en células M2-CXCR4 y A7-CXCR4 (Figura 5c), un evento mediado por proteínas G heterotriméricas; sin embargo, la formación de F-actina inducida por CXCL12 estaba fuertemente inhibida en las células M2-CXCR4 deficientes en FLNa (Figura 5d). El bloqueo específico de la interacción CXCR4-FLNa por la sobre-expresión del fragmento de FLNa que contenía los dominios 10-12 (FLNa^{D10-12}) inhibió la quimiotaxis en células Jurkat (Figura 5e, $p < 0,001$, t-test de Student). Estos resultados indican que FLNa es necesaria para activar vías de señalización específicas mediadas por CXCR4.

Ejemplo 2

FLNa es una molécula clave de la infección por VIH-1 y, por tanto, una diana terapéutica

2.1.- FLNa es necesaria para la infección celular por cepas X4 del VIH-1

A continuación se analizó la función de FLNa en las etapas iniciales de la infección por VIH-1. La fusión de membranas mediada por Env en células con niveles fisiológicos de CD4 y co-receptores es un proceso dependiente

de actina y de colesterol (9); sin embargo, la sobre-expresión del co-receptor suprime estos requerimientos (7). Así, se examinó la función de FLNa en la fusión de membranas disminuyendo la expresión de FLNa con pequeños ARN de interferencia (ARNi) en células HEK-293CD4, las cuales expresan CXCR4 endógeno y ectópicamente CD4 (5). Como células efectoras se usaron HEK-293 transfectadas transitoriamente con env111B, una envuelta de una cepa X4. La disminución en la expresión de FLNa en la célula diana con los ARNi específicos redujo la fusión celular mediada por Env (Figura 6a). Se observó aproximadamente un 50% de inhibición de la fusión inducida por Env a las 48h después de la transfección de las células HEK-293CD4 con los ARNi, comparado con las células transfectadas con ARNi control. Esta inhibición fue similar a la disminución en la expresión de la proteína FLNa en las células transfectadas (Figura 6b). Los resultados fueron similares en experimentos de infección con VIH-1 no replicativos pseudotipados con la envuelta X4 (no mostrado).

FLNa interacciona con muchas proteínas citosólicas y de membrana, y por tanto es posible que el efecto observado en los experimentos de ARNi pudieran ser independientes de la interacción de FLNa con CD4 y CXCR4. Por tanto, se analizó la fusión inducida por la Env en células diana que sobre-expresaban el fragmento FLNa^{D10-12}, el cual bloquea específicamente la interacción de CD4 y CXCR4. El bloqueo de la interacción de FLNa con los receptores del VIH-1 inhibió consistentemente la fusión entre las células HEK-293CD4 y las células que expresaban Env (Figura 6c). Por el contrario, la expresión del fragmento FLNa^{D8-9} o del mutante de intercambio FLNa^{D10(F1243S,S1245F)} no afectó a la fusión mediada por Env (Figura 6c). Estos datos implican fuertemente a FLNa como una molécula clave en los estadios iniciales de la infección por VIH-1, regulando la función de los receptores CD4 y CXCR4.

2.1.- FLNa es necesaria para agrupar CD4 y CXCR4 en la sinapsis del VIH-1

La infección celular depende del reclutamiento de CD4 y de los co-receptores inducido por Env, lo que resulta en una unión adhesiva estable entre la célula que contiene la envuelta viral y la membrana de la célula huésped, denominada sinapsis del VIH (10, 35). Para determinar el papel de FLNa en la formación de la sinapsis del VIH, se formaron conjugados entre las células efectoras HEK-293 que expresaban *env*_{IIIIB} y las células diana M2-CD4-CXCR4-GFP o A7-CD4-CXCR4-GFP. La expresión de CXCR4-GFP en el 100% de las células diana permitió su discriminación de las células efectoras. Se encontró que la expresión de FLNa era necesaria para la acumulación de CXCR4-GFP en la zona de contacto entre la célula diana y efectora; esta polarización de CXCR4 fue paralela a la acumulación de FLNa (Figura 7a) y actina (Figura 12a) en el sitio de contacto. La redistribución de CXCR4-GFP, FLNa (Figura 7a) y actina (Figura 12a) no se observó en conjugados formados con células A7-CXCR4-GFP que no expresaban CD4. Estos resultados indicaban que la redistribución del co-receptor era dependiente de FLNa y requería la interacción de Env con CD4 y/o el co-receptor.

Para determinar cual de estas interacciones iniciaban la redistribución de los receptores, se formaron conjugados en las células diana A7-CXCR4-GFP transfectadas transitoriamente con CD4 silvestre o el mutante CD4Δ416, el cual no interacciona con FLNa. Para visualizar gp120 unido con CD4 se usó el anticuerpo m9, un Fv de única cadena (scFv) derivado de un Fab anti-gp120 (X5) con una mayor afinidad por los complejos CD4-gp120 que por gp120 sola (36). La tinción de CXCR4-GFP y del scFv m9 se concentró en la zona de contacto entre las células efectoras y las células diana que expresaban CD4 silvestre, mientras que estos marcadores mostraron una tinción difusa en las células que expresaban CD4Δ416 (Figura 7b). Estos resultados sugerían que la interacción FLNa-CD4 era necesaria para la redistribución del co-receptor durante la formación de la sinapsis del VIH-1. El tratamiento de la célula diana con el antagonista de CXCR4 AMD3100 impidió la acumulación de CXCR4-GFP y FLNa en el área de contacto entre la célula efectora y diana (Figura 12b), así como la redistribución de CD4 a dicha región (Figura 7c), indicando que las señales de CXCR4 son también necesarias para la formación de la sinapsis del VIH-1.

2.3.- FLNa organiza las señales para la remodelación de F-actina iniciadas por los receptores del VIH-1

Para estudiar el mecanismo por el cual FLNa influencia la infección celular, se analizó la activación de las RhoGTPasas inducida por la envuelta viral en células Jurkat transfectadas con distintos fragmentos de FLNa. Se simuló el entrecruzamiento de CD4 y CXCR4 con partículas tapizadas con gp120_{IIIIB}. Estudios previos con virus completos indicaron que la unión del VIH-1 induce la activación específica de RhoA (18); aquí, las microesferas tapizadas con gp120 también indujeron la activación de RhoA en las células Jurkat transfectadas con el vector vacío o con el fragmento FLNa^{D8-9}, mientras que la sobre-expresión del fragmento FLNa^{D10-12} inhibió la activación de RhoA inducida por gp120 (Figura 8a, cuantificación en 8b).

RhoA señala a través de dos efectores, mDia y p160ROCK. Una de las diana de ROCK es la quinasa LIM (LIMK), la cual a su vez fosforila e inactiva el factor de despolimerización de actina (ADF)/cofilina, lo que conduce a la estabilización de F-actina (35). Se encontró que la unión de gp120 inducía la fosforilación de cofilina en las células transfectadas con el vector vacío o con el fragmento FLNa^{D8-9}, con un pico a los 30 segundos tras la adición de gp120. La fosforilación de cofilina estaba severamente disminuida en las células que sobre-expresaban el fragmento FLNa^{D10-12}, en las que sólo se observó un ligero aumento a tiempos largos de incubación (Figura 8a, cuantificación en 8b). Compatible con las cinéticas de activación de RhoA y de fosforilación/inactivación de cofilina, la unión de gp120 aumentó los niveles de F-actina después de 30 segundos en las células que expresaban el fragmento FLNa^{D8-9}; sin embargo, en las células que sobre-expresaban el fragmento FLNa^{D10-12} se observó una pérdida neta de F-actina tras la unión de gp120 (Figura 8c). Estos resultados sugieren una función para fosforilación de cofilina inducida por gp120 en la estabilización de F-actina. La unión de gp120 a CD4 y CXCR4 también indujo la fosforilación en serinas en las células transfectadas con el vector vacío o con el fragmento FLNa^{D8-9} (Figura 8a). La fosforilación de FLNa

no se observó en las células que expresaban el fragmento FLNa^{D10-12} (Figura 8a), indicando que dicho fragmento bloqueaba efectivamente la interacción entre FLNa con CD4/CXCR4. La activación de RhoA y la fosforilación de cofilina también se observaron en linfocitos de sangre periférica (PBLs) aislados de individuos sanos incubados con las microesferas tapizadas con gp120 (Figura 13), indicando que el VIH-1 induce esta vía de señalización en células diana primarias.

La vía LIMK/cofilina puede ser iniciada por ROCK o por el efector de Rac, PAK-1. Para determinar la relevancia de estas dos quinasas en la infección por VIH-1, se realizaron ensayos de fusión usando células diana que expresaban los mutantes dominantes negativos RacN17, RhoAN19, o PAK-1,R229,H83L,H86L (PAK-DN, con mutaciones en los dominios quinasa y de unión a la GTPasa), o tratados con el inhibidor de ROCK Y-27632. La pérdida de función de Rac o PAK-1 no afectó a la fusión mediada por Env, mientras que la sobre-expresión de RhoAN19 o el tratamiento de las células diana con Y-27632 inhibieron la fusión celular (Figura 8d). El tratamiento de las células diana con Y-27632 impidió la acumulación de CXCR4, FLNa y actina en la sinapsis del VIH-1 (Figura 8e, Figura 14), e inhibió la fosforilación de cofilina y FLNa inducidas por gp120 (Figura 8f, g), indicando que estos eventos de señalización son dependientes de ROCK. Los resultados por tanto implican que la activación de la vía de señalización RhoA⇌ROCK⇌LIMK⇌cofilin de forma dependiente de FLNa, es un evento fundamental en el agrupamiento de los receptores del VIH-1 y en la fusión de membranas mediada por gp41.

2.3.- FLNa también es un cofactor necesario para la entrada de virus R5

Finalmente, se analizó si los requerimientos de FLNa para la infección por VIH-1 estaban limitados a cepas virales X4. Se usó el sistema de dos híbridos para analizar la interacción del dominio C-terminal de CCR5 (aminoácidos 325-352) con los fragmentos de FLNa que cubren los dominios 8 a 24 (Figura 9a). El análisis mostró que CCR5 interactuaba específicamente con el fragmento de FLNa que contenía las repeticiones 13-16. La co-precipitación cruzada de la FLNa endógena con CCR5 confirmó la interacción FLNa-CCR5 *in vivo* (Figura 9b). Como ocurría con CXCR4, la expresión de FLNa no reguló el flujo de Ca²⁺ mediado por CCR5 (Figura 9c). No obstante, la quimiotaxis mediada por CCR5 estaba significativamente disminuida en las células M2-CCR5-GFP (deficientes en FLNa) en comparación con las células A7-CCR5-GFP que expresaban FLNa ($p < 0,005$, t-test de Student; Figura 9d); esta reducción severa en la quimiotaxis no se observó cuando se usó suero de ternera fetal como quimioatrayente.

Para analizar la función de FLNa en la infección de virus R5, se realizaron infecciones con la variante del HIV-1 NL4.3 defectivo en replicación, pseudotipados con la envuelta R5 (LMP0608), o con la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Las células Jurkat-CCR5, una línea celular establecida que expresa CCR5 fusionado a GFP (37), se transfectaron con RNAi irrelevantes o específicos de FLNa y se usaron como diana. Se observó aproximadamente un 50% de reducción en la expresión de FLNa a las 48 horas después de la transfección con los RNAi para FLNa comparado con las células transfectadas con el RNAi control (Figura 9e). A pesar de la reducción parcial en los niveles de FLNa y la expresión no fisiológica de CCR5 en esta línea celular, los RNAi de FLNa inhibieron notablemente la infección celular con los virus R5 en comparación con las células transfectadas con los RNAi control (Figura 9f). La infección de las células diana con los virus pseudotipados con VSV-G fue comparable en ambas condiciones. Estos resultados demuestran que la expresión de FLNa también regula la entrada de cepas R5 del VIH-1 en las células diana.

Materiales y métodos

Clonaje y generación de los mutantes de CD4 y FLNa

Los plásmidos pSR α puro-CD4 y pCD4-YFP fueron proporcionados por G. Del Real (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid) y T.J. Hope (Department of Microbiology and Immunology, University of Illinois, Chicago, IL, USA), respectivamente. Los fragmentos FLNa^{D8-9} y FLNa^{D10-12} se amplificaron por PCR usando los cebadores 5'-GCGAATTCCTGGACCTCAGCAAG-3' (SEQ ID NO15)/5'-GCGGATCCGCGGGAACACGTGGGC-3' (SEQ ID NO16) y 5'-GCGAATTCCTTTGACGCATCCAAA-3' (SEQ ID NO17)/5'-GCGGATCCCTTGAAAGGACTGCCTGG-3' (SEQ ID NO18), respectivamente, y se clonaron en pEGFPN1 y pcDNA3.1. Estos fragmentos de FLNa también se subclonaron en el plásmido bicistrónico pRV-IRESGFP (Genetrix, Madrid, España). Se mutaron los aminoácidos específicos de CD4IC o FLNa^{D10} mediante el kit de mutagénesis Quick Change (Stratagene), con pares de cebadores apropiados (Tabla I) y la ADN polimerasa pfs Turbo para la amplificación por PCR. Los productos se digirieron con DpnI para eliminar las cadenas parentales. Los plásmidos resultantes se transformaron en bacterias supercompetentes *Epicurian Coli* XL1-Blue (Stratagene) y se verificó la secuencia de los clones seleccionados en el servicio de secuenciación del Centro Nacional de Biotecnología. Los mutantes de CD4 y FLNa se subclonaron en pGBKT7 y pGADT7, respectivamente, para el ensayo de dos híbridos en levaduras, y en pcDNA3.1 para la expresión en células de mamífero.

ES 2 319 838 B1

TABLA I

Cebadores de PCR usados para la generación de mutantes de CD4 y FLNa

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

Mutante	Cebador forward	Cebador Reverse
CD4IC Δ 429	5' CCCGCCTCAAATGGGGCTTT ATGTCTTCTGAAACCGCCC-3'	5' CCCCGGTTTCAGAAGACATAA AGCCCCATTTGAGGCGGG-3'
CD4IC Δ 421	5' CCCCTGAAACCGGTGAGGTT ACTGGCAGGTCTTCTTCCC-3'	5' CCCAAGAAGACCTGCCAGTAA CCTCACCGGTTTCAGCCC-3'
CD4IC Δ 416	5' CCCCTGGCAGGTCTTCTTTT AACTGAGGAGTCTTCTTCCC-3'	5' CCCAAGAGACTCCTCAGTTAA AAGAAGACCTGCCAGCCC-3'
CD4IC ^{C420A, C422A}	5' CCCCTGAAACCGGTGAGGAG CCTGAGCGGTCTTCTTCTCACT CCC-3'	5' CCCAGTGAGAAGAAGACCGCT CAGGCTCCTCACCGGTTTCAGCC C-3'
CD4IC ^{412-415A}	PCR1: 5' -CCCGCAGGTCTTCTTCTCT GCAGCTGCGGCCTTGATCTGCC C-3' PCR2: 5' -CCCATGTCTCAGATCAAGG CCGCACTCAGTGAGAAGAAGCC C-3'	PCR1: 5' -GGGCAGATCAAGGCCGCGAG CTGCAGAGAAGAAGACCTGCGG G-3' PCR2: 5' -GGGCTTCTTCTCACTGAGT GCGGCCTTGATCTGAGACATGG G-3'
CD4IC ^{K418A}	5' CCCCTCCTCAGTGAGAAGGC TACCTGCCAGTGCCCTCCC-3'	5' GGGAGGGCACTGGCAGGTAGC CTTCTCACTGAGGAGGGG-3'
CD4IC ^{E416A, K417A}	5' GGGGCACTGGCAGGTCTTCG CTGCACTGAGGAGTCTTCTTCCC -3'	5' GGGAAGAGACTCCTCAGTGCA GCGAAGACCTGCCAGTGCCCC- 3'
FLNa D10	5' -GCGAATTCTTTGACG CATCCAAA-3'	5' -GCGGATCCGCCTTGCTG GGGAAGTT-3'
FLNa D8-9	5' -GCGAATTCTTGGACCTCA GCAAG-3'	5' -GCGGATCCGCGGGAACC ACGTGGGC-3'
FLNa D10-12	5' -GCGAATTCTTTGACGCAT CCAAA-3'	5' -GCGGATCCCTTGAAAGG ACTGCCTGG-3'
FLNa D13-16	5' -CGGAATTCACAGATGCG TCCAAG-3'	5' -GCCTCGAGCTGCAAGGG GCTTCC-3'
FLNa D16-20	5' -CGGAATTCGCCCCGGAG AGGCC-3'	5' -GCGGATCCCTTAGGGG CCCCAC-3'
FLNa D20-24	5' -CGGGATCCCGAAAGAGA GCATCACC-3'	5' -GCCTCGAGTCAGGGCAC CACAAAC-3'
FLNa D10 ^(F1243S, S1245F)	5' -CCAGCCCGTGCCCAACA GTCCCTTCAAGGCGGATCCACC -3'	5' -GGTGGATCCGCCTTGAA GGGACTGTTGGGCACGGGCTGG- 3'
FLNaD10 ^(E1217P)	5' -CCCGGAAGCCCCGAGG CGAGCAGATCTCCC-3'	5' -GGGAGATCTGCTCGCCT GCGGGGCTTCCGGG-3'

Cultivo celular y transfecciones

65 Los linfocitos de sangre periférica se purificaron en gradientes de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences) y se activaron durante dos días con Fitohemaglutinina (PHA, 1 μ g/ml) e interleucina 2 (IL2, 50 ng/ml). Las células MT-2, Jurkat y las células Jurkat-CCR5-GFP (37) se mantuvieron en RPMI 1640, 10% FCS, 1 mM piruvato sódico, 2

mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomycin. Las células HEK-293 se mantuvieron en DMEM, 10% FCS, 2 mM L-glutamina y antibióticos; las células HEK-293-CD4 se cultivaron como las células HEK-293, con la adición de G418 (1 mg/ml). Las células M2 y A7 se mantuvieron como se describió (26). Las células M2 y A7 se transfirieron con SRαpuro-CD4; después de la selección con puomicina, los clones resultantes se infectaron con retrovirus recombinantes pRV-CXCR4-GFP o pRV-GFP-CCR5 (40) y las células GFP positivas se seleccionaron por citometría en un Coulter Epics Altra (Beckman Coulter). Las células se mantuvieron en G418 y puomicina, y seleccionadas por citometría de flujo cada dos meses para mantener la expresión de CXCR4 y CCR5. Las células M2 y A7 también se infectaron con los retrovirus recombinantes pRV-CXCR4-GFP o pRV-GFP-CCR5 para generar las células M2 y A7 que expresaran de forma estable estos receptores de quimioquinas. Las células HEK-293 se transfirieron transitoriamente con los fragmentos FLNa^{D8-9} y FLNa^{D10-12} clonados en pEGFPN1 y pcDNA3.1 usando JetPei (Poly Transfection). Las células Jurkat se infectaron con retrovirus recombinantes pRV-FLNa^{D8-9}IRESGFP o pRV-FLNa^{D10-12}-IRESGFP y las células infectadas se seleccionaron por citometría de flujo.

Ensayo de la librería por dos híbridos

Se construyeron cebos de CD4, CXCR4 y CCR5 mediante la amplificación del CD4IC (aminoácidos 396-433), el C-terminal de CXCR4 (aminoácidos 314-360) y el C-terminal de CCR5 (aminoácidos 325-352) por PCR con cebadores específicos (Tabla II), y los productos se subclonaron en los sitios EcoRI-SalI del vector con el dominio de unión a Ga14 (pGBKT7, Clontech). Se usó el CD4IC para investigar proteínas de unión a CD4 en una librería de cADN de Jurkat, la cual se generó con el SMART cDNA Síntesis (Clontech), fusionada al dominio de activación de Ga14 (pGADT7-Rec, Clontech). Los clones positivos se aislaron y secuenciaron, y se verificó los resultados positivos por transformación uno-contra-uno en placas de agar sin adenina, histidina, triptofano y leucina, y usando un ensayo de β-galactosidasa con X-α-Gal (Clontech) como sustrato.

TABLA II

Cebadores de PCR usados para la amplificación de los cebos usados en el ensayo de dos híbridos

Cebo	Cebador forward	Cebador Reverse
CD4IC	5' -GAGGAATTCCTGTGTCAGG TGCCGG-3'	5' -GACCTCGAGTCAAATGG GGCTACA-3'
CXCR4-Ct	5' -ATTAACCCTCACTAAAGG GAAG-3'	5' -CGGAATTCGCCAAATTTA AAACCT-3'
CCR5-Ct	5' -CGGAATTCGAGAAGTTCAGA AAC-3'	5' -CGGGATCCCAAGCCCACAGA TATTTC-3'

Los fragmentos FLNa D8-9, D10-12, D13-16, D16-20 y D20-24 se amplificaron por PCR con cebadores específicos (Tabla I) y clonados en los sitios EcoRI-BamHI (D8-9, D10-12, D16-20), EcoRI-XhoI (D13-16) y BamHI-XhoI (D20-24) del vector pGADT7. Se co-transformaron levaduras con estos fragmentos y los cebos CD4IC, CXCR4 o CCR5, y las interacciones positivas se analizaron como anteriormente.

Immunoaislamiento de fragmentos de la membrana plasmática

Se tapizaron microesferas magnéticas M-450 cabra anti- inmunoglobulinas (Ig) de ratón (Dynal) con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 (Caltag Laboratorios) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron (4°C, 2 min) células Jurkat (3 x 10⁷) con las microesferas anti-CD4 (relación microesfera/célula 1:2) en RPMI con 1% FCS. Los conjugados microesferas-células se incubaron a 37°C durante 0, 3 y 7 minutos, se lavaron en frío una vez con tampón H (10 mM Hepes sódico, pH 7.2, 250 mM sacarosa, 2 mM MgCl₂, 10 mM NaF, y 1 mM ortovanadato) y se resuspendieron en 1 ml de tampón H con 0.2 mM pervanadato y con el inhibidor de proteasas CLAP (Sigma-Aldrich). Las células se cavitaron con nitrógeno (4°C, 50 bar, 7 min) mediante una bomba de cavitación de nitrógeno (Parr Instrument Company). El homogenado se llevó hasta 10 ml con tampón H y se recogieron las microesferas con un imán (Dynal). Después de lavar 3 veces con 10 ml de tampón H (1 minuto cada uno, a 4°C), los lisados celulares se concentraron por ultracentrifugación (100,000 x g, 4°C, 20 min) en una ultracentrifuga de mesa TL100 (Beckman Coulter). Las microesferas y los concentrados celulares se analizaron por inmunoblot.

Análisis de las interacciones de FLNa *in vitro* e *in vivo*

Se realizaron ensayos de precipitación con GST incubando (4°C, 4 h) cantidades similares de GST, GST-CD4IC y GST-FLNaD8-10 inmovilizadas en esferas de GST (Amersham) con extractos de células Jurkat. Después de lavar con el tampón de lisis, las proteínas unidas se eluyeron con tampón de carga 2x y se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Una fracción de las proteínas eluidas se analizó por inmunoblot con anticuerpos anti-FLNa (Neo Markers) o anti-CD4 (Santa Cruz Biotech); el resto se tiñeron con azul de Coomassie después la electroforesis para confirmar la expresión de la proteína de fusión.

ES 2 319 838 B1

Las interacciones de FLNa *in vivo* se analizaron por inmunoprecipitación. Para la interacción con CD4, las células MT-2 (1×10^7) cultivadas en ausencia de suero se incubaron (20 min, 4°C) con el anticuerpo anti-CD4 HP2.6; a los tubos se añadió un anticuerpo anti-Ig de ratón y los tubos se transfirieron a 37°C durante los tiempos indicados. La reacción se terminó colocando los tubos en hielo y los agregados celulares se lavaron inmediatamente en tampón PBS (Phosphate Buffered Saline) frío. Las células se lisaron con tampón RIPA y 300 μ g de los extractos se inmunoprecipitaron (3 h, 4°C) con anticuerpos anti-CD4, anti-FLNa o anti-IgG de ratón (control), seguidos de la incubación (45 min, 4°C) con proteína G-Sepharosa. Las proteínas precipitadas se resolvieron en SDS-PAGE y se analizaron en inmunoblot con anticuerpos anti-CD4, anti-FLNa o anti-fosfoserina (Biosource). Para las interacciones de CXCR4 y CCR5, 2×10^7 células Jurkat-GFP-CCR5 se lisaron y 200 μ g de los extractos se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-CCR5 (MAB1801, R&D Systems), anti-CXCR4 (H118, Santa Cruz Biotech.), anti-FLNa o anti-IgG (control), seguidos de proteína G-Sepharosa. Las proteínas precipitadas se resolvieron en SDS-PAGE y se analizaron en inmunoblot con anticuerpos anti-CCR5, anti-CXCR4 y anti-FLNa.

Inmunofluorescencia y estudios confocales

Para estudiar la redistribución de los receptores a la sinapsis del VIH, las células A7 y M2 que expresaban establemente CD4 y CXCR4-GFP se mezclaron (20 min, 37°C) con células HEK-293 que expresaban la envuelta del VIH-1 Env_{IIIb}. Los complejos formados se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA, 5 min, 4°C), se permeabilizaron con Triton X-100 (0,1%, 10 min, 4°C), y se tiñeron con anticuerpos anti-FLNa, actina-Rhodamina (Molecular Probes) y el scFv-m9, seguidos por los anticuerpos secundarios adecuados marcados con fluoróforos (Jackson ImmunoResearch Laboratories). En algunos casos, las células diana se transfectaron transitoriamente con la proteína de fusión entre actina y la proteína roja fluorescente (actina-RFP; un regalo de L. Rajendran, Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany).

Para los experimentos de agrupamiento de CD4, las células A7-CD4 y M2-CD4 se incubaron (30 min, 4°C) con el anticuerpo anti-CD4 HP2.6. Después de eliminar el anticuerpo no unido, las células se incubaron (20 min) con un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Cy2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 37°C o 12°C. Las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con PFA y se analizaron diez campos aleatorios para cada condición en un confocal Leica con un objetivo 63x (NA 1.2). Las imágenes se cuantificaron usando el software de análisis Image J. En algunos experimentos, el agrupamiento de CD4 se indujo incubando (relación 1:1) las células Jurkat con microesferas carboxiladas de 4,5 μ m (Polysciences, Inc.) tapizadas con anticuerpos anti-CD4. Las células se fijaron con PFA, se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos anti-FLNa y anticuerpos secundarios marcados con Cy3.

Ensayos de movilización de calcio

2×10^6 células M2 y A7 que expresaban CXCR4-GFP y GFP-CCR5 se incubaron con Fluo-3,AM (Molecular Probes) (300 mM in DMSO, 10 μ l/106 células). Las células se resuspendieron en medio completo con 2 mM CaCl₂, y se mantuvieron a 37°C hasta la adición de CXCL12 o CCL5 (20 nM, Peprotech). La liberación de Ca²⁺ se determinó (37°C, 525 nm) en un citómetro de flujo EPICS XL (Beckman Coulter).

Ensayos de quimiotaxis

Para analizar la función de FLNa en la quimiotaxis inducida por CXCR4, las células MT-2 se transfectaron transitoriamente con GFP, GFP-FLNa^{D8-9} o GFP-FLNa^{D10-12}, y las células verdes se seleccionaron por citometría. Después de 24 h, se sembraron 3×10^5 células crecidas sin suero en la cámara superior de un "transwell" de 0,8 μ m (Costar); las cámaras se rellenaron con medio libre de suero sólo o con CXCL12 (25 nM). Después de la incubación (4 h, 37°C), se estimó el número de células en la cámara inferior mediante citometría de flujo. Se calculó el índice de migración como el número de células que migran en respuesta a CXCL12 respecto a las que migran en respuesta al medio sin quimioatrayente. En el caso de la quimiotaxis mediada por CCR5, las células M2-CCR5-GFP y A7-CCR5-GFP crecidas en ausencia de suero se sembraron en transwells de 0,8 μ m tapizados con fibronectina; las cámaras inferiores se rellenaron de medio basal sin suero, o conteniendo CCL5 (100 nM), o conteniendo 1% de FCS. Después de la incubación, las células en el pocillo superior se eliminaron; los filtros se tiñeron y el número de células que habían migrado se calculó como se ha descrito (46).

Preparación de microesferas de gp120

Las microesferas tapizadas con estreptavidina (6 μ m, Polysciences, Inc.) se incubaron secuencialmente a 4°C con un fragmento Fab'2 biotinilado de un anticuerpo obtenido en conejo contra IgGs de oveja (Jackson ImmunoResearch Laboratories), un anticuerpo obtenido en oveja contra gp120 (D7324, Alto Bio Reagents) y gp120_{IIIb} recombinante (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). Los linfocitos humanos primarios activados con PHA (2×10^5) o las células Jurkat (5×10^6) infectadas con los retrovirus recombinantes para los fragmentos FLNa^{D10-12} o FLNa^{D8-9} se estimularon con las esferas de gp120 (relación 2:1 para linfocitos, 1:1 para Jurkat) durante los tiempos indicados. Para algunos experimentos, estas células se lisaron con tampón RIPA y los extractos celulares se analizaron para detectar RhoA y Rac activos por inmunoprecipitación con los dominios GST-Rhotekin y GST-PAK, respectivamente, o para inmunoblot con anticuerpos anti-RhoA, anti-Rac (Santa Cruz Biotechnology), anti-fosfoserina, anti-fosfocofilina (Biosource), cofilina (Cell Signaling) o anti-FLNa.

ES 2 319 838 B1

Formación de F-actina

Para analizar la formación de F-actina inducida por gp120, 2 x 10⁵ células Jurkat que expresaban los fragmentos FLNa^{D10-12} o FLNa^{D8-9} en RPMI 1640/1% FCS/10 mM Hepes (pH 7.5), se estimularon con las esferas de gp120 a los
5 tiempos indicados. Se tomaron alícuotas de las células antes de la estimulación con gp120 para determinar los niveles basales de F-actina. Las células se fijaron inmediatamente con PFA, se permeabilizaron y se tiñeron (15 min, 4°C) con FITC-faloidina (Molecular Probes). La incorporación de faloidina se midió por citometría de flujo (LSR, Beckton Dickinson). Un protocolo similar se usó para medir F-actina en respuesta a CXCL12 (50 nM, 37°C) en células M2- y A7-CXCR4-GFP.

Fusión célula-célula inducida por Env

Los ensayos de fusión célula-célula se realizaron como se ha descrito (5). Básicamente, el gen *env*_{IIIB} del VIH-1 se introdujo en las células efectoras HEK-293 por infección (1 h, 37°C) con un virus vaccinia recombinante. Como
15 células diana se usaron HEK-293-CD4 transfectadas con pSC-luc, que codifica para el gen de la luciferasa firefly bajo el control del promotor 7.5 del virus vaccinia (proporcionado por D. Rodríguez, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain), y el plásmido sin promotor para la luciferasa renilla. Donde se indica, estas células también se transfectaron con un vector vacío, FLNa^{D10-12}, FLNa^{D8-9}, FLNa^{D10(F1243S,S1245F)}, RhoA-GFP, RhoAN19-GFP, Rac-GFP, RacN17-GFP, PAK-1, o PAK-DN (un regalo de M.A. del Pozo, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain). En algunos experimentos, las células diana se pretrataron con vehículo, el inhibidor de ROCK Y-27632 (10 μM, Calbiochem) o con el antagonista de CXCR4 AMD3100 (10 μM, Sigma-Aldrich) antes de mezclar con las células efectoras. Para los experimentos con RNAi, las células se co-transfectaron con un pool de duplex de RNAi específicos para FLNa (Tabla III) o control (100 nM; SMARTpool, Dharmacon), y con un duplex RNAi control marcado con Cy3 para determinar la eficiencia de transfección por citometría de flujo. El silenciamiento se confirmó
25 48 h post-transfección por inmunoblot.

TABLA III

Pool de duplex de RNAi específicos para FLNa

DUPLEX 1:	SEQ
Sense: CCAACAAGGUCAAAGUAUAUU	SEQ ID NO19
Antisense: UAUACUUUGACCUUGUUGGUU	SEQ ID NO20
DUPLEX 2:	
Sense: GCAGGAGGCUGGCGAGUAUUU	SEQ ID NO21
Antisense: AUACUCGCCAGCCUCCUGCUU	SEQ ID NO22
DUPLEX 3:	
Sense: GUAUGGAGAUGAAGAGGUAUU	SEQ ID NO23
Antisense: UACCUCUUCAUCUCCAUAUUU	SEQ ID NO24
DUPLEX 4:	
Sense: UCACAGAAAUUGACCAAGAUU	SEQ ID NO25
Antisense: UCUUGGUCAUUUCUGUGAUU	SEQ ID NO26

La fusión se realizó mezclando 10⁵ células efectoras cultivadas en 100 μg/ml de rifampicina con 2 x 10⁵ células diana (6 h, 37°C), y las actividades de la luciferasa renilla y firefly se midieron en los lisados celulares (25 mM Tris-fosfato, pH 7.8, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 8 mM MgCl₂, 15% glicerol).

Infecciones celulares con virus deficientes en replicación

El vector lentiviral pNL4.3.Luc.R-E-, obtenido del Dr. Nathaniel Landau (47) a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, se usó para la producción de pseudotipos del VIH-1 mediante la transfección transitoria de HEK-293T con las envueltas VSV-G o una envuelta R5 clonada de un aislado clínico de un paciente infectado con VIH-1 (LMP0608, GenBank DQ448819). Los sobrenadantes se obtuvieron 48 horas después de la transfección, se filtraron (0.45 μm poro) y se almacenaron congelados (-80°C) hasta su uso. Se infectaron células Jurkat-GFP-CCR5 48 horas después de la transfección con RNAi específicos de FLNa o control a un M.O.I. de 0,1. La infectividad se midió 48 horas después de la infección con un ensayo luciferasa (Promega) en un luminómetro Berthold Sirius (Berthold).

Análisis computacionales

Las secuencias completas de las proteínas CD4-Human (Uniprot) y FLNa se usaron como preguntas contra las bases de datos del NCBI, usando PSI-BLAST para conseguir todas las secuencias disponibles. Los alineamientos múltiples que se muestran se realizaron con T-COFFEE y se analizaron manualmente.

Modelos moleculares

Se generó un modelo estructural del dominio 10 de FLNa basado en la estructura disponible del dominio 17 (no mostrado). El modelo se basó en la estructura cristalina publicada del complejo FLNa-dominio 17- GPIIb α (PDB code 2BP3) y se obtuvo usando WHATIF (29) y SWISS-MODEL (49). El modelo se evaluó usando PSQS (<http://www1.jcsg.org/psqs/>) y WHATIF.

Análisis estadísticos

En los experimentos de agrupamiento de CD4, las imágenes se analizaron de forma ciega a las condiciones de tratamiento. Para cada condición experimental, se tomaron aleatoriamente imágenes confocales de 20-30 células, en al menos tres experimentos independientes. Los datos se analizaron utilizando test estadísticos apropiados; la distribución del tamaño de agregados de CD4 se analizó usando el test χ^2 , mientras que los datos de quimiotaxis se compararon usando el t-test de Student. Los valores de P que alcanzaron significación estadística se indican en el texto.

Bibliografía

1. **Dimitrov**, D. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 109-122 (2004).
2. **Mañes**, S., del **Real**, G. & **Martínez-A.**, C. Pathogens: raft hijackers. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 557-568 (2003).
3. **Liao**, Z., **Cimakasky**, L., **Hampton**, R., **Nguyen**, D. & **Hildreth**, J. Lipid rafts and HIV pathogenesis: Host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res. Human Retroviruses* 17, 1009-1019 (2001).
4. **Singer**, I. *et al.* CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells. *J. Virol.* 75, 3779- 3790 (2001).
5. del **Real**, G. *et al.* Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to non-raft membrane domains. *J. Exp. Med.* 196, 293-301 (2002).
6. **Popik**, W., **Alice**, T. & **Au**, W. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J. Virol.* 76, 4709-4722 (2002).
7. **Viard**, M. *et al.* Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J. Virol.* 76, 11584-11595 (2002).
8. **Jolly**, C. & **Sattentau**, Q. Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J. Virol.* 79, 12088-12094 (2005).
9. **Mañes**, S. *et al.* Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep.* 1, 190-196 (2000).
10. **Jolly**, C., **Kashefi**, K., **Hollinshead**, M. & **Sattentau**, Q. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J. Exp. Med.* 199, 283-293 (2004).
11. **Nguyen**, ID., **Giri**, B., **Collins**, G. & **Taub**, D. Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement. *Exp. Cell Res.* 304, 559-569 (2005).
12. **Iyengar**, S., **Hildreth**, J. & **Schwartz**, D. Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J. Virol.* 72, 5251-5255 (1998).
13. **Gallo**, S. *et al.* The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1614, 36-50 (2003).
14. **Alkhatib**, G., **Locati**, M., **Kennedy**, P., **Murphy**, P. & **Berger**, E. HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology* 234, 340-348 (1997).
15. **Salzwedel**, K., **Smith**, E., **Dey**, B. & **Berger**, E. Sequential CD4-coreceptor interactions in human immunodeficiency virus type 1 Env function: soluble CD4 activates Env for coreceptor-dependent fusion and reveals blocking activities of antibodies against cryptic conserved epitopes on gp120. *J. Virol.* 74, 326-333 (2000).

ES 2 319 838 B1

16. **Amara, A. et al.** G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophagesbimmunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* 77, 2550-2558 (2003).
17. **Pontow, S., Heyden, N., Wei, S. & Ratner, L.** Actin cytoskeletal reorganizations and coreceptor-mediated activation of rac during human immunodeficiency virus-induced cell fusion. *J. Virol.* 78, 7138-7147 (2004).
18. **del Real, G. et al.** Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity. *J. Exp. Med.* 200, 541-547 (2004).
19. **Steffens, C. & Hope, T.** Localization of CD4 and CCR5 in living cells. *J. Virol.* 77, 4985-4991 (2003).
20. **Stossel, T. et al.** Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 138-145 (2001).
21. **Weihing, R.** Actin-binding and dimerization domains of HeLa cell filamin. *Biochemistry* 27, 1865-1869 (1988).
22. **Feng, Y. & Walsh, C.** The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat. Cell Biol.* 6, 1034-1038 (2004).
23. **Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. H. & Stossel, T. P.** The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2122-8 (1999).
24. **Bellanger, J. M. et al.** The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* 2, 888-92 (2000).
25. **Pal Sharma, C. & Goldmann, W.** Phosphorylation of actin-binding protein (ABP-280; filamin) by tyrosine kinase p56lck modulates actin filament cross-linking. *Cell Biol. Int.* 28, 935-941 (2004).
26. **Cunningham, C. et al.** Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 255, 325-327 (1992).
27. **Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. & Simons, K.** Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* 141, 929-942 (1998).
28. **Nakamura, F. et al.** The structure of the GPIb-filamin A complex. *Blood* 107, 1925-1932 (2006).
29. **Fariselli, P., Pazos, F., Valencia, A. & Casadio, R.** Prediction of protein-protein interaction sites in hetero-complexes with neural networks. *Eur. J. Biochem.* 269, 1356-1361 (2002).
30. **Kiema, T. et al.** The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol Cell* 21, 337-347 (2006).
31. **Shin, J., Doyle, C., Yang, Z., Kappes, D. & Strominger, J.** Structural features of the cytoplasmic region of CD4 required for internalization. *EMBO J.* 9, 425-434 (1990).
32. **Salghetti, S., Mariani, R. & Skowronski, J.** Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 349-353 (1995).
33. **Kim, P., Sun, Z., Blacklow, S., Wagner, G. & Eck, M.** A Zinc Clasp Structure Tethers Lck to T Cell Coreceptors CD4 and CD8. *Science* 301, 1725-1728 (2003).
34. **Derdeyn, C. et al.** Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor. *J. Virol.* 75, 8605-8614 (2001).
35. **McDonald, D. et al.** Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300, 1295-1297 (2003).
36. **Zhang, M. et al.** Improved breadth and potency of an HIV-1-neutralizing human single-chain antibody by random mutagenesis and sequential antigen panning. *J. Mol. Biol.* 335, 209-219 (2004).
37. **Gómez-Moutón, C. et al.** Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J. Cell Biol.* 164, 759-768 (2004).
38. **Pudas, R., Kiema, T. R., Butler, P. J., Stewart, M. & Ylanne, J.** Structural basis for vertebrate filamin dimerization. *Structure* 13, 111-119 (2005).

ES 2 319 838 B1

39. **Lu, X. et al.** CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. *Curr. Biol.* 6, 1677-1684 (1996).

5 40. **Nguyen, D., Wolff, K., Yin, H., Caldwell, J. & Kuhen, K.L.** “UnPAKing” human immunodeficiency virus (HIV) replication: using small interfering RNA screening to identify novel cofactors and elucidate the role of group I PAKs in HIV infection. *J. Virol.* 80, 130-137 (2006).

10 41. **Ueda, K., Ohta, Y. & Hosoya, H.** The carboxy-terminal pleckstrin homology domain of ROCK interacts with filamin-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 886-890 (2003).

10 42. **Vadlamudi, R. et al.** Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat. Cell Biol.* 4, 681-690 (2002).

15 43. **Mañes, S. et al.** Mastering time and space: immune cell polarization and chemotaxis. *Semin. Immunol.* 17, 77-86 (2005).

44. **Schaeffer, E., Soros, V. & Greene, W.** Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. *J. Virol.* 78, 1375-1383 (2004).

20 45. **Molon, B. et al.** T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat. Immunol.* 6, 465-471 (2005).

46. **Mira, E. et al.** Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *J Cell Sci* 117, 1847-57 (2004).

25 47. **He, J. et al.** Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol.* 69, 6705-6711 (1995).

30 48. **Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J.** T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205-217 (2000).

30 49. **Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C.** SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385 (2003).

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína FLNa humana **caracterizado** por:

5 a) la secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio 10-12 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D10-12}), comprendida por la SEQ ID NO3,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia de a),

10 c) secuencia de nucleótidos que difieren de la a), debido a la degeneración del código genético

o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento y prevención de la infección por VIH-1 y de enfermedades que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune.

2. Uso de un compuesto inhibidor que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína FLNa humana **caracterizado** por contener al menos un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína FLNa, caracterizados por las secuencias que se especifican a continuación: SEQ ID NO19, SEQ ID NO20; SEQ ID NO21, SEQ ID NO22, SEQ ID NO23, SEQ ID NO24; SEQ ID NO25 y SEQ ID NO26.

3. Uso de un compuesto inhibidor de la proteína FLNa humana **caracterizado** por:

25 a) la secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos del dominio 10-12 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D10-12}) (SEQ ID NO4),

b) secuencias de aminoácidos con una identidad de al menos un 99%, 98%, 95%, 90%, o un 80% con la secuencia SEQ ID NO4.

4. Secuencia de nucleótidos FLNa/dominio **caracterizada** porque su expresión permite la inhibición de la actividad de FLNa y porque pertenece al siguiente grupo:

35 a) la secuencia de nucleótidos FLNa constituida por el dominio 10-12 de FLNa, (FLNa^{D10-12}) de SEQ ID NO3,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia de a),

40 c) secuencia de nucleótidos que difieren de la a) debido a la degeneración del código genético.

5. Secuencia de aminoácidos FLNa/dominio **caracterizada** porque inhibe la actividad FLNa y porque pertenece al siguiente grupo:

45 a) la secuencia de aminoácidos constituida por el dominio 10-12 de FLNa, (FLNa^{D10-12}) de SEQ ID NO4,

b) secuencias de aminoácidos con una identidad de al menos un 99%, 98%, 95%, 90%, o un 80% con las siguientes secuencias: SEQ ID NO4.

50 6. Vector de expresión génica **caracterizado** porque comprende una secuencia de nucleótidos FLNa/dominio según la reivindicación 4.

55 7. Célula, ya sea procariota o eucariota, transformada o transfectada **caracterizada** porque comprende la secuencia de nucleótidos FLNa/dominio según la reivindicación 4 o el vector de expresión FLNa/dominio según la reivindicación 6.

8. Uso de la célula según la reivindicación 7 para la fabricación de una secuencia de aminoácidos según la reivindicación 5.

60 9. Uso de la célula eucariota según la reivindicación 7 para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica de terapia génica para el tratamiento y prevención de la infección por VIH-1 y de enfermedades que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune.

65 10. Composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de la infección del VIH-1 y de enfermedades que cursen con una estimulación alterada del sistema inmune **caracterizada** porque comprende uno o varios compuestos inhibidores según las reivindicaciones 1 a la 5, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

ES 2 319 838 B1

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque el compuesto inhibidor está constituido por una o varias secuencias pertenecientes al siguiente grupo:

- a) secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante del dominio 10-12 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D10-12}), comprendida por la SEQ ID NO3,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia de a),
- c) secuencia de nucleótidos que difieren de la a), debido a la degeneración del código genético

o cualquiera de sus combinaciones.

12. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 donde el compuesto inhibidor es una secuencia de nucleótidos que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína FLNa humana **caracterizado** por contener al menos un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína FLNa, caracterizados por las secuencias que se especifican a continuación: SEQ ID NO19, SEQ ID NO20; SEQ ID NO21, SEQ ID NO22, SEQ ID NO23, SEQ ID NO24; SEQ ID NO25 y SEQ ID NO26.

13. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque el compuesto inhibidor es un vector de expresión según la reivindicación 6.

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 donde el compuesto inhibidor contiene uno de los siguientes elementos:

- a) secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos del dominio 10-12 de la proteína FLNa humana (FLNa^{D10-12}), (SEQ ID NO4),
- b) secuencias de aminoácidos con una identidad de al menos un 99%, 98%, 95%, 90%, o un 80% con la SEQ ID NO4.

15. Uso de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a la 14 en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una infección de VIH-1 o por enfermedades que cursan con una estimulación alterada del sistema inmune consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada.

16. Uso según la reivindicación 15 **caracterizado** porque la enfermedad que cursa con una estimulación alterada del sistema inmune pertenece al siguiente grupo:

- desorden inflamatorio agudo o crónico o un desorden inmune, por ejemplo una enfermedad autoinmune seleccionada del grupo consistente en: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, síndrome de Sjögren, diabetes autoinmune, tiroiditis, y otras enfermedades inmunes órgano-específicas, incluyendo la psoriasis;
- desorden de tipo neurológico seleccionado del siguiente grupo: esclerosis múltiple, miastenia grave, y otras enfermedades inmunes neurológicas,
- desorden de tipo gastrointestinal seleccionado del siguiente grupo: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, y hepatitis,
- desorden de tipo respiratorio seleccionado del siguiente grupo: enfisema, infecciones de las vías respiratorias,
- desorden de tipo cardiovascular seleccionado del siguiente grupo: aterosclerosis, cardiomiopatía, fiebre reumática, endocarditis, vasculitis, y otras enfermedades cardiológicas de naturaleza inmune,
- desorden de tipo alérgico o una reacción de hipersensibilidad (tipos I, II, III, y IV), incluyendo asma, rinitis, y otras reacciones de hipersensibilidad mediadas por el sistema inmune;
- desorden del tipo rechazo de un trasplante o injerto, y
- desorden o condición perteneciente al siguiente grupo: daño de pulmón agudo, síndrome de distress respiratorio agudo, artritis (p.e., CIA), bronquitis, fibrosis quística, hepatitis, enfermedad inflamatoria intestinal, daño por reperfusión, nefritis, pancreatitis, oclusión arterial, accidente cerebro-vascular, lupus eritematoso sistémico, daño inducido por luz ultravioleta, vasculitis y sarcoidosis.

ES 2 319 838 B1

17. Procedimiento de identificación de compuestos inhibidores de la actividad FLNa **caracterizado** porque se basa en la interacción de varias proteínas con la proteína FLNa y porque comprende los siguientes pasos:

- a) generación de una preparación biológica que mimetice la interacción proteína-proteína que mimetice la interacción FLNa con CD4, CXCR4 y CCR5, respectivamente, o en combinación con varias de ellas,
- b) puesta en contacto del compuesto candidato con la preparación de a),
- c) determinación de la inhibición de la interacción o no de la proteína FLNa con las otras proteínas de a), y
- d) la identificación de un inhibidor de la interacción de la proteína FLNa con las mencionadas proteínas cuando no se observa dicha interacción.

18. Procedimiento de identificación según la reivindicación 17 **caracterizado** porque la interacción de las proteínas mencionadas, o fragmentos de las mismas, se analiza mediante un ensayo de dos híbridos, preferentemente en levaduras, de inmunoprecipitación entre las proteínas o analizando actividades biológicas específicas de CD4, CXCR4 y CCR5.

19. Procedimiento de identificación según la reivindicación 17 **caracterizado** porque la interacción FLNa-CD4 se analiza *in vivo* mediante inmunoprecipitación cruzada entre ambas proteínas; o mediante la activación de CD4 inducida por anticuerpos anti-CD4 y analizando posteriormente la fosforilación de FLNa en residuos de serina, o mediante la localización y determinación del tamaño del agrupamiento de CD4 en la membrana.

20. Procedimiento de identificación según la reivindicación 17 **caracterizado** porque la interacción FLNa-CXCR4 se analiza en ensayos de estimulación con su ligando, CXCL12, en células que expresan de forma estable un receptor CXCR4 marcado, por ejemplo con GFP; o analizando su acción sobre los flujos de Ca^{2+} o sobre la formación de F-actina o su actividad quimiotáctica.

21. Procedimiento de identificación según la reivindicación 17 **caracterizado** porque se analiza el papel de la proteína FLNa humana en la formación de la sinapsis del VIH-1 mediante la formación de conjugados entre células efectoras que expresan la proteína de la envuelta viral, por ejemplo *env_{IIIb}*, y células diana que expresan CD4 y/o CXCR4 marcados, por ejemplo con GFP, y donde se analiza la acumulación de CXCR4 en la zona de contacto entre la célula diana y efectora, así como la acumulación de FLNa y actina en el sitio de contacto.

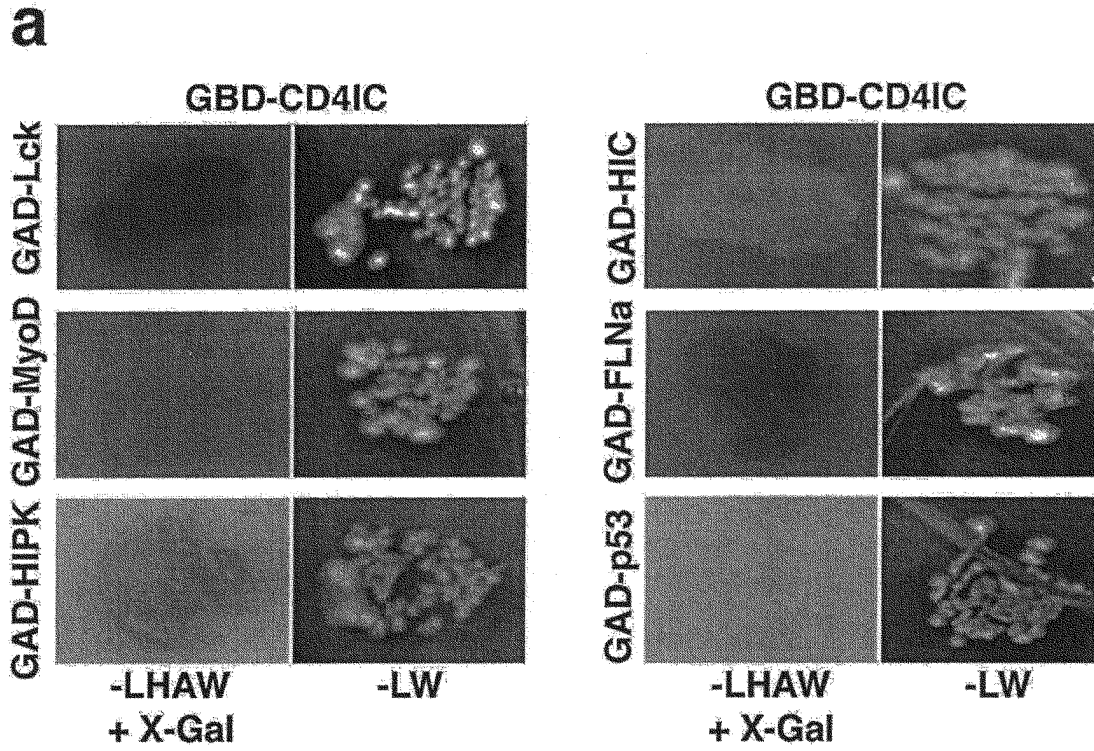


FIGURA 1.A

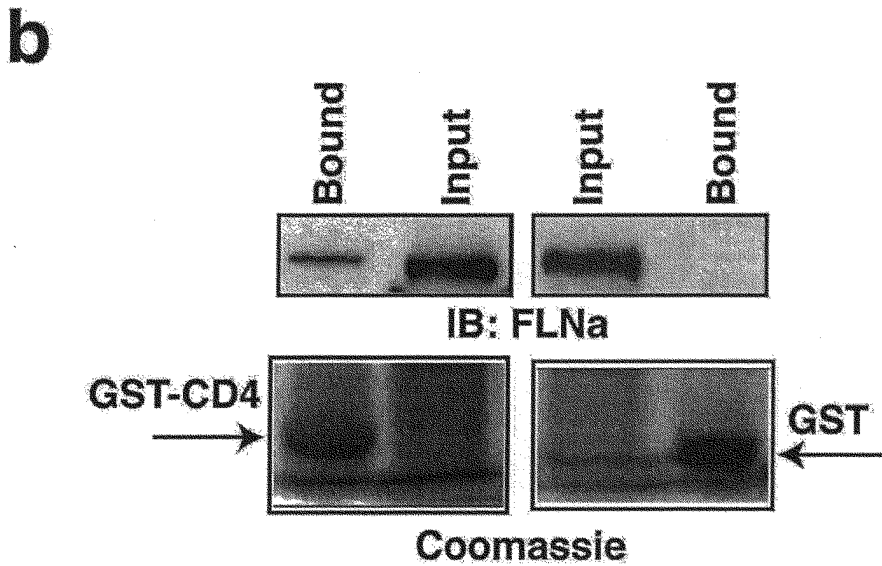


FIGURA 1.B

C

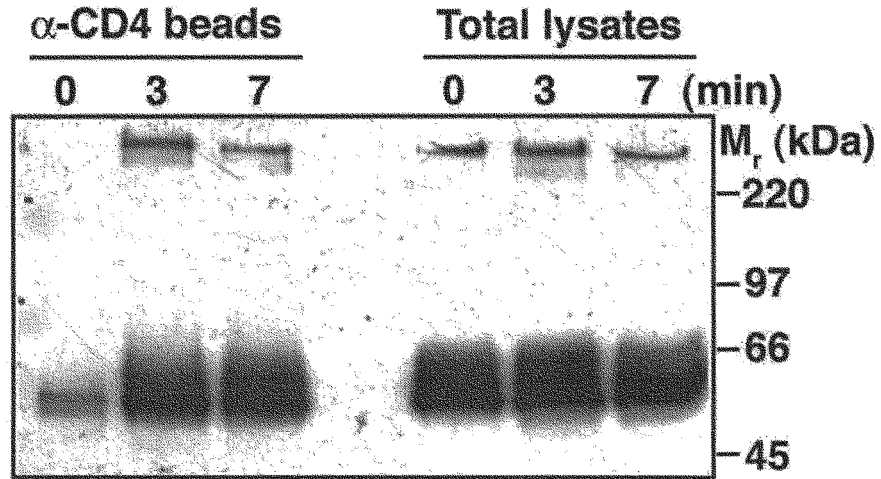


FIGURA 1.C

d

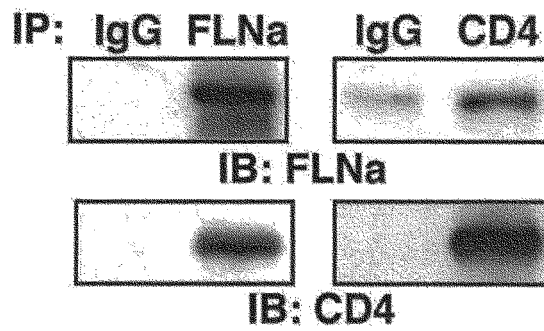


FIGURA 1.D

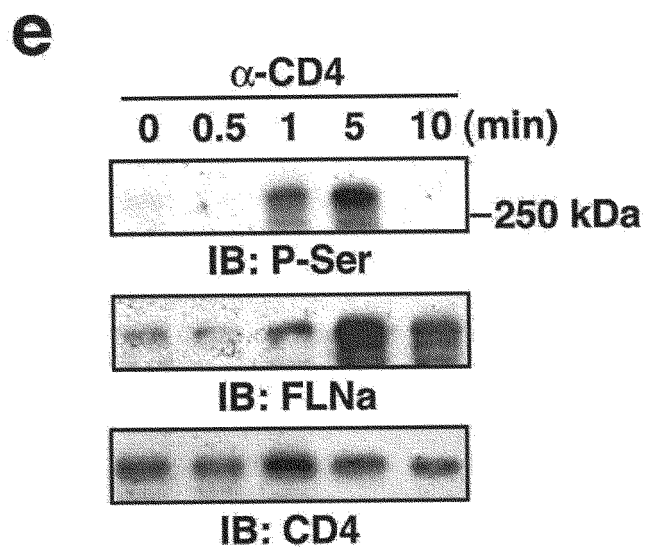


FIGURA 1.E

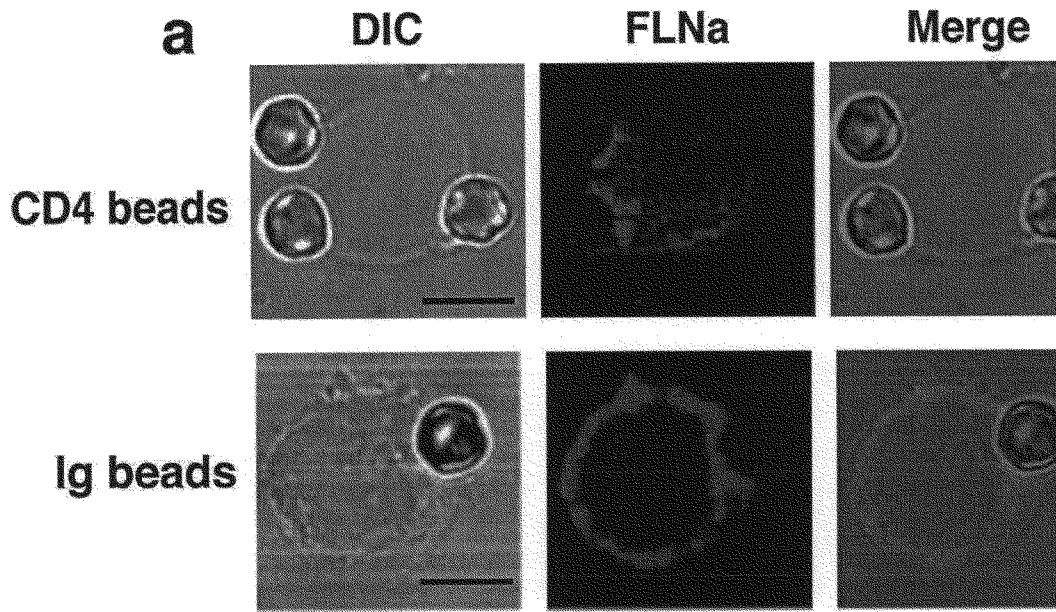


FIGURA 2.A

b

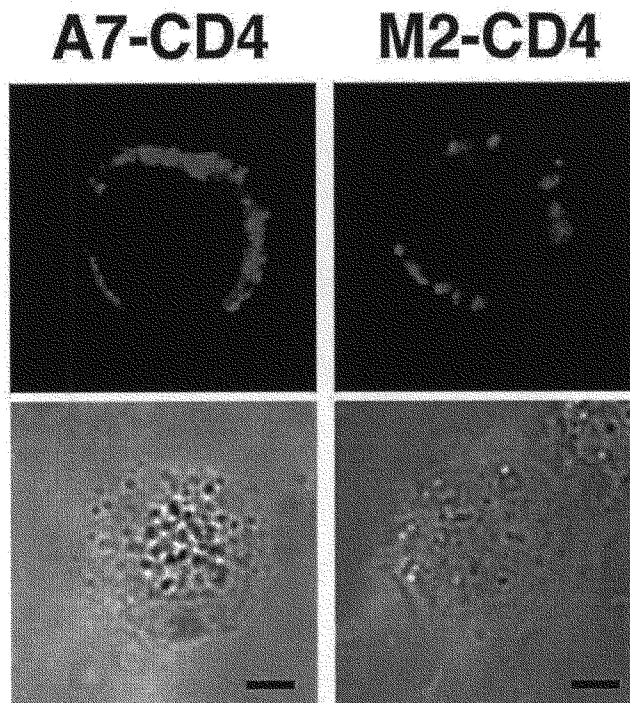


FIGURA 2.B

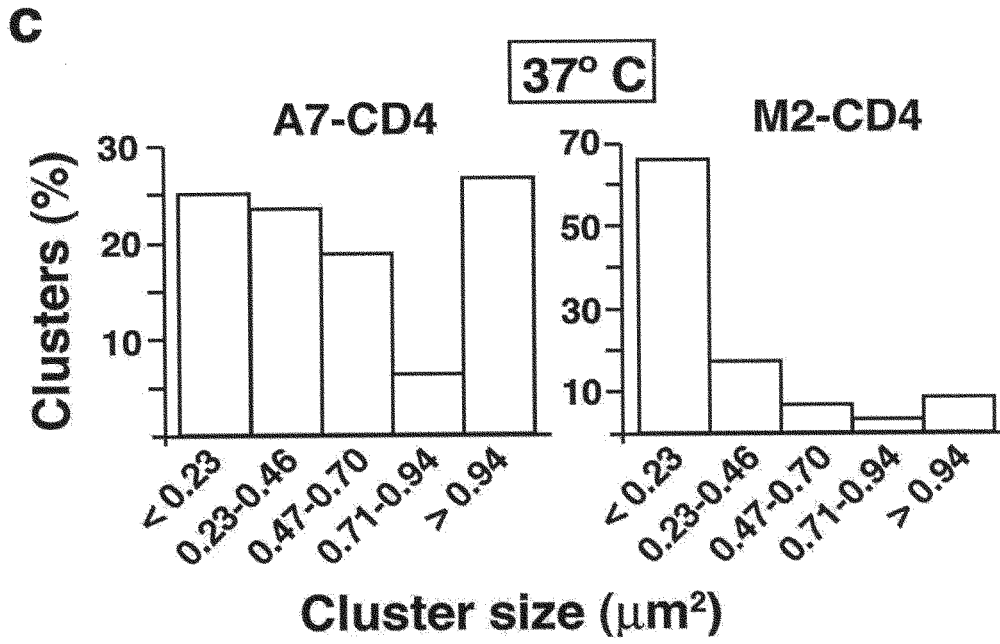


FIGURA 2.C

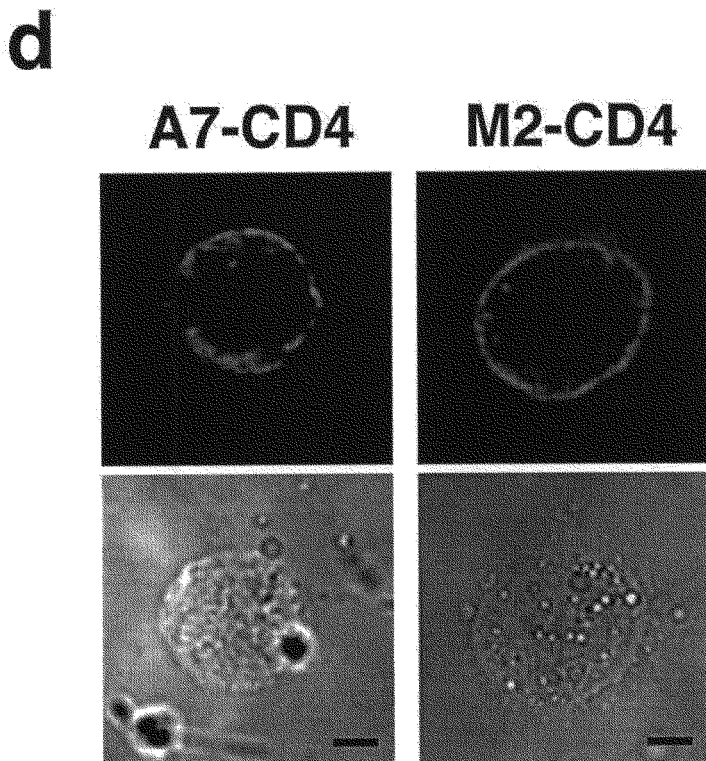


FIGURA 2.D

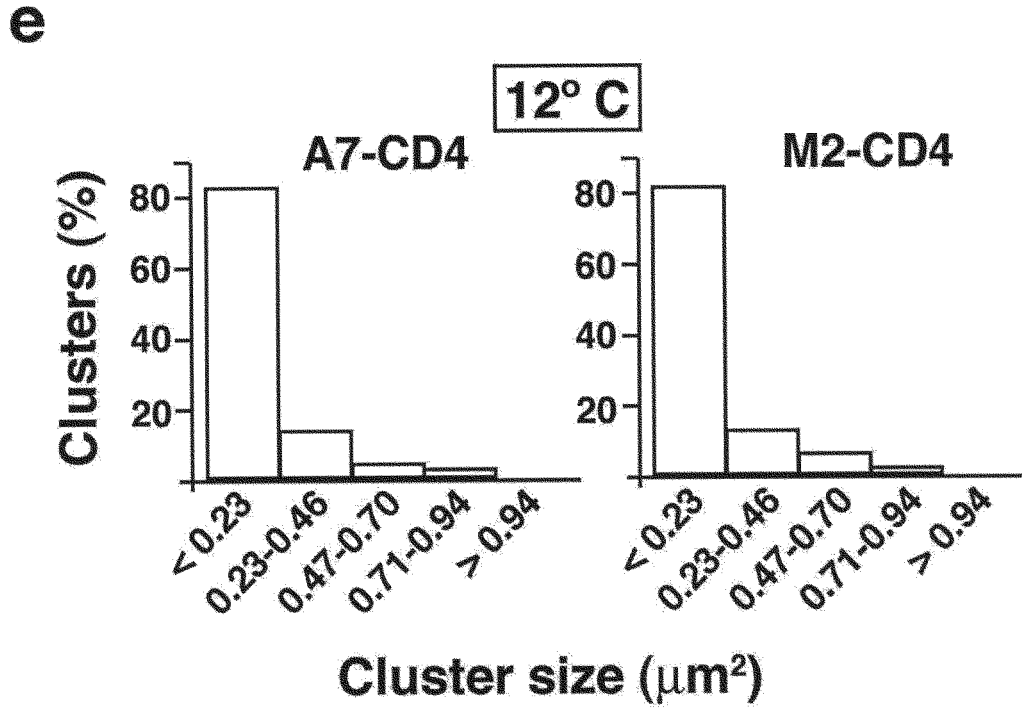


FIGURA 2.E

a

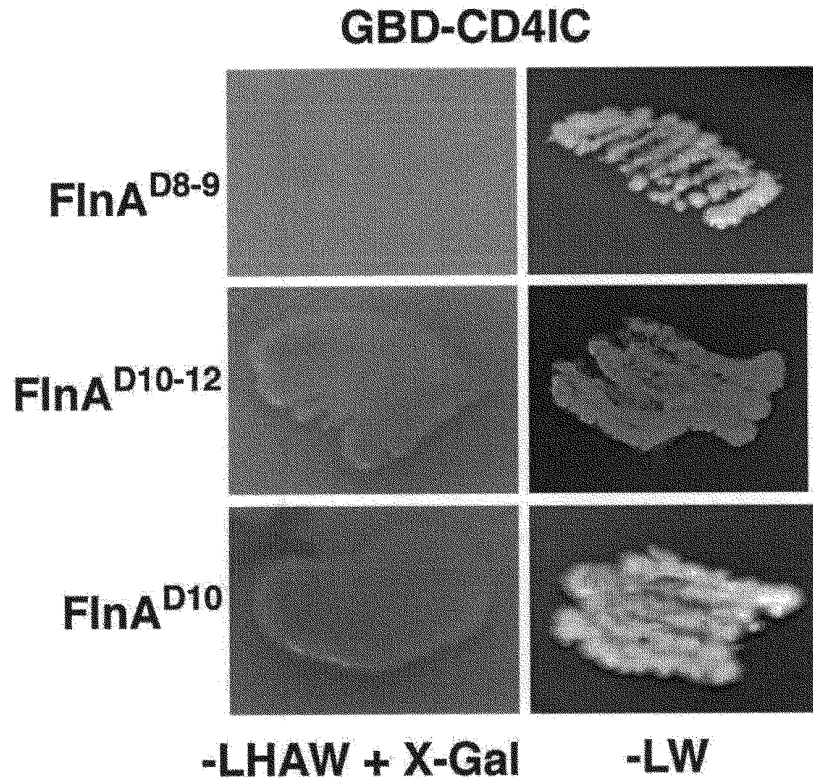


FIGURA 3.A

b

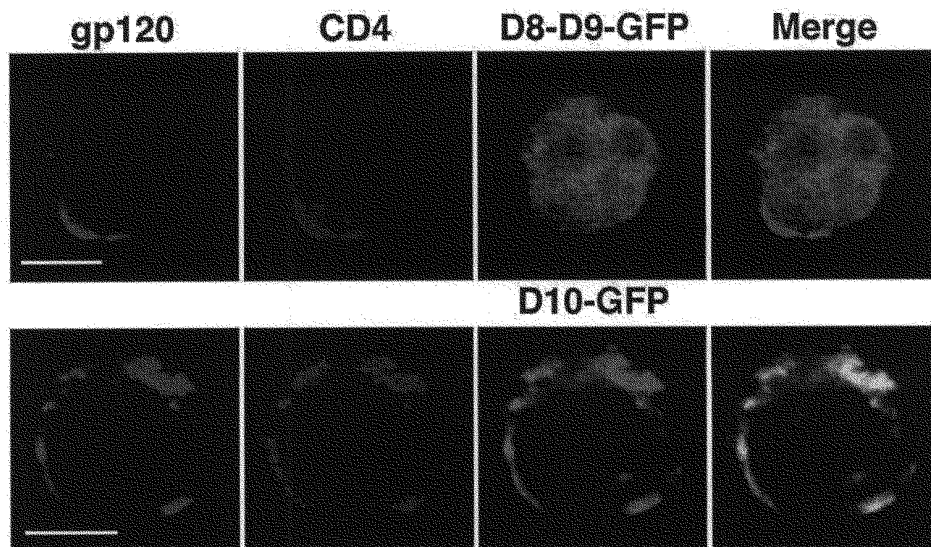


FIGURA 3.B

C

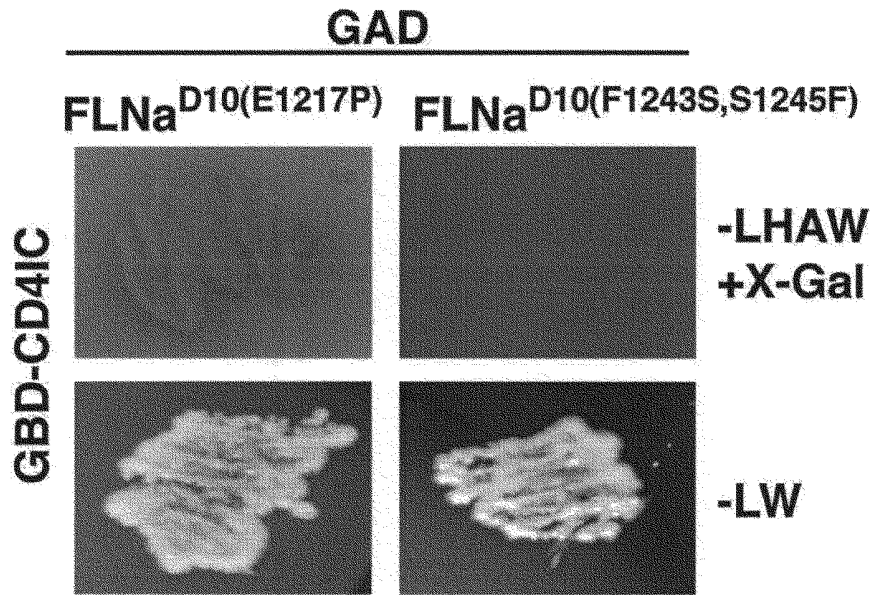


FIGURA 3.C

d

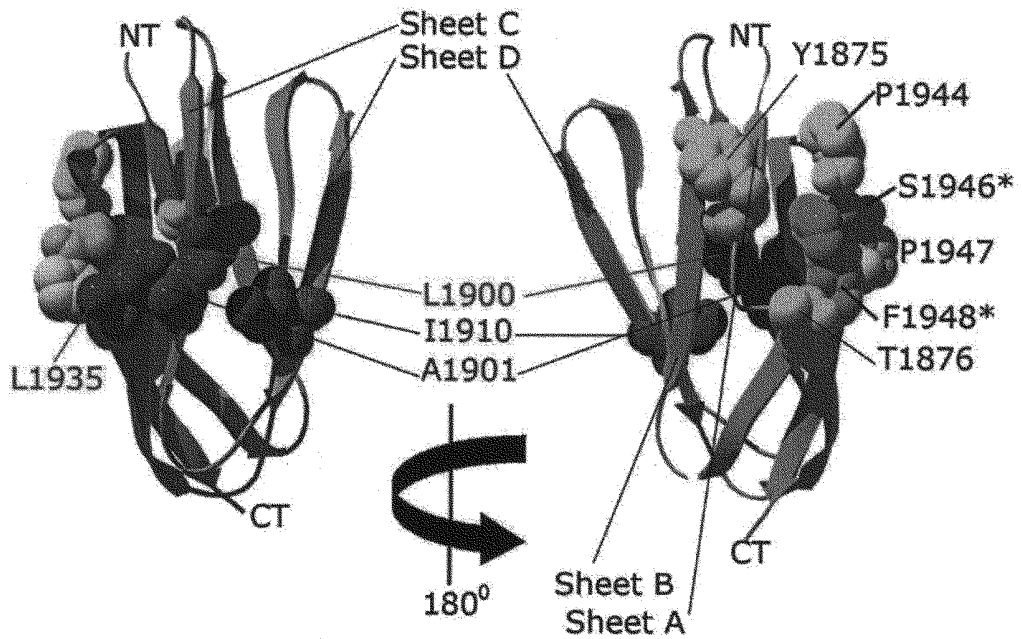


FIGURA 3.D

a

		FLNa ^{D10}	
		-LHAW	-LW
CD4IC-wt	(CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQC PHRFQKTC SPI)	+	+
CD4ICΔ429	(CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQC PHRFQKT*)	+	+
CD4ICΔ421	(CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQC*)	+	+
CD4ICΔ416	(CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLS*)	-	+
CD4IC^{C420A,C422A}	(CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKT QA PHRFQKTCSPI)	+	+
CD4IC^{412-415A}	(CVRCRHRRRQAERMSQIK AAAA EKKTQC PHRFQKTC SPI)	+	+
CD4IC^{K418A}	(CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEK AT QC PHRFQKTC SPI)	+	+
CD4IC^{E416A,K417A}	(CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLS AA KTQC PHRFQKTC SPI)	-	+

FIGURA 4.A

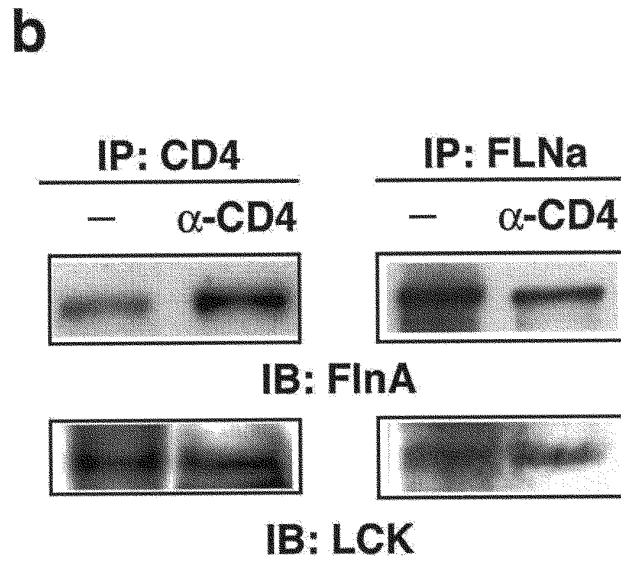


FIGURA 4.B

C

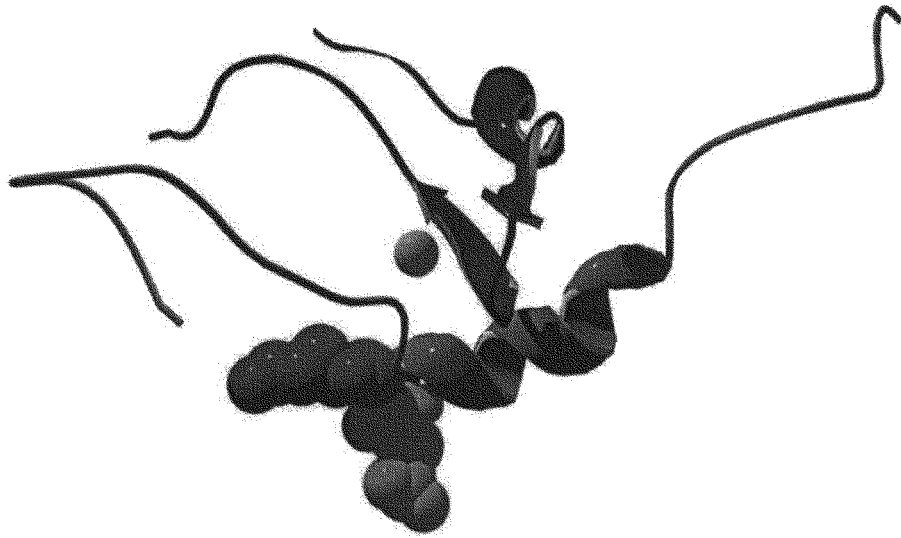


FIGURA 4.C

a

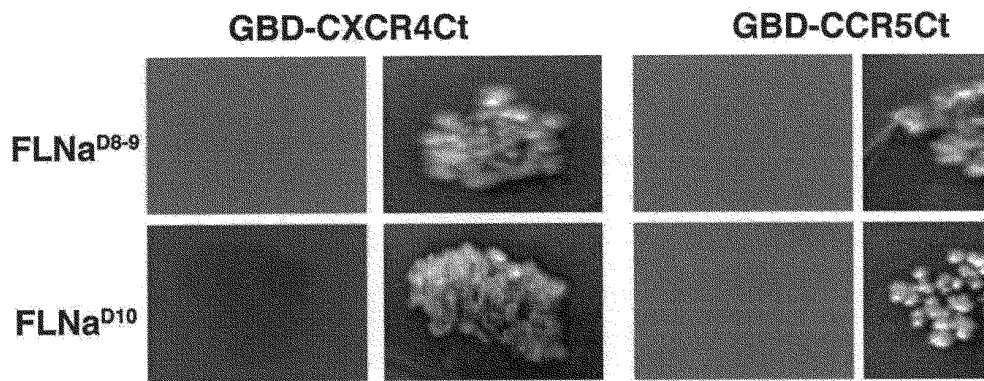


FIGURA 5.A

b

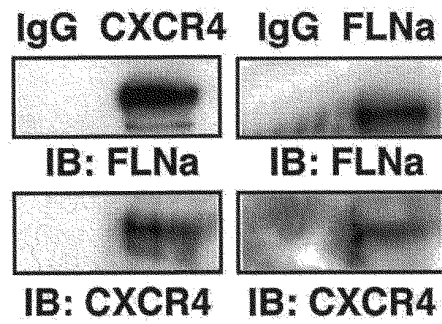


FIGURA 5.B

c

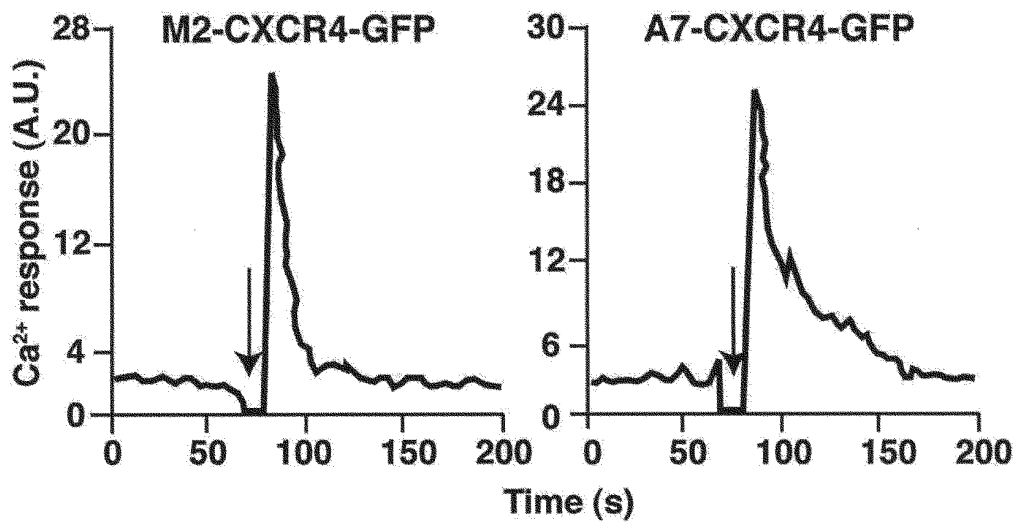


FIGURA 5.C

d

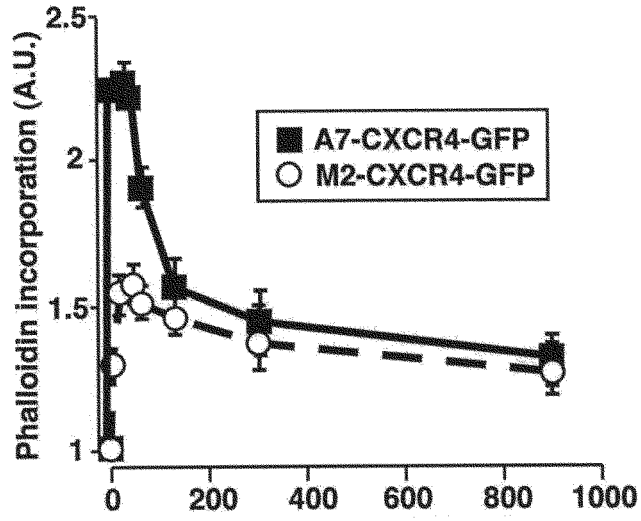


FIGURA 5.D

e

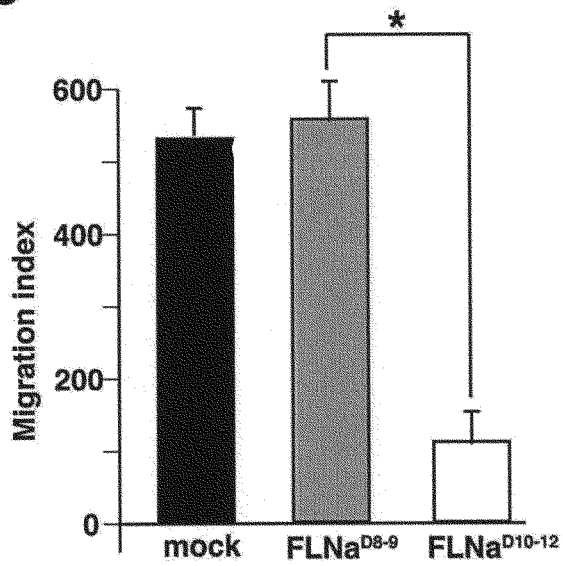


FIGURA 5.E

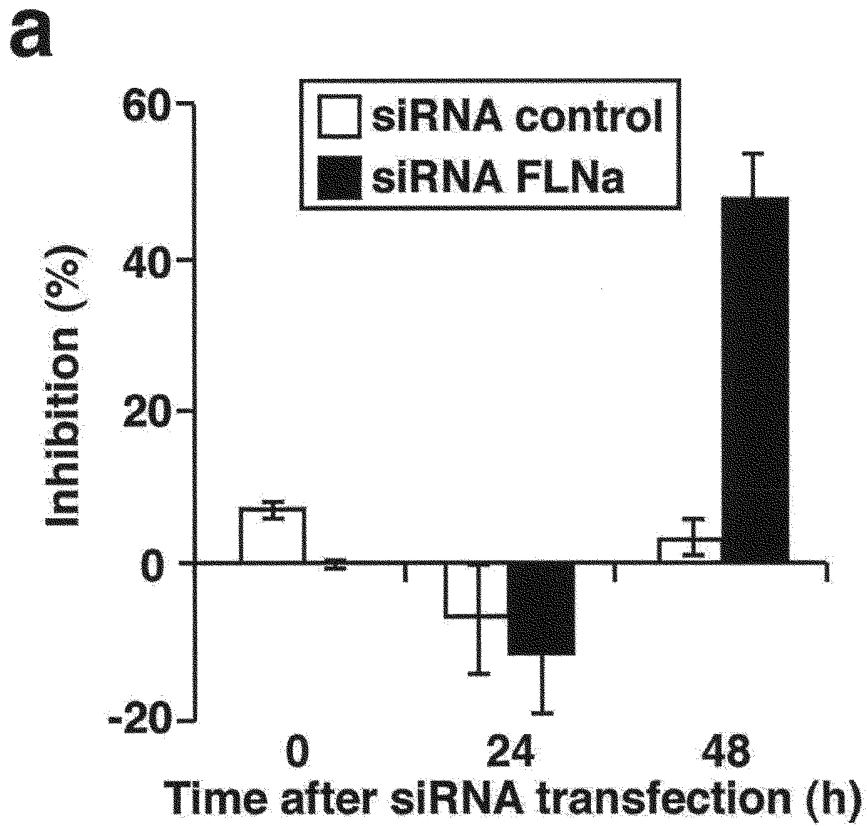


FIGURA 6.A

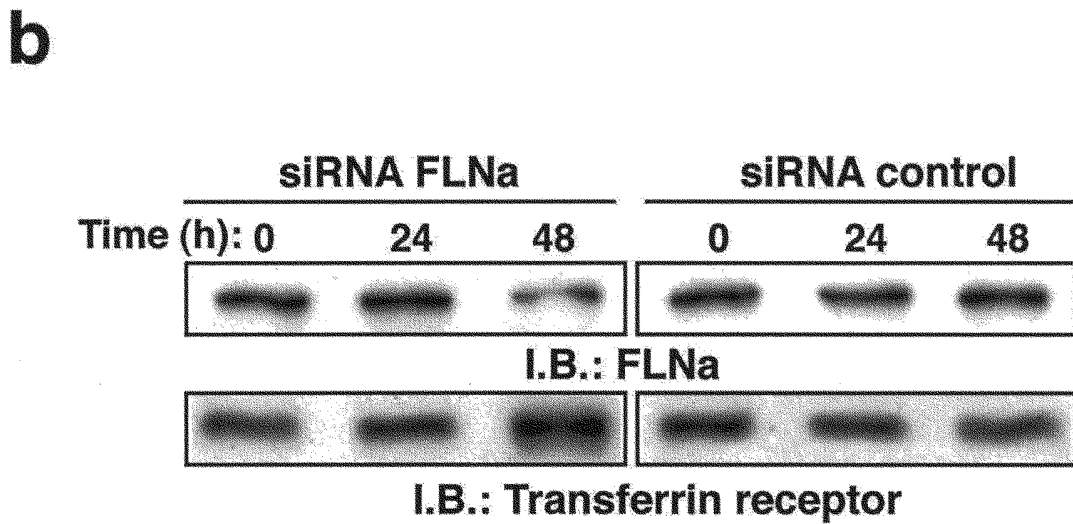


FIGURA 6.B

C

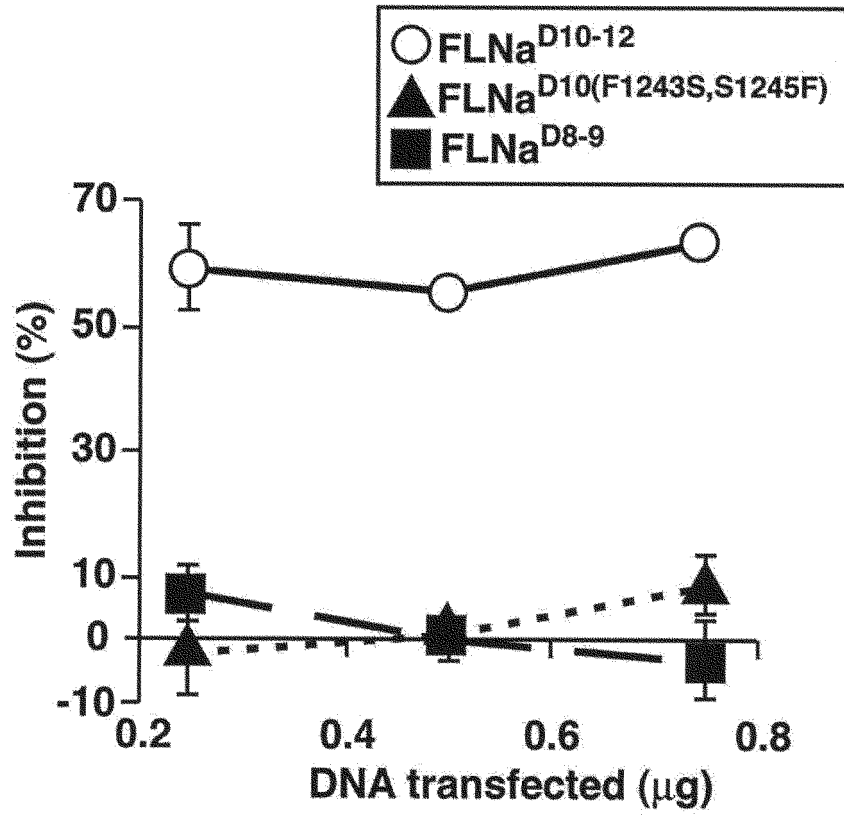


FIGURA 6.C

a

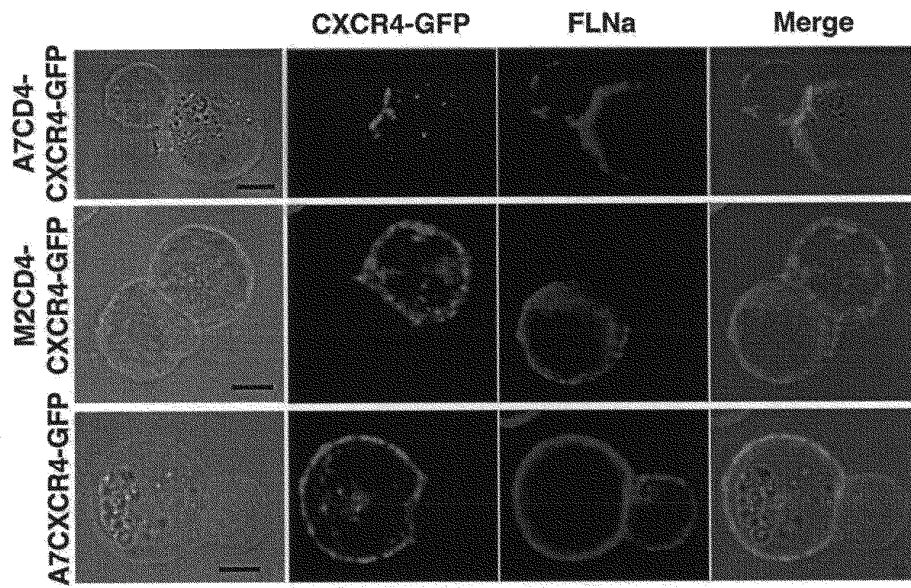


FIGURA 7.A

b

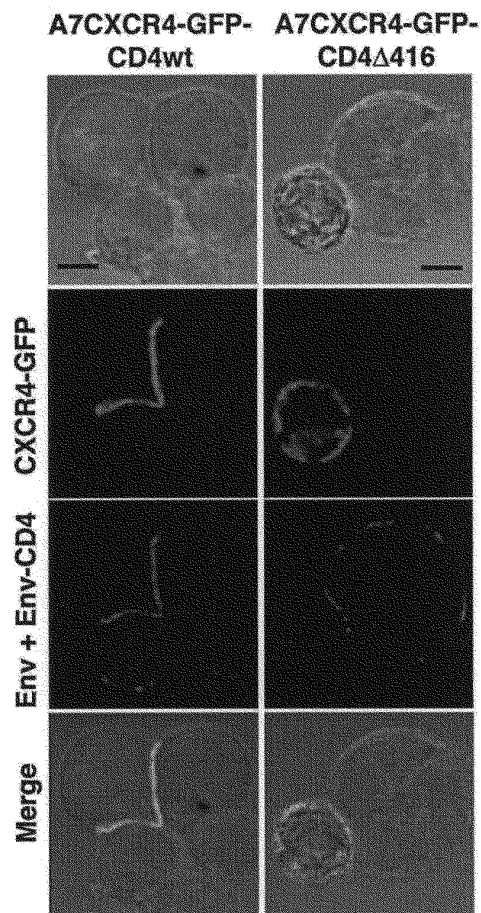


FIGURA 7.B

C

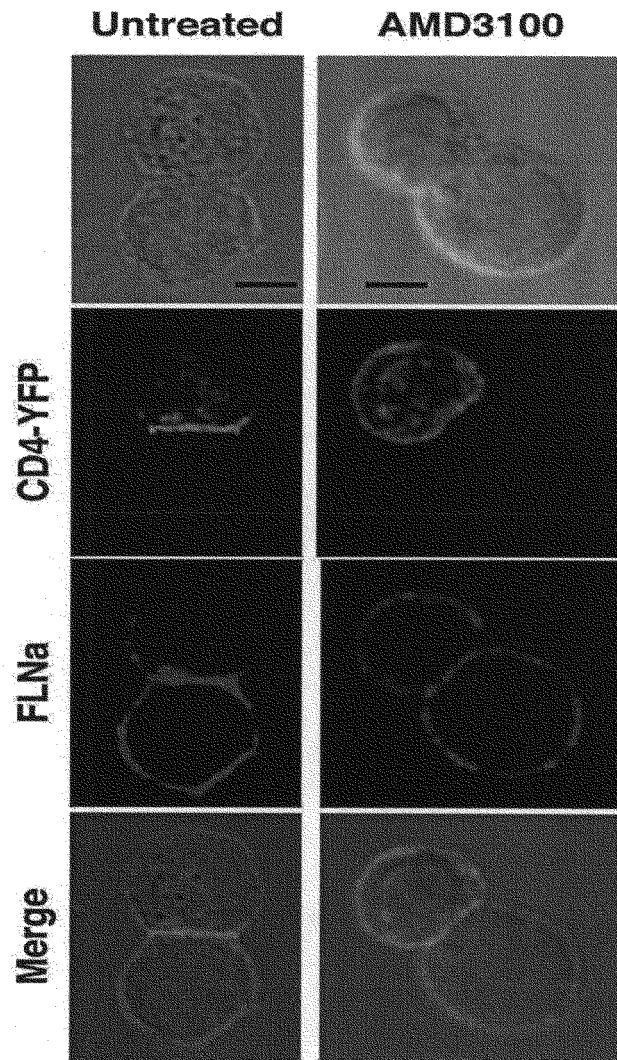


FIGURA 7.C

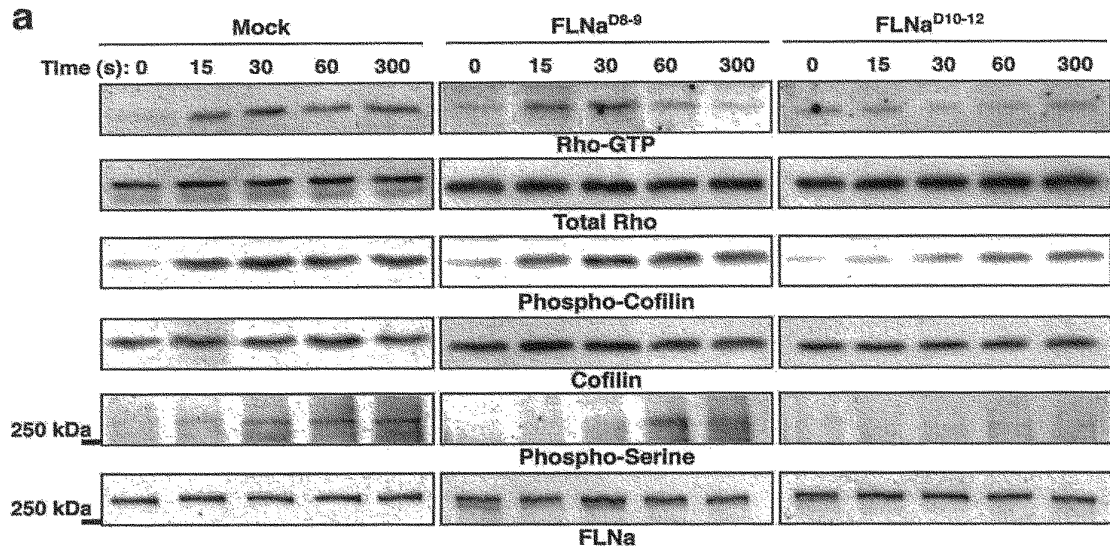


FIGURA 8.A

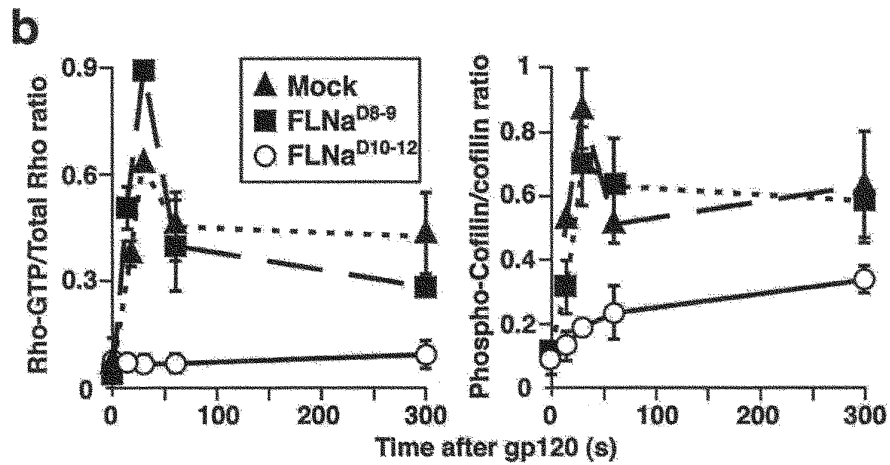


FIGURA 8.B

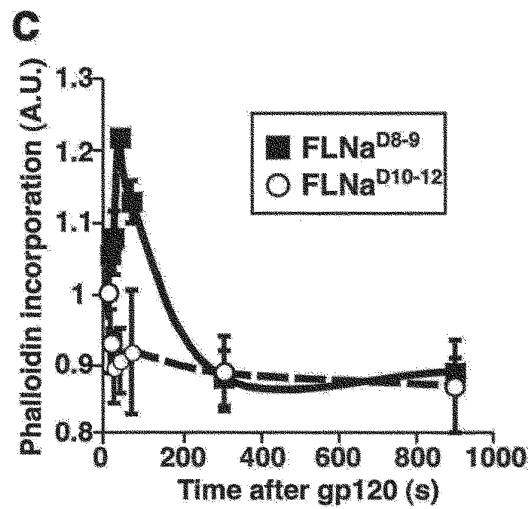


FIGURA 8.C

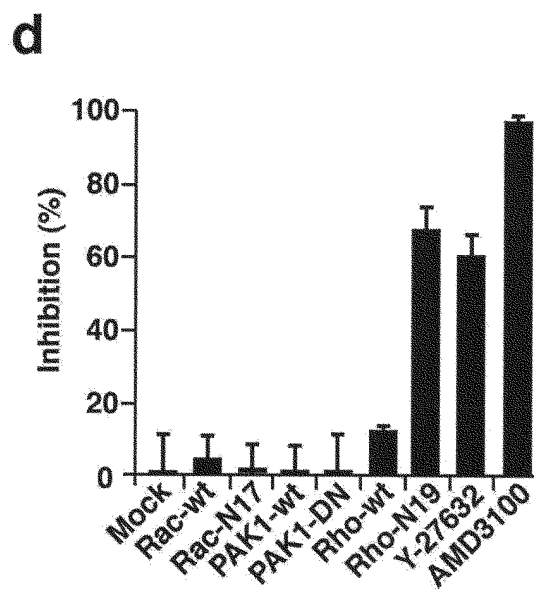


FIGURA 8.D

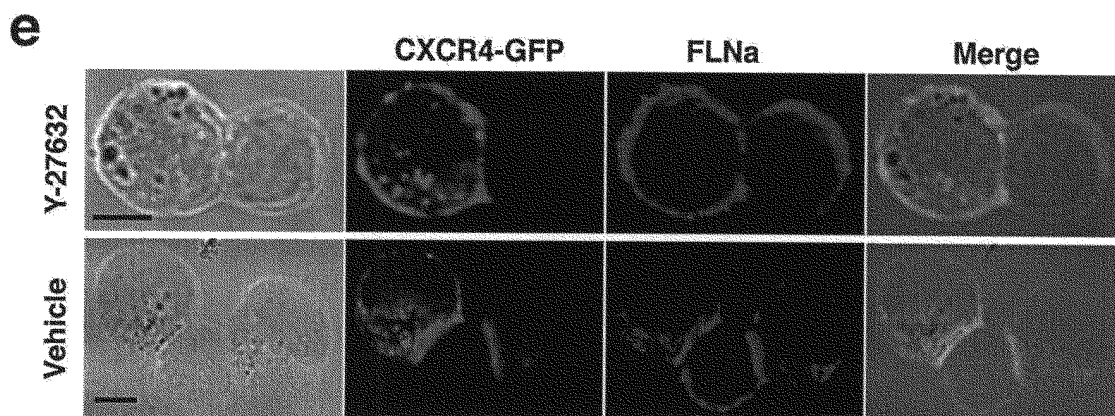


FIGURA 8.E

f

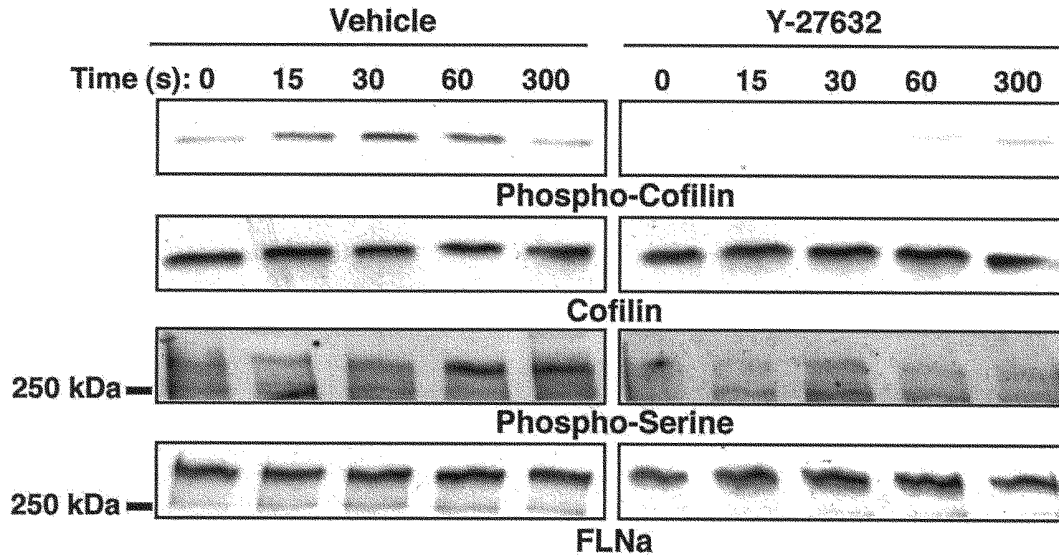


FIGURA 8.F

g

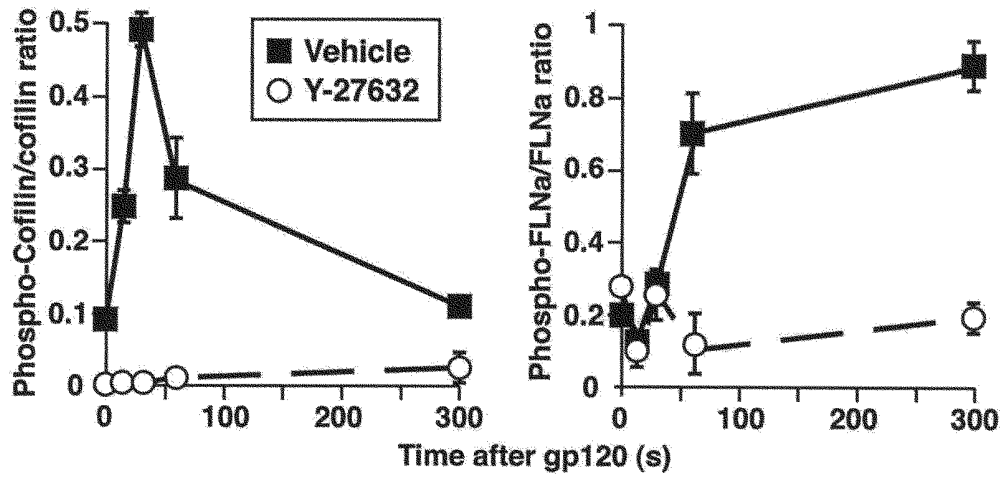


FIGURA 8.G

a

		CCR5IC	
		—LHAW	—LW
FLNa ^{D8-9}	(969-1157)	—	+
FLNa ^{D10-12}	(1158-1445)	—	+
FLNa ^{D13-16}	(1446-1861)	+	+
FLNa ^{D16-20}	(1772-2316)	—	+
FLNa ^{D20-24}	(2140-2730)	—	+

FIGURA 9.A

b

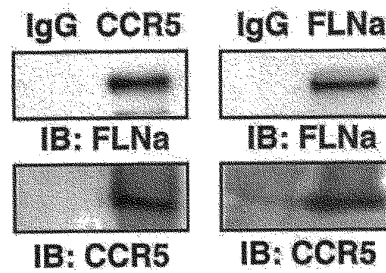


FIGURA 9.B

c

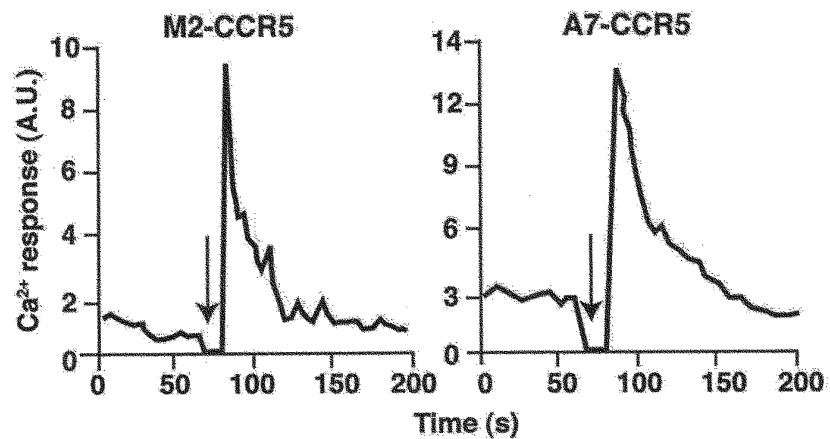


FIGURA 9.C

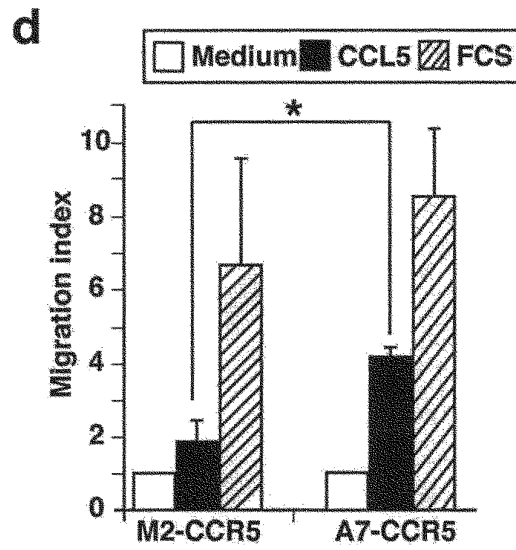


FIGURA 9.D

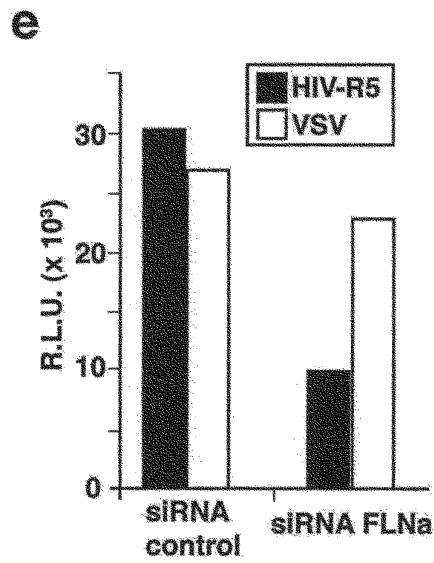


FIGURA 9.E

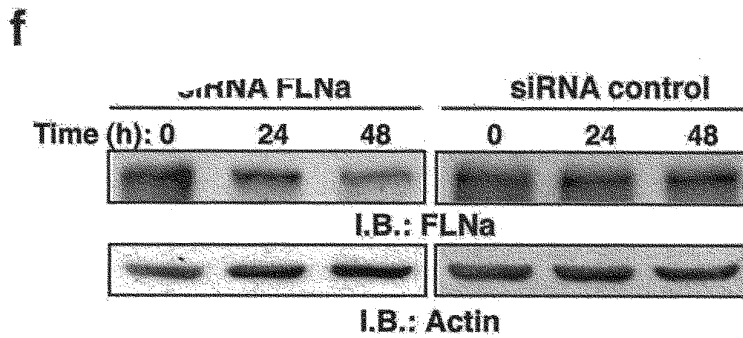


FIGURA 9.F

ES 2 319 838 B1

```

*      20      *      40      *      60
FLA_r1 : LHPKK---ARAYPPEPTG---NIVKGRAEIIVETRS-AEQGE---LIVYE---D : 44
FLA_r2 : GDASK---TAAQPPPEPSG---NIANKTTYEITTAG-AETGE---EVVYQ---D : 44
FLA_r3 : CNPSA---CHAVPRPQPKG---VRVKETADKQYTKG-AESGE---KVIYK---G : 44
FLA_r4 : CGHQK---TRAVPPEEG---GVVGSADVWEAIG-DDVGT---GFSYE---G : 42
FLA_r5 : DFHDR---KARPPPEKTG---VAVNKPAEIVQAKH-GKAP---RVVYQ---D : 44
FLA_r6 : SHPNK---KVYPPPEAKTG---LKAHEPTYIVQCAE-AEQD---SIGKCAPGVVQ : 50
FLA_r7 : HDASK---RAEPPPESRIG---VELGKPTHIVAIKA-AEKK---DVVFS---G : 44
FLA_r8 : LDLSK---RVSPPPEKV---DVGKQDEIVKSKGAGQDK---ASKIV---G : 42
FLA_r9 : TKPSK---KAFPPPEQG---GSAGSPARITDITKG-AETGG---GLIVE---G : 42
FLA_r11 : VDTSG---QCYPPPEGGG---VFREATTEIVQARALTQIGGPHKARVA---N : 47
FLA_r12 : CDPSR---RVHPPPEQS---GTTNKPNIIVETRG-AETGG---GLAVE---G : 42
FLA_r13 : TDASK---KCSPPPESPGH---VRANLQSQVQTSK-AVAP---GVVYQ---G : 44
FLA_r14 : HDASK---KASPPPEHTTG---VPASLVEIVQAKD-AEGL---IAYVT---D : 44
FLA_r15 : GDASKCTVIISIGKPGGAGIGPTIQIGEEVIVQTKA-AEKK---VTCTC---T : 51
FLA_r16 : ---APERPL---GVNPPPE---VTSLRPFDLVPTTIKKSE-I---TGVYR---M : 39
FLA_r18 : ---SMRSH---LKVGSAADIPVQISETDLS-L---TATVV---P : 33
FLA_r19 : GDASK---RVSPPPEHE---GHTEPAEIVQTRD-AEQG---ISLSE---G : 42
FLA_r20 : ---KES---TRRRRAPSV---ANVGSCHDLSKIPFESIQDM---TAAVT---S : 40
FLA_r21 : GGAHK---RAGPPPEER---AEAGVPAESIWTRE-AADG---IATAE---G : 42
FLA_r22 : GDARR---TVSSLOESG---LKNVQPASAVSLNGAKA-I---DAVYH---S : 41
FLA_r23 : GPPGL---SAYAPPEEG---GVYGNPAEIVVITSH-AAGA---SVTID---G : 42
FLA_r24 : ADASK---VAKPPPEKSK---AYVQKSSIVQCSK-AENHI---LVGVH---G : 42
FLA_r10 : FDASK---KCSPPPEER---ATAGEVQGVQVCSK-AESAE---VTIETC---S : 42
FLA_r17 : VHCCH---TAYPPPEHTH---GVVNKPAEIVQTKD-AEKG---SLAVE---G : 42
FLA_r17STR : -----EEEE---EEEEEEEE---EEEEEE---EEEEEEEEEEEEEEEEEE : 38

```

g g f 6 g

```

*      80      *      100      *
FLA_r1 : LAGHQEEAKVTANNDKRTFSWVVEVTTHKVVLLAG-DHIAKSPPEVYDK-- : 98
FLA_r2 : LMGQKGTVEPQLEARGSTYRCSVQTHEVHTAVTLAG-VPIERSPDTVYGG-- : 98
FLA_r3 : ---KGEERVKQKQLGVYGFEEYVIVPTVYVITHTGG-DHIGRSPPEVYGT-- : 95
FLA_r4 : ---SQAKTECDKDGSGCDRHWFOBAEYAVVLLCHS-EDIRLSQIADIRD-- : 92
FLA_r5 : N---EGCPVEALVKDNGITYSCSVWRKPVIGITAVS'GG-VSIVNSDRIHGA-- : 96
FLA_r6 : ---AEADIDFDIIRNDIYETKVTIRGA'SYTAVLAD-DATVTSPIKVEP-- : 102
FLA_r7 : LTKGDAVRVDVIDHDVNTYTKVTVQ'PVGAVT'GG-DPIKSPDS'LA'SP-- : 98
FLA_r8 : ---SGAAVPCKVEPGLQADHSV'RD'REE'PYE'VYTDG-VV'VGSPP'EAVA-- : 95
FLA_r9 : ---CEAQLECLDNG'GTCS'SVV'TEP'DYNHILAD-THV'GSD'KAHVP-- : 92
FLA_r11 : ---SGNLTETYVDRO'GHYK'EST'YEE'LHS'AVT'DG-SP'VSS'Q'VATE-- : 99
FLA_r12 : ---SEAKISCDNK'GSCS'EST'YEA'TYS'AVT'DG-HQ'VGS'P'K'P'ND-- : 92
FLA_r13 : ---KGLVEP-VDVVDNA'GT'OT'AVV'SRE'PYS'SVL'GD-EE'VRS'P'K'VLP-- : 96
FLA_r14 : ---EGKPKK-THIQDHI'GT'Y'AVV'DVT'RYT'LIK'GG-DE'VRS'P'K'RAVP-- : 96
FLA_r15 : ---DGSEVDVQVENE'GTED'ETAPQ'KYV'QVR'GG-EM'VNS'Q'VIT-- : 100
FLA_r16 : ---SGKVAQPTITDK'GYVT'RA'SEA'LHE'DIR'DN-MR'VGS'P'QFY'DY-- : 91
FLA_r18 : ---SGREEPCLKRLR'GHVG'SAV'KET'EHLM'KKHB-DH'ASS'P'V'ISQ-- : 85
FLA_r19 : ---SKVD'INTEDLE'GTCR'VTC'VEP'NYI'NIK'AD-QH'VGS'P'S'K'VTG-- : 92
FLA_r20 : ---SGKTHEAEIVEGE'HTYC'RSV'AEH'THT'VSK'KG-DH'VGS'P'QFT'GP-- : 92
FLA_r21 : ---SKAEISFEDRQ'GSCG'AVVQEP'DYE'VSK'HE-EM'VDS'P'V'PAS-- : 92
FLA_r22 : ---SGALEECYVTEIDQKLA'RS'IRER'VYL'DV'K'NB-THV'GSD'K'OR'GE-- : 93
FLA_r23 : ---SKVND'QCEPEG-IR'VIT'MAP'SYL'SIQ'GGPYH'GG'V'KAK'VTG-- : 92
FLA_r24 : ---RTPCEEIVQIVGSR'LYS'SLLKDK'EYTV'VA'OH-EM'VDS'P'K'AV'VP-- : 93
FLA_r10 : A---GLPAEVYIQDHG'GHT'IT'ELCP'AVT'TH'GG-DE'VNS'P'K'Q'VEP-- : 94
FLA_r17 : ---SKAEISCTDNO'GTCS'SV'VLP'DYS'LV'K'NE-DH'VGS'P'V'AR'VTG-- : 92
FLA_r17STR : -----EEEEEE---EEEEEEEE---EEEEEEEE---EEE---EEEEEE-- : 72

```

p 5 p g 6 p sP

FIGURA 10

```

          *          20          *          40          *
CXCR4_MOUSE_312/359 : ---A---SAQHALNSMSRGSS-L---KG R---GGHSSVSESE S FHSS--- : 48
CXCR4_RAT302/349   : ---A---SAQHALNSMSRGSS-L---KG R---GGHSSVSESE S FHSS--- : 48
CXCR4_HUMAN_307/352 : ----A---SAQHALTSVSRGSS-L---KG R---GGHSSVSESE S FHSS--- : 46
CD4_HUMAN_419/458  :          cvrcrhrxrqaermsqIKR : EK tqcphrfqktcspi
CD4_IQ68           :          -----S---S-SHHHHHHHHHTT-S-----S---S-S--
    
```

FIGURA 11

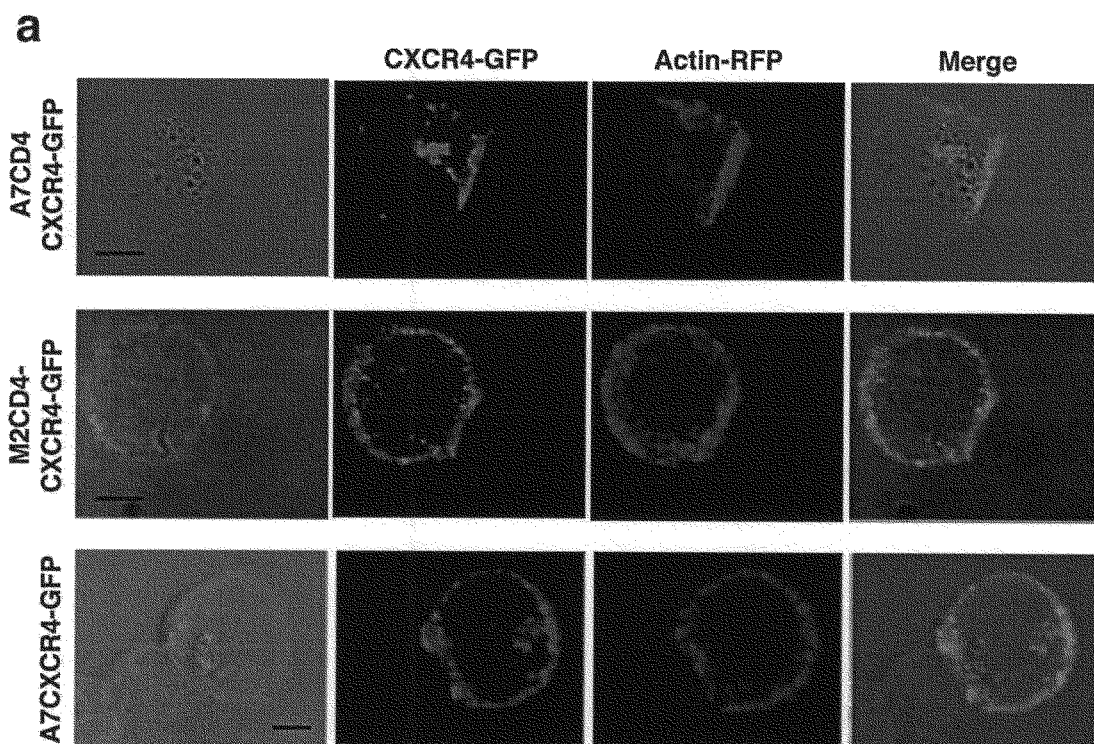


FIGURA 12.A

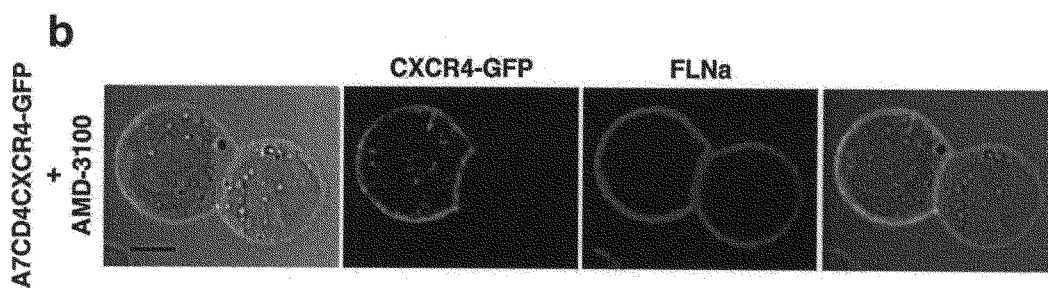


FIGURA 12.B

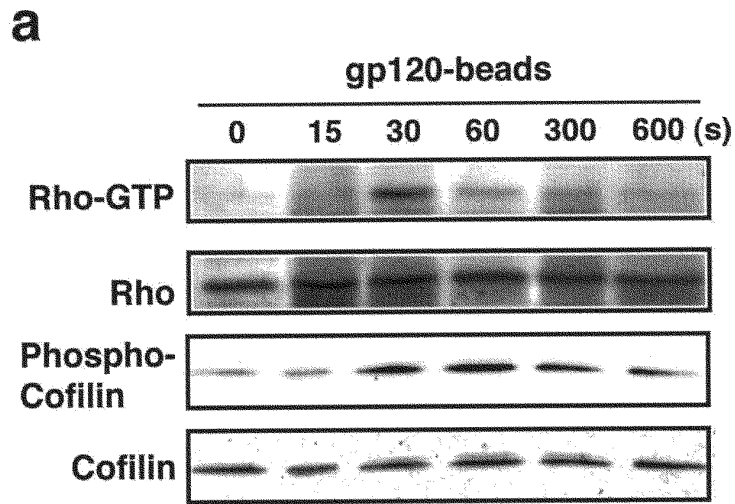


FIGURA 13.A

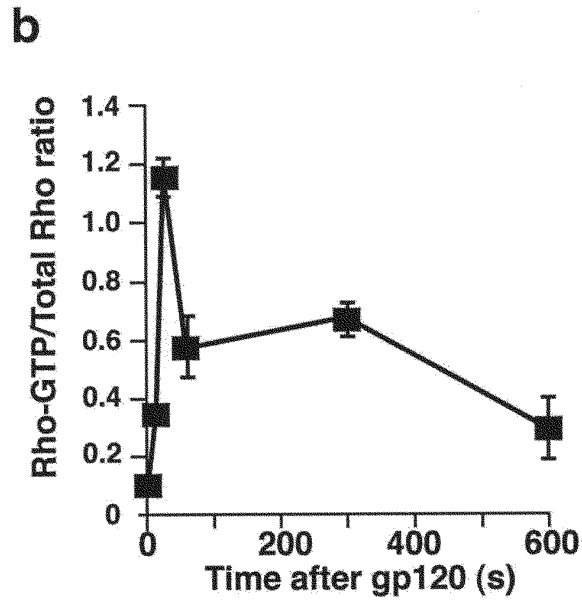


FIGURA 13.B

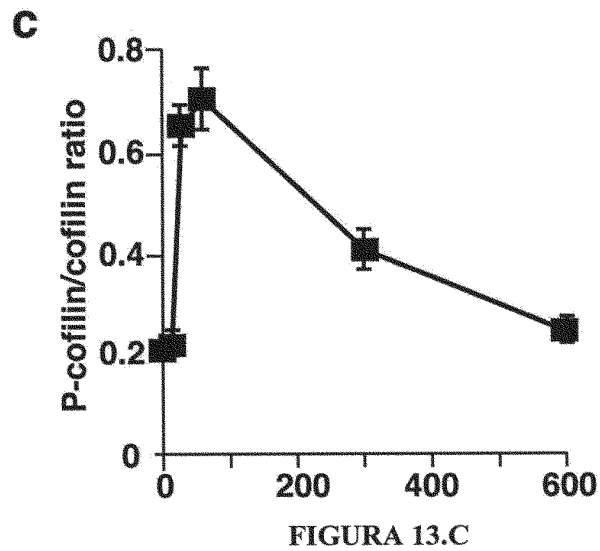


FIGURA 13.C

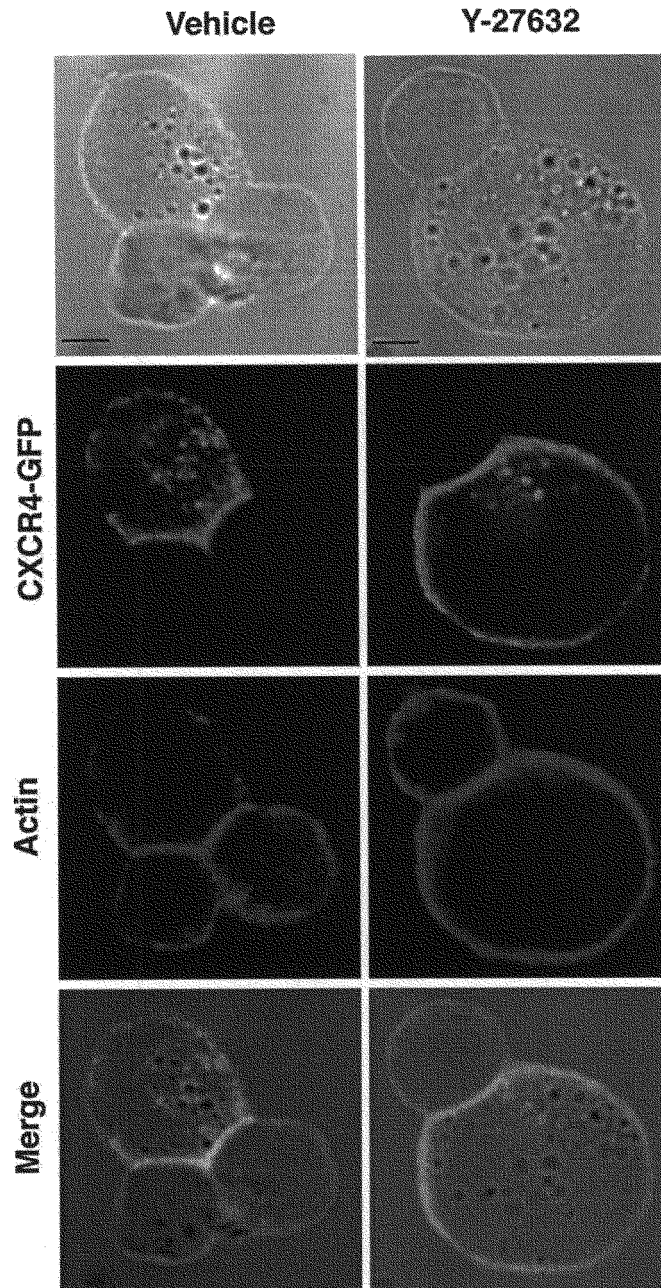


FIGURA 14



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 319 838

② Nº de solicitud: 200602494

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.09.2006

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
A	HAYASHI K & ALTMAN A. Filamin A Is Required for T Cell Activation Mediated by Protein Kinase C-q1. The Journal of Immunology. Agosto 2006, Vol 177(3), páginas 1721-1728, todo el documento.	1-21
A	US 20050064390 A1 (Berger E et al.) 24.03.2005, página 4, párrafos 0062-0073; página 1, párrafo 001 - página 2, párrafo 0017.	1-21
A	WO 0055207 A1 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 21.09.2000, página 3, línea 1 - página 5, línea 35.	1-21
A	FLANAGAN LA et al. Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells. The Journal of Cell Biology. Nov 2001, Vol 155(4), páginas 511-517, todo el documento.	1-21

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

28.04.2009

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H 21/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H, C07K, G01N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.04.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Hayashi K & Altman A. The Journal of Immunology. Aug 2006, Vol 177(3), páginas 1721-1728.	2006
D02	US 20050064390 A1	24.03.2005
D03	WO 0055207 A1	21.09.2000
D04	Flanagan LA. The Journal of Cell Biology. Nov 2001, Vol 155(4), páginas 511-517.	2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína humana, filamina A (FLNa), y su uso para elaboración de una composición farmacéutica o medicamento para tratamiento y prevención de la infección por VIH-1, o de enfermedades que cursen con una alteración del sistema inmune. Dicho compuesto, está constituido por la secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio 10-12 de FLNa (SEQ ID NO3), o por la secuencia de aminoácidos que corresponde a este dominio (SEQ ID NO4), o por contener al menos un ARN de interferencia específico para el ARN mensajero de esta proteína (SEQ ID NO 19 - SEQ ID NO 26). La invención también se refiere a las secuencias de nucleótidos o aminoácidos anteriormente definidas, así como a un vector que comprende la secuencia de nucleótidos y una célula transformada o transfectada (reivindicaciones 1-16). Se reivindica también un procedimiento de identificación de compuestos inhibidores de la actividad FLNa (reivindicaciones 17-21)

El documento D01 divulga la relación entre FLNa y la activación de las células T. Esta proteína es requerida para la activación de las células T debido a su importante función en la formación del armazón celular, uniéndose a un amplio rango de proteínas de señalización intracelular para formar el citoesqueleto de actina y los receptores de membrana (ver todo el documento)

El documento D02 divulga la relación entre la capacidad infectiva del VIH y la expresión de CD4 y del receptor CXCR4. La obtención de líneas celulares, o mamíferos transgénicos, no humanos, que coexpresen estas moléculas se consideran como herramientas para la búsqueda de nuevos productos anti-VIH. Anticuerpos frente CXCR4 o fragmentos de péptidos de esta molécula pueden unirse a agentes biológicos capaces de bloquear la fusión entre VIH y las células diana, constituyendo potenciales productos terapéuticos (ver página 1, párrafo 001 - página 2, párrafo 0017)

El documento D03 divulga una serie de proteínas útiles para prevención y tratamiento de la infección por VIH. Se refiere a proteínas de fusión, efectivas en la neutralización viral, que se unen a dos lugares de una proteína diana funcionalmente unidas por un péptido conector. Un ejemplo de estas proteínas sería sCD4-SCFv(17b) en la que un fragmento soluble de CD4 (que contiene los dominios D1 y D2) se fusiona a un fragmento Fv de anticuerpo 17b mediante una secuencia de unión (ver página 3, línea 1 - página 5, línea 35)

El documento D04 divulga el papel de FLNa y del complejo Arp2/3 en la morfología y función de los filamentos de la red cortical de actina, demostrando que la expresión de FLNa es esencial para estabilizar las redes ortogonales de que forman los filamentos de actina (ver todo el documento)

Hoja adicional

1. NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES 1- 21

El documento D01 se considera el documento más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa el requerimiento de FLNa para activación de las células T y el uso de moléculas de ARN de interferencia que tienen como diana esta proteína. Por otra parte, los documentos D02 y D03 anticipan moléculas anti-VIH relacionadas con la expresión de CD4 o CXCR4. El documento D04 anticipa la necesidad de FLNa para estabilizar las redes de actina.

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos citados en que ninguno de ellos se refiere al uso del dominio 10-12 de FLNa como compuesto inhibidor de la actividad de esta proteína y a su uso para tratamiento y prevención de la infección por VIH.

De este modo, la invención reivindicada implica un efecto mejorado comparado con el estado de la técnica, no estando las características técnicas de las reivindicaciones de la solicitud recogidas en ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación. En consecuencia, las reivindicaciones 1- 21 de la solicitud cumplen con el requisito de novedad y actividad inventiva ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986)