

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 427**

51 Int. Cl.:

C07K 7/02 (2006.01)
C07K 7/04 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 7/50 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2008 E 08857307 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2222692**

54 Título: **Péptido sintético que se enlaza con CD154 humano y usos del mismo**

30 Prioridad:

03.12.2007 EP 07122164

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.01.2014

73 Titular/es:

**FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND
GMBH (100.0%)
ELSE-KRÖNER-STRASSE 1
61352 BAD HOMBURG, DE**

72 Inventor/es:

**CAMUSSI, GIOVANNI y
DEAMBROSIS, ILARIA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 436 427 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptido sintético que se enlaza con CD154 humano y usos del mismo

La presente invención se refiere a un péptido sintético que es capaz de enlazarse con el ligando CD40 humano (CD40L o CD154). En particular, la presente invención se refiere a un péptido sintético que tiene una secuencia de aminoácidos que es capaz de enlazarse específicamente al sitio activo de CD154, inhibiendo de este modo la interacción entre CD154 y su ligando natural CD40, así como los efectos biológicos dependiendo de tal interacción. La invención también se refiere a los usos del péptido en el diagnóstico y terapia de enfermedades que tienen un origen inflamatorio, inmunológico o hematológico.

CD40 es una molécula expresada constitutivamente en la superficie de las células B, en donde desempeña un papel crucial durante el proceso de maduración. CD40 también se expresa en la superficie de una cantidad de otros tipos de células, incluyendo monocitos, fibroblastos, células dendríticas, células endoteliales, células del músculo liso y células epiteliales (van Kooten et al., *J. Leukoc. Biol.* 2000). Su ligando, CD154 (también denominado como CD40L), se expresa transitoriamente tras la activación en la superficie de las células T, macrófagos, plaquetas, monocitos, células NK y células endoteliales. En particular, la interacción entre CD40 expresado en la superficie de las células B y CD154 expresado en la superficie de las células T activadas, conduce a la expansión clonal y el cambio de isotipo de células B, lo que resulta en su transformación en plasmocitos.

La importancia de la interacción CD40:CD154 en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva se demuestra por el hecho de que una mutación en el gen que codifica CD154 es responsable de una forma humana severa de inmunodeficiencia, el síndrome de hiper IgM (HIM), caracterizado por la sobreproducción de IgM, pero la ausencia de IgG, IgA e IgE, y acompañada de graves infecciones recurrentes (Aruffo A. et al., *Cell*, 1993).

En los últimos años, muchos estudios han demostrado la participación de la interacción CD40:CD154 en muchos procesos con una etiogénesis inflamatoria, tal como la aterosclerosis, las enfermedades autoinmunes, el rechazo después del trasplante, la enfermedad de injerto contra huésped, etc. (Schonbeck U. et al., *Circ. Res.* 2001; Henn V. et al., *Nature* 1998; Biancone L. et al., *Int. J. Mol. Med.* 1999; Buchner K. et al., *J. Pathol.* 2003). La expresión de CD40 o su ligando CD154 o la coexpresión de ambas moléculas, también ha sido demostrado en muchos tumores, lo que sugiere la participación de esta ruta de señalización en el desarrollo tumoral (Bussolati B. et al., *Int. J. Cancer* 2002; Biancone L. et al., *J. Immunol.* 1999; Cantaluppi V. et al., *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2006; Hill S. C. et al., *J. Immunol.* 2005; Melichar B. et al., *Gynecol. Oncol.* 2007; Eliopoulos A. G. et al., *Curr. Opin. Pharmacol.* 2004). En particular, se considera que la ruta de señalización CD40:CD154 está implicada en el progreso de la leucemia linfocítica crónica (LLC), en la que se ha demostrado que promueve tanto la supervivencia de las células tumorales como las propiedades pro-angiogénicas de células endoteliales (Dicker F. et al., *Blood* 2006).

Una cantidad de enfoques dirigidos a la inhibición de la interacción CD40:CD154 fueron desarrollados con el fin de proporcionar nuevas oportunidades terapéuticas. En particular, se obtuvieron resultados prometedores en diferentes modelos experimentales de enfermedades autoinmunes, aterosclerosis y rechazo de trasplantes. La inhibición de la interacción CD40:CD154 a través de un enfoque basado en anticuerpos monoclonales anti-CD154 proporcionó mejoras clínicas en muchos modelos de enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), psoriasis y enfermedad de Crohn (Boumpas D. T. et al., *Arthritis Rheum.* 2003; Lioussis S. N. et al., *Bio Drugs* 2004; Daoussis D. et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004). Los anticuerpos anti-CD154 también se describen en la literatura de patentes. El documento WO 2005/003175 da a conocer anticuerpos aglicosil anti-CD154, el documento WO 2006/033702 da a conocer anticuerpos y péptidos anti-CD154, en particular regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada de anticuerpos. Por otra parte, una serie de artículos demostraron que el uso de anticuerpos monoclonales en ratones después del trasplante de islotes, piel, médula ósea, corazón y riñón conduce a la supervivencia prolongada de los órganos trasplantados (Molano R. D. et al., *Diabetes* 2001; Quezada S. A. et al., *Blood* 2003; Elster E. A. et al., *Transpl. Immunol.* 2004; Xu H. et al., *J. Clin. Investig.* 2006; Snanoudj R. et al., *Transpl. Int.* 2006; Nanji S. A. et al., *Diabetes* 2006). El bloqueo de la coestimulación puede conseguirse con anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab o proteínas de fusión dirigidos contra las moléculas coestimuladoras. Sin embargo, los resultados de estos enfoques están a menudo comprometidos por el riesgo de efectos inmunogénicos y efectos secundarios protrombóticos, que son debidos al reconocimiento de la fracción Fc (Henn V. et al., *Nature* 1998), y por la pobre penetración en el tejido y la inmunosupresión. Para reducir la inmunogenicidad inherente, se desarrollaron mini-anticuerpos y humanizado, pero por desgracia a costa de la afinidad.

Péptidos capaces de inhibir la interacción CD40:CD154 han sido divulgados en MINITAKE KITAGAWA ET AL., *Official Journal of the Japan College of Rheumatology*, Springer-Verlag, To, Vol. 15, no. 6, 1 de diciembre de 2005, páginas 423 - 426. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un reactivo que es capaz de inhibir la interacción CD40:CD154 y el bloqueo de los efectos biológicos que dependen de tal interacción, y que supera las limitaciones e inconvenientes de la técnica anterior, en particular lo relacionado con el uso de anticuerpos anti-CD154 monoclonales.

Este objetivo se consigue mediante un péptido sintético, por ejemplo en una forma cíclica, que es capaz de enlazarse específicamente con el sitio activo de CD154 humano (también denominado como CD40L humana).

El péptido de la invención comprende la secuencia de enlazamiento de CD154 de siete aminoácidos denominada como la SEQ ID NO: 13 en el listado de secuencias.

5 De acuerdo con una forma de realización preferida, el péptido de la invención es de 7 a 30 aminoácidos de longitud.

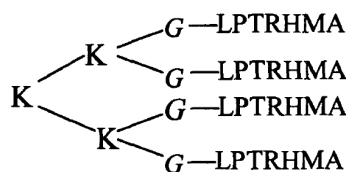
De acuerdo con una forma de realización aún más preferida, el péptido de la invención consiste de la secuencia de nueve aminoácidos denominada como la SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias, resultante de la adición de residuos de cisteína que flanquean en ambos extremos de la secuencia de enlazamiento de CD154 de siete aminoácidos denominada como la SEQ ID NO: 13. Esta forma de realización es particularmente ventajosa ya que la

10 SEQ ID NO: 6 es capaz de sufrir ciclización por la formación de un enlace disulfuro entre las dos cisteínas terminales.

El péptido de acuerdo con la invención tiene la ventaja de que no es capaz de inducir respuestas inmunes no deseadas en el paciente al que se administra.

15 De acuerdo con una forma de realización adicional, el péptido de la invención se proporciona en forma de una estructura de péptido multimérico que comprende una pluralidad de copias del péptido, siendo cada una de dichas copias de péptidos ya sea de forma lineal o en una forma cíclica. La estructura del péptido multimérico es preferiblemente una estructura tetramérica. La estructura del péptido multimérico consiste preferiblemente en una pluralidad de copias del péptido, en las que cada copia se enlaza a al menos otra copia por al menos un espaciador de aminoácidos, que es preferiblemente un residuo de G (Gly), y en el que cada una de las copias de péptidos está enlazada directa o indirectamente a un núcleo de aminoácidos, que consiste preferiblemente de tres residuos K (Lys).

20 Una estructura peptídica multimérica de acuerdo con la invención se representa a continuación:



en la que L es Leu, P es Pro, T es Thr, R es Arg, H es His, M es Met, A es Ala, G es Gly y K es Lys.

25 La estructura multimérica ilustrada anteriormente se ha demostrado que ejerce, en una concentración de 60 µM, la misma actividad inhibitora sobre la estimulación de CD40 por CD154 soluble recombinante que el péptido 4.10, a pesar de que contiene las secuencias de enlazamiento a CD154 de la SEQ ID NO: 13 en una forma lineal. Por otra parte, la estructura tetramérica, similar al péptido 4.10, resultó inactiva en la activación de la agregación plaquetaria humana con trombina con una dosis subliminar (0,3 U/ml). Estos resultados indican que la secuencia de enlazamiento a CD154 (SEQ ID NO: 13) es capaz de enlazarse a CD154 y de ejercer su función biológica, bien sea cuando está en una forma cíclica y cuando está en una forma lineal. Aunque el péptido cíclico tiene la ventaja de proteger la secuencia de aminoácidos de la proteólisis (por ejemplo, en el plasma), la posibilidad de diseñar formas multiméricas de los péptidos permite modular el tamaño molecular, la velocidad de eliminación y por lo tanto la vida media.

30 Como se mencionó aquí anteriormente, el alcance de la invención también incluye el uso de un péptido o una estructura multimérica de acuerdo con la invención, en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

El alcance de la invención incluye además conjugados en donde la estructura peptídica multimérica o del péptido de la invención está enlazada con un agente de diagnóstico (por ejemplo, una molécula detectable para un ensayo *in vivo* o *in vitro*) o un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco antiinflamatorio, un fármaco antitumoral, o un agente citotóxico capaz de ejercer un efecto citotóxico sobre las células endoteliales activadas, células tumorales o cualquier otra célula que sea capaz de expresar CD154 en la superficie de la célula tras la activación) para permitir la detección *in vivo* o *in vitro* y para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una cantidad de enfermedades o trastornos relacionados con la interacción CD40:CD154. Ejemplos de tales enfermedades o afecciones son las enfermedades inflamatorias (como por ejemplo, aterosclerosis, enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes, inflamaciones asociadas con artritis, dermatitis de contacto, síndrome de hiper-IgE, enfermedad intestinal inflamatoria, alergias, incluyendo el asma alérgica, la enfermedad inflamatoria idiopática), enfermedades tumorales (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica), enfermedad de injerto contra huésped. Ejemplos de enfermedades autoinmunes son el lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), enfermedad de

Crohn, psoriasis. La estructura multimérica o peptídica o el conjugado de la invención también es adecuada para el uso para la inducción de inmunotolerancia.

5 Los péptidos sintéticos representan un enfoque alternativo para los mAb con el fin de inhibir la interacción entre las moléculas. La teoría detrás del uso de péptidos sintéticos es que las proteínas sólo ejercen sus efectos biológicos a través de pequeñas regiones externas, sólo unos pocos aminoácidos, los cuales son esenciales para el funcionamiento del receptor adecuado. Por lo tanto, las secuencias correspondientes a estas regiones se pueden sintetizar en una versión más corta, conformacionalmente correcta que retiene los residuos de aminoácidos esenciales. En esta forma, es posible obtener un péptido corto que reconoce específicamente el sitio activo del receptor objetivo, pero que es biológicamente inactivo y que proporciona un impedimento estérico, evitando de este modo la interacción entre el receptor y la proteína nativa. La principal ventaja teórica de tales péptidos, que son capaces de imitar la interacción entre el agonista y el receptor, es su tamaño limitado, que los hace fácilmente solubles en agua y no inmunogénicos, lo que les permite ser administrados durante periodos más largos de tiempo (Allen S. D. et al., J. Peptide Res. 2005; Ladner R. C. et al., DDT 2004).

10 Sin embargo, la identificación de una secuencia de aminoácidos capaz de inhibir de manera efectiva la interacción CD40:CD154 no es un resultado obvio. Como se ilustra en forma más detallada a continuación, incluso la modificación de un único residuo de aminoácido de la secuencia del péptido de la invención (SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 6) en realidad se traduce en la pérdida de la capacidad de enlazarse con el sitio activo de CD154 humano y, en consecuencia, en la pérdida de la capacidad de inhibición del péptido.

15 Como se mencionó anteriormente, el péptido de acuerdo con la invención comprende la secuencia de aminoácidos designada como la SEQ ID NO: 13 o la secuencia del péptido designada como la SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias. Dicho péptido muestra una muy alta especificidad de enlazamiento con el sitio activo de CD154 humano. Es capaz de reconocer y enlazarse al sitio activo de CD154 y, como consecuencia, de bloquear efectivamente el receptor tanto *in vivo* como *in vitro*, así como de inhibir los efectos biológicos resultantes de dicha interacción. En la siguiente descripción, el péptido de acuerdo con la invención que consiste de la SEQ ID NO: 6 se designará como "péptido 4.10".

20 Los resultados ilustrados en la siguiente sección experimental, muestran que el péptido 4.10 de la invención es capaz de prevenir la activación de CD40 en las células B inducidas por la estimulación con una forma recombinante soluble de CD154 humano (CD154 humano recombinante soluble, o rhsCD154). La interferencia ejercida sobre la interacción CD40:CD154 impide tanto la activación de las células B como la respuesta inmune resultante. Los inventores han demostrado que el péptido 4.10 es capaz de inhibir la inducción de otras moléculas coestimuladoras, tales como CD80 y CD86, en células B, así como el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. Además, el péptido 4.10 es capaz de bloquear la activación inducida por rhsCD154 de las células endoteliales *in vitro*, evaluada como la capacidad de las células de migrar y formar estructuras de tipo vascular. Tal actividad anti-angiogénica del péptido 4.10 es aún más evidente *in vivo* en un modelo de angiogénesis de mûrido en Matrigel en ratones SCID, que se describe en mayor detalle más adelante. Por último, los datos preliminares obtenidos por los inventores muestran que el péptido 4.10 es capaz de inducir apoptosis drástica en células B de pacientes con LLC.

25 Se conocen en el estado del arte otros detalles sobre las técnicas de preparación y administración de los conjugados y composiciones farmacéuticas que contienen péptidos cortos; una descripción detallada de los mismos no es necesaria en este documento, ya que no sería esencial para la comprensión de la invención.

30 Como se ilustrará en la sección experimental siguiente, la presente descripción ilustra la identificación de 7 secuencias de aminoácidos que están específicamente dirigidas contra CD154 humano. En particular, se seleccionaron y capacitaban siete heptapéptidos cíclicos capaces de enlazar CD154 humano. Se empleó una proteína de fusión que comprende el dominio del terminal N de CD154 humano para seleccionar los péptidos. Entre los siete heptapéptidos seleccionados y caracterizados, el único que en realidad demostró ser capaz de inhibir la interacción CD40:CD154 es el péptido 4.10 de la invención. Además, se modificó la secuencia de aminoácidos del péptido 4.10 por mutación de 1 o 2 residuos de aminoácidos en un intento por seleccionar formas alternativas útiles para el péptido 4.10. Sin embargo, ninguna de las formas alternativas retuvo la capacidad de inhibir la interacción CD40:CD154, ni los efectos biológicos relacionados con tal interacción.

35 La siguiente descripción detallada se proporciona a modo de ilustración solamente, con referencia a los dibujos adjuntos y las tablas que se presentan más adelante, en donde:

40 Los histogramas de la figura 1 muestran el enlazamiento de los clones de fagos seleccionados con las células J558L, que es una línea celular de mieloma de mûrido transfectada para la expresión de CD154 humano en la superficie celular. El enlazamiento de los fagos seleccionados con las células se demostró por citometría de flujo, mediante la incubación de las células J558L con los fagos y luego con un anticuerpo monoclonal anti-M13. Para cada condición experimental, se analizaron 10.000 eventos y los valores son la media y la desviación estándar de 3 experimentos diferentes. Todos los 12 clones seleccionados se enlazan a las células J558L.

La Tabla I muestra las secuencias de 7 aminoácidos de los insertos de péptidos obtenidos a partir de los clones de enlazamiento a CD154 humanos. Los insertos de los clones designados como 4.1, 4.5 y 4.9 se perdieron debido a la recombinación, mientras que los insertos de los clones designados como 4.2 y 4.3 y aquellos de los clones designados como 4.7 y 4.12 probaron ser idénticos.

5 La Figura 2 representa el enlazamiento de los siete péptidos obtenidos a partir de los clones que se enlazan a CD154 humano y marcados con una cola de 6 histidinas (-His₆) a las células CD154⁺ J558L. El enlazamiento de los péptidos a las células se demostró por citometría de flujo. Las células se incubaron con cada uno de los péptidos marcados con -His₆ y luego con un anticuerpo secundario conjugado con ficoeritrina específico para la cola de His₆. El histograma de puntos es el control isotópico, mientras que la línea de color negro es la intensidad del enlazamiento de los péptidos específicos de CD154 [4.2 = 4.3 = CPSGHTKAC (SEQ ID NO. 1), 4.4 = CGTHSSRIC (SEQ ID NO. 2), 4.6 = CLGTQNKEC (SEQ ID NO. 3), 4.7 = 4.12 = CTPGKPHSC (SEQ ID NO. 4), 4.8 = CKAASANIC (SEQ ID NO. 5), 4.10 = CLPTRHMAC (SEQ ID NO. 6) y 4.11 = CLSAVHNMC (SEQ ID NO. 7)]. Para cada condición experimental, se analizaron 10.000 eventos y los valores son la media y la desviación estándar de 3 experimentos diferentes. Todos los péptidos son capaces de enlazarse específicamente al CD154 sobre las células CD154⁺ J558L y no son capaces de enlazarse a las células de control J558.

La Figura 3A muestra la competencia entre los péptidos anti-CD154 y un anticuerpo conjugado con fluoresceína anti-CD154 humano específico para el sitio activo de CD154. Las células de mieloma de múrido transfectadas con CD154 humano, J558L, se incubaron con cada uno de los siete péptidos anti-CD154 etiquetados con una cola de 6 histidinas (-His₆), y luego con el anticuerpo conjugado con fluoresceína anti-CD154. La capacidad de los péptidos para competir con el anticuerpo anti-CD154 por el enlazamiento con la molécula de CD154 expresada en la superficie de las células J558L se evaluó por medio de citometría de flujo, como la reducción en la intensidad de fluorescencia en comparación con el control positivo representado por las células incubadas únicamente con el anticuerpo conjugado con fluoresceína anti-CD154 humano. Es claro a partir de la figura que el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6) es el único que es capaz de competir con el anticuerpo anti-CD154 humano y desplazar significativamente su enlazamiento. La Figura 3B muestra la comparación entre el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6) y el péptido 4.10-ala (SEQ ID NO. 8), que se utiliza como control. La secuencia de aminoácidos del péptido de control difiere de la del péptido 4.10 en que se reemplaza un residuo de arginina con un residuo de alanina en la posición del aminoácido 5. El residuo de arginina es claramente esencial, ya que su ausencia trae como resultado la inactivación completa de la capacidad del péptido para competir con el anticuerpo conjugado con fluoresceína anti-CD154 por CD154 humano, como muestra claramente la figura 3B.

Los histogramas de 4A muestran el efecto de los péptidos anti-CD154 y el péptido de control 4.10-ala, en la activación de las células B inducidas por la estimulación con una molécula de CD154 humano recombinante soluble (rhsCD154). Las células B fueron estimuladas durante 48 horas con rhsCD154 en ausencia y en presencia de un anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo o uno de los siete péptidos seleccionados. La activación de las células B periféricas se evaluó por citometría de flujo, como la expresión en la membrana de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Como muestra claramente la figura 4A, la estimulación de las células B durante 48 horas con CD154 humano soluble (rhsCD154) induce una fuerte expresión de CD80 y CD86 en la superficie celular. Por el contrario, se impide la activación cuando se utiliza rhsCD154 en combinación con un anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo o con el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6). Ninguno de los péptidos restantes es capaz de inhibir significativamente la activación inducida por rhsCD154 de células B. La Figura 4B muestra los detalles de los análisis citométricos.

Los gráficos de la figura 5A muestran el porcentaje de células B sin procesar que experimentan un cambio de isotipo y que expresan IgG, bajo condición basal sin estimulación, después de la estimulación durante 72 horas con IL-4 y CD154, después de la estimulación durante 72 horas con IL-4 y CD154 en combinación con un anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo, o después de la estimulación durante 72 horas con IL-4 y CD154 en combinación con el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), respectivamente. El péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), al igual que el anticuerpo anti-CD154, es capaz de inhibir fuertemente la conmutación de isotipo de las inmunoglobulinas inducidas por la estimulación con IL-4 y rhsCD154. La Figura 5B muestra los detalles del análisis citométrico.

La Figura 6 muestra los efectos de la estimulación inducida por CD154 sobre la motilidad de HUVEC (las HUVEC = células endoteliales de la vena umbilical humana) en ausencia o en presencia del péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), o del péptido de control 4.10-ala (SEQ ID NO. 8), o de un anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo. En particular, la figura 6A muestra la cinética en el transcurso del tiempo de la migración de células en diversas condiciones experimentales durante un período de 4 horas; la figura 6B muestra las diferencias observadas en la velocidad de migración de las células después de estimulación durante 30 minutos bajo las condiciones experimentales mencionadas anteriormente; la figura 6C muestra imágenes representativas del análisis con el transcurso del tiempo. El péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), en forma contraria al péptido 4.10-ala de control (SEQ ID NO. 8), inhibe la motilidad inducida por rhsCD154 de las células endoteliales.

La Figura 7A muestra la capacidad de las HUVEC sembradas en Matrigel para formar líneas de células de tipo vascular bajo condiciones basales sin estimulación o después de estimulación con rhsCD154 en presencia /

ausencia de un anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo, o del péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), o del péptido de control 4.10-ala (SEQ ID NO. 8). Las Figuras 7B - F muestran imágenes representativas de la capacidad para la formación de líneas de células en Matrigel bajo las diferentes condiciones experimentales mencionadas anteriormente (B = control no estimulado; C = rhsCD154, D = rhsCD154 + péptido 4.10; E = rhsCD154 + péptido 4.10-ala; F = rhsCD154 + anticuerpo anti-CD154 de bloqueo). El péptido 4.10 de la invención (SEQ ID NO. 6), contrario al péptido de control 4.10-ala (SEQ ID NO. 8), inhibe la capacidad inducida por rhsCD154 de las células endoteliales de formar líneas de células.

La Figura 8 muestra el efecto *in vivo* de la estimulación inducida por rhsCD154 en presencia / ausencia del péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), en células HUVEC endoteliales inoculadas por vía subcutánea en la cadera de ratones SCID en combinación con 250 μ l de Matrigel. Siete días después de la inoculación, los ratones fueron sacrificados y se tomaron los injertos, se fijaron en solución de formalina al 10%, se embebieron en parafina y se prepararon para el análisis histológico. La Figura 8A muestra la cuantificación, en secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina, de la región vascularizada en condiciones basales y bajo las demás condiciones experimentales mencionadas anteriormente. Figuras 8B y 8C son dos imágenes representativas de la angiogénesis obtenidas tras la estimulación de las células endoteliales con rhsCD154 solo o con rhsCD154 en combinación con el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), respectivamente. Se utilizaron seis ratones SCID para cada condición experimental. El péptido 4.10 inhibe completamente la angiogénesis inducida por rhsCD154 *in vivo*.

La Figura 9 muestra la capacidad del péptido 4.10 de la invención (SEQ ID NO. 6) de inhibir la supervivencia de las células de CLL inducidas por la estimulación de IL-4.

La Figura 10 muestra la agregación plaquetaria humana tras la estimulación solo con ADP 0,5 μ M o la estimulación con ADP 0,5 μ M precedido por la estimulación durante 10 minutos a 37° C con rhsCD154, o rhsCD154 en combinación con el péptido 4,10 (SEQ ID NO. 6), o rhsCD154 en combinación con un inmunocomplejo que consiste de rhsCD154 y un anticuerpo anti-CD154 humano. La agregación de plaquetas se midió con un agregómetro, como el aumento de la transmisión de la luz en comparación con el control. El cebado de plaquetas humanas con el anticuerpo anti-CD154 humano en combinación con rhsCD154 aumenta la agregación de plaquetas después de la estimulación con ADP 0,5 μ M. En contraste, rhsCD154 solo o en combinación con el péptido 4.10, no afecta los niveles de agregación de plaquetas inducido tras la estimulación con ADP 0,5 μ M. Estos resultados muestran que la interacción entre el péptido 4.10 de la invención (SEQ ID NO. 6) y la molécula de CD154 no induce agregación plaquetaria, que por el contrario, es inducida por la interacción con el anticuerpo anti-CD154.

La siguiente sección experimental se proporciona sólo a modo de ilustración y no pretende limitar el alcance de la invención como se define por medio de las reivindicaciones adjuntas.

Sección experimental

A lo largo de este estudio, se usó una biblioteca de péptidos expresados en fagos M13 que consisten de un panel de secuencias de péptidos (variabilidad de péptidos $< 10^9$) de 7 residuos de aminoácidos con 2 cisteínas que flanquean en ambos extremos que permiten la ciclación por enlaces disulfuro, genéticamente fusionada a la proteína de la cápsida del fago pIII y expresada al azar en la superficie del fago. Se cribó la biblioteca de fagos por medio del modelo *in vitro* de biocribado desarrollado por los presentes inventores a partir de un modelo previamente conocido (Hetian L. et al., J. Biol. Chem. 2002). Se incubaron los fagos (1×10^{11} CFU en 200 μ l de TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente con CD154 humano recombinante, previamente adherido a una placa. Se lavaron los fagos varias veces con TBS-T para remover los fagos no específicos no enlazados a CD154, los fagos enlazados a CD154 se recolectaron mediante elución con 100 μ l de glicina 0,2 M, pH 2,2, se neutralizó después de 10 minutos con 15 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 9,1. El número de fagos se evaluó por titulación, añadiendo diluciones en serie del eluato a las células huésped ER2738 de *Escherichia coli* resistentes a la tetraciclina (New England Biolabs, Hitchin, Reino Unido) en agar LB (7 g / litro de agarosa, 1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, Sigma), y siembra en placa sobre agar LB IPTG/X-Gal en presencia de tetraciclina (Kramel Biotech, Cramlington, Reino Unido). Después de la incubación durante 12 horas a 37° C, se hizo un recuento del número de colonias de fagos, visibles en la placa en forma de placas azules. Se amplificaron los fagos eluidos mediante el cultivo de los fagos en placas de agar LB IPTG/X-Gal en presencia de tetraciclina y se recogieron y precipitaron por centrifugación en polietilén glicol 8,000 al 3,3% / NaCl 0,4 M (Sigma). Se titularon luego los fagos, como se describió anteriormente, y se incubaron nuevamente en una placa nueva recubierta con CD154 humano recombinante. El proceso de selección y amplificación se repitió cuatro veces para enriquecer la biblioteca de clones de fagos específicos de CD154 humanos. Después de la cuarta ronda de amplificación, se seleccionaron al azar 12 clones de fago, se expandieron individualmente y se analizaron por su capacidad para reconocer CD154 que se expresa en la superficie celular. El enlazamiento específico de los clones individuales seleccionados se demostró *in vitro* por citometría de flujo, utilizando una línea celular de mieloma de múrido transfectada para la expresión de CD154 humano, denominada como J558L, como la línea celular de referencia. El enlazamiento de los fagos (10^{11} cfu) a células J558L, después de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se detectó por citometría de flujo, por medio de inmunofluorescencia indirecta incubando las células con anticuerpo monoclonal contra la proteína del fago M13 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) y posteriormente con un anticuerpo conjugado con ficoeritrina anti-ratón (Sigma). Como se muestra en la figura 1, todos los 12 clones

de fagos fueron capaces de enlazar específicamente células que expresan CD154 humanos (J558L), pero no se enlazaron a las células de control negativo de CD154 (J558).

Por medio de la secuenciación del inserto de péptidos de los 12 clones de fagos, se obtuvieron las 7 secuencias diferentes que figuran en la tabla I. Los péptidos se sintetizaron y conjugaron con biotina (bio-) o con una cola de 6 histidinas (-his₆) a fin de permitir la localización *in vitro* e *in vivo*. Del mismo modo, se demostró el enlazamiento de los péptidos con las células J558L por citometría de flujo incubando las células durante 30 minutos a temperatura ambiente con los péptidos marcados con -his₆ (péptidos -his₆ -60 µM) y posteriormente durante 30 minutos a 4° C con un anticuerpo conjugado anti-poli histidina-ficoeritrina (Sigma). Todos los siete péptidos seleccionados mostraron buena afinidad hacia las células CD154⁺ J558L, aunque no se enlazaron a las células de control J558 (figura 2). Además, se llevó a cabo un ensayo de competición entre los péptidos y un anticuerpo conjugado con fluoresceína - anti-CD154 humano (Serotec) que reconocen específicamente el sitio activo de CD154. Se incubaron las células J558L se incubaron con los péptidos his₆ durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego con anticuerpo conjugado con fluoresceína - anti-CD154 humano durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La Figura 3A muestra que el péptido 4.10 es el único que es capaz de inhibir significativamente la interacción entre el anticuerpo conjugado con fluoresceína - anti-CD154 humano y las células J558L. Con el fin de identificar los residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del péptido 4.10 que son esenciales para el enlazamiento con CD154, se sintetizaron tres péptidos diferentes, cada uno portando una mutación puntual, cuyas secuencias de aminoácidos difieren de la del péptido 4.10 por reemplazo de los residuos de aminoácidos en las posiciones 4, 5, 6, respectivamente, con un residuo de alanina.

Los péptidos mutados no eran capaces de reconocer CD154 humano expresado en la superficie de las células J558L (datos no mostrados). El péptido menos reactivo, que tiene la secuencia de aminoácidos CLPTAHMAC (SEQ ID No. 8), denominado como 4.10-ala, fue seleccionado como el péptido de control (figura 3B).

Se obtuvieron resultados similares con los cuatro péptidos modificados 4.101, 4.102, 4.103 y 4.104 que tienen las secuencias de aminoácidos ilustradas en la tabla II. Ninguno de estos péptidos demostró ser capaz de enlazarse a CD154 humano expresado en la superficie de las células CD154⁺ J558L (datos no mostrados).

Las células B son conocidas por expresar constitutivamente la molécula CD40 en la membrana de las células (van Kooten C. et al., J. Leukoc. Biol. 2000). La estimulación de CD40 por las células T activadas que expresan CD154, da como resultado la activación, proliferación y cambio de isotipo de las células B. Los inventores emplearon células B aisladas de sangre entera periférica de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de Ficoll y separación inmunomagnética (MACS Systems Milteniy). Las células B inactivas obtenidas de este modo, se estimularon luego con una forma soluble de CD154 humano recombinante (rhsCD154) para inducir la activación y expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) en la membrana celular. Después de la estimulación durante 48 horas con rhsCD154 (100 ng / ml) se observó un aumento drástico en la expresión en la membrana de CD80 y CD86 en la superficie celular de las células B periféricas. La expresión se incrementó en un 300% y 274%, respectivamente, en comparación con los niveles basales. En contraste, la incubación previa durante 15 minutos a 37° C de rhsCD154 (100 ng / ml) con el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), antes de la estimulación de linfocitos, bloqueó la estimulación de las células B y la expresión relacionada de CD80 y CD86. El efecto inhibitorio del péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6) alcanzó su punto máximo a la concentración de 60 µM, con una reducción en la expresión de CD80 y CD86 hasta 107% y 130%, respectivamente (figuras 4A y 4B). Fue posible observar tal efecto incluso a concentraciones más bajas (30 µM). En contraste, la incubación previa de rhsCD154 (100 ng / ml) con los otros péptidos, a la misma concentración (60 µM), no afectó significativamente la expresión de CD80 y CD86 inducida por la estimulación con rhsCD154. A concentraciones más altas (250 µM) también los péptidos 4.6 (SEQ ID NO. 3) y 4.11 (SEQ ID NO. 7) mostraron inhibición de la activación de las células B: en particular, el péptido 4.6 (SEQ ID NO. 3) redujo la expresión de CD80 en 117% y la expresión de CD86 en 122%, mientras que el efecto del péptido 4.11 (SEQ ID NO. 7) no fue reproducible de forma estable. En contraste, la incubación previa de rhsCD154 (100 ng / ml) con el péptido de control 4.10-ala (SEQ ID NO. 8), incluso a una concentración de 250 µM, ni afectó la expresión de CD80 y CD86 inducida por la estimulación con rhsCD154, ni se redujo significativamente la activación de las células B, ni redujo los niveles de expresión de CD80 y CD86 (figura 4A). Como control de bloqueo, se incubó previamente rhsCD154 (100 ng / ml) en todos los experimentos llevados a cabo, antes de la estimulación de las células B, con un anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo (Alexis) durante 15 minutos a 37° C, lo que inhibió completamente la activación de células B mediada por CD40 y redujo la expresión de CD80 y CD86 a niveles basales (figuras 4A y 4B). Los resultados son la media ± la desviación estándar de cinco experimentos diferentes. Se obtuvieron resultados similares también con células B aisladas a partir de fragmentos de bazo humano. Además, en otros experimentos llevados a cabo en una población de células B sin procesar, se demostró que el péptido 4.10 era efectivo para inhibir el cambio de isotipo mediado por CD40 de células B Igs. Estos experimentos se llevaron a cabo en células B sin procesar CD27⁺, obtenidas a partir de sangre periférica por selección negativa, por agotamiento de los linfocitos maduros de la reserva de células B mediante separación inmunomagnética (MACS Systems Milteniy). Los inventores demostraron que cuando las células B sin procesar se cultivan durante 96 horas en DMEM bajo glucosa (Sigma) en presencia de IL-4 (0,4 ng / ml) y rhsCD154 (100 ng / ml), se indujo un aumento significativo (25%) en el número de células B que expresan IgG en la membrana. En contraste, sólo una proporción muy baja de células B estimuladas con IL-4 (0,4 ng / ml) y rhsCD154 (100 ng / ml) en combinación con el péptido 4.10 (SEQ ID

NO. 6), experimentó cambio de isotipo (figuras 5A y 5B). Del mismo modo, la estimulación de células B sin procesar con IL-4 (0,4 ng / ml) y rhsCD154 (100 ng / ml) en combinación con el anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo no indujo el cambio de isotipo (figuras 5A y 5B).

5 Se sabe que un proceso inflamatorio, una vez activado, puede ser preservado por las células fuera del sistema inmunitario que expresan receptores particulares o moléculas co-estimuladoras de linfocitos, tales como CD40 y su
 10 ligando CD154, tales como por ejemplo, células endoteliales de la pared vascular. Por lo tanto, los inventores demostraron que el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), además de inhibir la estimulación de linfocitos y / o la maduración, es capaz de limitar la inflamación bloqueando la estimulación de la molécula CD40 expresada en la superficie celular de las células endoteliales. Los inventores de hecho demostraron que el efecto pro-angiogénico, evaluado *in vitro*
 15 tanto como la migración de células individuales y como su capacidad para formar líneas de células de tipo vascular en la matriz basal (Matrigel), inducida por estimulación de CD40 endotelial mediante la administración de rhsCD154 (100 ng / ml), fue inhibido por incubación previa de rhsCD154 (100 ng / ml) durante 15 minutos a 37° C con el péptido 4.10 anti-CD154 (SEQ ID NO. 6) de la invención. En particular, los experimentos de migración celular se llevaron a cabo con células HUVEC sembradas en placas sobre gelatina con una densidad de 4×10^3 en medio completo de células endoteliales en presencia de 20% de suero. Al día siguiente, se reemplazó el medio endotelial con DMEM de bajo nivel de glucosa (Sigma) con una concentración reducida de suero (5%), en presencia o en ausencia de rhsCD154 (100 ng / ml).

20 Por otra parte, con el fin de evaluar el efecto inhibitorio, se incubó previamente rhsCD154 (100 ng / ml) durante 15 minutos a 37° C con el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), o con el péptido de control 4.10-ala (SEQ ID NO. 8), o con un anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo. Se observaron luego los matraces con un aumento de 10 veces durante un período de 4 horas bajo un microscopio invertido de contraste de fase equipado con una cámara termostática (aproximadamente a 37° C). Se fotografiaron las células con una cámara conectada al microscopio, durante todo el período de tiempo de 4 horas a intervalos regulares de 15 minutos cada vez. La velocidad de migración de cada una de las células se calculó con base en la posición del núcleo de cada célula individual en cada marco individual, usando un software de análisis de imágenes y, como resultado, se calculó la velocidad promedio de migración de las células (\pm desviación estándar) para cada condición experimental. Como se muestra en las figuras 6A y 6B, la estimulación de CD40 endotelial por rhsCD154 (100 ng / ml) indujo un aumento de la movilidad basal de células (que siempre fue inferior a $12 \mu\text{m} / \text{h}$) de aproximadamente 350% ($42 \mu\text{m} / \text{h}$), mientras que la incubación previa de rhsCD154 (100 ng / ml) durante 15 minutos a 37° C con el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), así como la incubación
 25 previa con el anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo, redujo drásticamente la movilidad de las células hacia los niveles basales. En contraste, el péptido 4.10-ala de control (SEQ ID NO. 8) no afectó a la estimulación de CD40 endotelial (figuras 6A, 6B, 6C). Como una confirmación adicional de la capacidad del péptido 4.10 para evitar la estimulación de CD40 endotelial humana por rhsCD154 (100 ng / ml), se sometieron las HUVEC ($3,5 \times 10^4$) a un ensayo de angiogénesis *in vitro*. Se sembraron en placa las HUVEC en una matriz tumoral (Matrigel, BD) capaz de promover la formación de una organización súper celular, en un medio basal RPMI suplementado con 5% de suero. Tras la incubación a 37° C en 5% de CO₂ durante 4 horas, se observaron las células bajo un microscopio invertido de contraste de fases. Las figuras 7A y 7C muestran que la estimulación con rhsCD154 (100 ng / ml) indujo, ya después de 4 horas, la formación de una red endotelial compleja, mientras que la incubación previa de rhsCD154 (100 ng / ml) durante 15 minutos a 37° C con el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), así como con el anticuerpo anti-CD154 humano de bloqueo, una estimulación completamente anulada (figuras 7A, 7D y 7F). Por el contrario, la incubación previa de rhsCD154 (100 ng / ml) durante 15 minutos a 37° C con péptido de control 4.10-ala (SEQ ID NO. 8), no afectó la capacidad de las células para formar líneas de células de tipo vascular (figura 7E). Los otros péptidos anti-CD154 humanos, tales como 4.6 (SEQ ID NO. 3) y 4.11 (SEQ ID NO. 7), que no se enlazan específicamente al sitio activo, no fueron capaces de reducir significativamente la estimulación de CD40 endotelial (datos no mostrados).

45 Por último, se analizó el efecto anti-angiogénico del péptido 4.10 en un ensayo de angiogénesis *in vivo*. Se mezclaron células HUVEC endoteliales (2×10^6), resuspendidas en 200 μl de solución de HANK, con 500 μl de Matrigel en forma líquida que contiene rhsCD154 (100 ng / ml), y se inocularon por vía subcutánea en ratones SCID en el lado derecho e izquierdo de la cadera, en presencia y en ausencia de péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), respectivamente. Después de 6 días, se sacrificaron los ratones y se recuperaron los tapones de Matrigel y se los fijó en solución de formalina al 10% durante al menos 24 horas, después se procesaron para el análisis inmunohistoquímico. Las secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de injertos de HUVEC y rhsCD154 mostraron una fuerte angiogénesis (figuras 8A y 8B), que fue inhibida significativamente o estaba completamente ausente en inóculos en los cuales se incubó previamente sCD154 con el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6), en donde la mayoría de las células habían experimentado apoptosis (figuras 8A y 8C).

55 El péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6) también demostró ser capaz de inhibir la supervivencia de células tumorales de LLC obtenidas *in vivo* por medio del cultivo en presencia de IL-4. La resistencia a la apoptosis y la supervivencia mejorada de las células de LLC se cree que son las responsables de la expansión *in vivo* de estas células tumorales en pacientes con leucemia linfocítica crónica. Estos resultados indican que la interacción entre CD40 y su ligando CD154 es importante para la estimulación de la supervivencia de las células LLC y que la inhibición de la interacción CD40:CD154 con un péptido que es capaz de reconocer el sitio activo de CD154 puede inhibir la supervivencia de estas células (figura 9). Por último, una de las principales ventajas del péptido 4.10 péptido es su falta de reactividad
 60

frente a las plaquetas humanas. Se sabe que en el pasado, se descontinuaron repentinamente una serie de ensayos clínicos llevados a cabo para probar los anticuerpos monoclonales anti-CD154 prometedores debido a los efectos secundarios protrombóticos dramáticos (Kelsoe G. et al., J. Clin. Invest. 2003). La hipótesis es que los anticuerpos anti-CD154 habían provocado una reacción cruzada en la superficie de las plaquetas humanas que expresan el receptor para la fracción de inmunoglobulina Fc (FcR) y, después de la activación, la molécula CD154. Por lo tanto, los inventores evaluaron el efecto del péptido 4.10 sobre las plaquetas, por medio de un ensayo de agregación plaquetaria. Tales experimentos se llevaron a cabo por medio del uso de un agregómetro termostático, equipado con un agitador magnético y un medidor de densidad óptica en tiempo real. Se evaluó la agregación de plaquetas como el cambio en la densidad óptica en comparación con la muestra de referencia (blanco). Los experimentos se llevaron a cabo sobre las plaquetas extraídas de la sangre entera periférica de donantes sanos recogidas en tubos que contenían 5U/ml de heparina. En particular, se obtuvo el plasma enriquecido en plaquetas (PRP), por centrifugación de la sangre entera a 900 rpm durante 20 minutos, mientras que el plasma pobre en plaquetas (PPP), que se utiliza como la muestra de referencia, se obtuvo recogiendo el sobrenadante después de otra centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Como se demostró anteriormente por Langer (Langer F. et al., Thromb. Haemost. 2005), el cebado de las plaquetas por incubación durante 10 minutos a 37° C con inmunocomplejos que consisten de CD154 soluble recombinante humano y el anticuerpo monoclonal anti-CD154 mejoraron la agregación plaquetaria inducida por estimulación posterior con ADP 0,5 µM (Figura 10). Por el contrario, el cebado con CD154 solo o en combinación con el péptido 4.10 (60 µM) no mejoró la agregación plaquetaria inducida por estimulación con ADP 0,5 µM (Figura 10). Se obtuvieron resultados similares induciendo agregación plaquetaria con 0,3 U / ml de trombina.

Dado que las células endoteliales con frecuencia expresan CD40 en su superficie, especialmente en el sitio de la inflamación, y puesto que la angiogénesis puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de varios procesos y enfermedades inflamatorias, las propiedades ilustradas anteriormente del péptido 4.10 de la invención vuelve a dicho péptido una molécula muy prometedor para el desarrollo de enfoques antiinflamatorios potenciales. Además, el efecto inhibidor ejercido por el péptido 4.10 (SEQ ID NO. 6) en la activación de linfocitos, proporciona un uso potencial de esta molécula como una terapia inmunosupresora destinada a trasplantes o a enfermedades tumorales en las que la proliferación de células tumorales es ayudada por el efecto anti-apoptótico resultante de la estimulación de CD40, tales como por ejemplo en la leucemia linfocítica crónica (LLC).

Tabla 1

Clon	Secuencia	SEQ ID NO:
4.1	-	-
4.2=4.3	CPSGHTKAC	1
4.4	CGTHSSRIC	2
4.5	-	-
4.6	CLGTQNKEC	3
4.7=4.12	CTPGKPHSC	4
4.8	CKAASANIC	5
4.9	-	-
4.10	CLPTRHMAC(*)	6

ES 2 436 427 T3

(continuación)

Clon	Secuencia	SEQ ID NO:
4.11	CLSAVHNMCM	7
(*) péptido de acuerdo con la invención		

Tabla II

Clon	Secuencia	SEQ ID NO:
4.10-ala	CLPTAHMAC	8
4.101	CIPTRHMAC	9
4.102	CLPSRHMAC	10
4.103	CIPTRHMVC	11
4.104	CLPTRWMAC	12

5

Listado de secuencias

<110> FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND GMBH

<120> Péptido sintético que se enlaza con CD154 humano y usos del mismo

<130> PC862EC

10 <160> 13

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> Seleccionada al azar a partir de una biblioteca de péptidos expresada en fagos M13

<400> 1

Cys Pro Ser Gly His Thr Lys Ala Cys
1 5

20 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

ES 2 436 427 T3

<213> artificial

<220>

<223> Seleccionada al azar a partir de una biblioteca de péptidos expresada en fagos M13

<400> 2

5 Cys Gly Thr His Ser Ser Arg Ile Cys
 1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

10 <220>

<223> Seleccionada al azar a partir de una biblioteca de péptidos expresada en fagos M13

<400> 3

 Cys Leu Gly Thr Gln Asn Lys Glu Cys
 1 5

<210> 4

15 <211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Seleccionada al azar a partir de una biblioteca de péptidos expresada en fagos M13

20 <400> 4

 Cys Thr Pro Gly Lys Pro His Ser Cys
 1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> Seleccionada al azar a partir de una biblioteca de péptidos expresada en fagos M13

<400> 5

 Cys Lys Ala Ala Ser Ala Asn Ile Cys
 1 5

ES 2 436 427 T3

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> Seleccionada al azar a partir de una biblioteca de péptidos expresada en fagos M13

<400> 6

Cys Leu Pro Thr Arg His Met Ala Cys
1 5

<210> 7

10 <211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Seleccionada al azar a partir de una biblioteca de péptidos expresada en fagos M13

15 <400> 7

Cys Leu Ser Ala Val His Asn Met Cys
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

20 <213> artificial

<220>

<223> Seleccionada al azar a partir de una biblioteca de péptidos expresada en fagos M13

<400> 8

Cys Leu Pro Thr Ala His Met Ala Cys
1 5

25 <210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

ES 2 436 427 T3

<223> modificación de la SEQ ID NO: 6

<400> 9

Cys Ile Pro Thr Arg His Met Ala Cys
1 5

<210> 10

5 <211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> modificación de la SEQ ID NO: 6

10 <400> 10

Cys Leu Pro Ser Arg His Met Ala Cys
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> modificación de la SEQ ID NO: 6

<400> 11

Cys Ile Pro Thr Arg His Met Val Cys
1 5

20 <210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> modificada a partir de la SEQ ID NO: 6

<400> 12

Cys Leu Pro Thr Arg Trp Met Ala Cys
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> modificada a partir de la SEQ ID NO: 6

5 <400> 13

Leu Pro Thr Arg His Met Ala
 1 5

Referencias

1. van Kooten, C., and J. Banchereau. 2000. CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 67: 2 - 17.
- 10 2. Aruffo, A., M. Farrington, D. Hollenbaugh, X. Li, A. Milatovich, S. Nonoyama, J. Bajorath, L. S. Grosmaire, R. Stenkamp, M. Neubauer, et al. 1993. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with Xlinked hyper-IgM syndrome. *Cell.* 72: 291 - 300.
3. Schonbeck, U., y P. Libby. 2001. CD40 signaling and plaque instability. *Circ. Res.* 89: 1092 - 1103.
4. Henn, V., J. R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus, y R. A. KroczeK. 1998. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 391: 591-594.
- 15 5. Biancone, L., V. Cantaluppi, y G. Camussi. 1999. CD40 - CD154 interaction in experimental and human disease. *Int. J. Mol. Med.* 3: 343 - 353.
6. Buchner, K., V. Henn, M. Grafe, O. J. de Boer, A. E. Becker, y R. A. KroczeK. 2003. CD40 ligand is selectively expressed on CD4+ T cells and platelets: implications for CD40 - CD40L signalling in atherosclerosis. *J. Pathol.* 201: 288 - 295.
- 20 7. Bussolati, B., S. Russo, I. Deambrosis, V. Cantaluppi, A. Volpe, U. Ferrando, y G. Camussi. 2002. Expression of CD154 on renal cell carcinomas and effect on cell proliferation, motility and platelet-activating factor synthesis. *Int. J. Cancer.* 100: 654 - 661.
8. Biancone, L., V. Cantaluppi, M. Boccellino, L. Del Sorbo, S. Russo, .A. Albini, I. Stamenkovic, y G. Camussi. 1999. Activation of CD40 favors the growth and vascularization of Kaposi's sarcoma. *J. Immunol.* 163: 6201 - 6208.
- 25 9. Cantaluppi, V., M. C. Deregibus, L. Biancone, I. Deambrosis, B. Bussolati, A. Albini, y G. Camussi. 2006. The expression of CD154 by Kaposi's sarcoma cells mediates the anti-apoptotic and migratory effects of HIV-1-TAT protein. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 19: 81 - 96.
10. Hill, S. C., S. J. Youde, S. Man, G. R. Teale, A. J. Baxendale, A. Hislop, C. C. Davies, D. M. Luesley, A. M. Blom, A. B. Rickinson, L. S. Young, y A. G. Eliopoulos. 2005. Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis. *J. Immunol.* 174: 41 - 50.
- 30 11. Melichar, B., R. Patenia, S. Gallardo, K. Melicharova, W. Hu, y R. S. Freedman. 2007. Expression of CD40 and growth-inhibitory activity of CD40 ligand in ovarian cancer cell lines. *Gynecol. Oncol.* 104: 707 - 713.
12. Eliopoulos, A. G., y L. S. Young. The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. 2004. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4: 360 - 367.
- 35 13. Dicker F., Kater A. P., Prada C. E., Fukuda T., y Kipps T. J. 2006. CD154 induces p73 to overcome the resistance to apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells lacking functional p53. *Blood.* 108: 450 - 3457.
14. Boumpas, D. T., R. Furie, S. Manzi, G. G. Illei, D. J. Wallace, J. E. Balow, y A. Waishnaw. 2003. A short course of BG 9588 (anti CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum.* 46: 3251 - 3258.
- 40 15. Liossis, S. N., y P. P. Sfrikakis. 2004. Costimulation blockade in the treatment of rheumatic diseases. *BioDrugs.*

18: 95 - 102.

16. Daoussis, D., A. P. Andonopoulos, S. N. Liossis. 2004. Targeting CD40L: a promising therapeutic approach. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11: 635 - 641.

5 17. Molano, R. D., T. Berney, H. Li, P. Cattan, A. Pileggi, C. Vizzardelli, N. S. Kenyon, C. Ricordi, L. C. Burkly, y L. Inverardi. 2001. Prolonged islet graft survival in NOD mice by blockade of the CD40-CD154 pathway of T-cell costimulation. *Diabetes.* 2001. 50: 270 - 276.

18. Quezada, S. A., B. Fuller, L. Z. Jarvinen, M. Gonzalez, B. R. Blazar, A. Y. Rudensky, T. B. Strom, y R. J. Noelle. 2003. Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation. *Blood.* 102: 1920 - 1926.

10 19. Elster, E. A., D. A. Hale, R. B. Mannon, L. C. Cendales, S. J. Swanson, y A. D. Kirk. 2004. The road to tolerance: renal transplant tolerance induction in nonhuman primate studies and clinical trials. *Transpl. Immunol.* 13: 87 - 99.

20. Xu, H., X. Zhang, R. B. Mannon, y A. D. Kirk. 2006. Platelet-derived or soluble CD154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD154. *J. Clin. Invest.* 116: 769 - 774.

15 21. Snanoudj, R., H. de Preneuf, C. Creput, N. Arzouk, B. Deroure, S. Beaudreuil, A. Durrbach, y B. Charpentier. 2006. Costimulation blockade and its possible future use in clinical transplantation. *Transpl. Int.* 19: 693 - 704.

22. Nanji, S. A., W. W. Hancock, B. Luo, C. D. Schur, R. L. Pawlick, L. F. Zhu, C. C. Anderson, y A. M. Shapiro. 2006. Costimulation blockade of both inducible costimulator and CD40 ligand induces dominant tolerance to islet allografts and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Diabetes.* 55: 27 - 33.

20 23. Allen, S. D., S. V. Rawale, C. C. Whitacre, y P. T. P. Kaumaya. 2005. Therapeutic peptidomimetic strategies for autoimmune diseases: costimulation blockade. *J. Peptide Res.* 65 : 591 - 604.

24. Ladner, R.C., A.K. Sato, J. Gorzelany y M. de Souza. 2004. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *DDT.* 12: 525 - 529.

25 25. Hetian, L., A. Ping, S. Shumei, L. Xiaoying, H. Luowen, W. Jian , M. Lin, L. Meisheng, Y. Junshan y S. Chengchao. 2002. A novel peptide isolated from phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *J. Biol. Chem.* 277: 43137 - 43142.

26. Kelsoe, G. 2003. Therapeutic CD154 antibody for lupus: promise for the future? *J. Clin. Invest.* 112: 1480 - 1482.

30 27. Langer, F., S. B. Ingersoll, A. Amirhosravi, T. Meyer, F. A. Siddiqui, S. Ahmad, J. M. Walker, M. Amaya, H., Desai, J. L. Francis. 2005. The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation. *Thromb. Haemost.* 93: 1137 - 1146.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido capaz de enlazarse selectivamente al sitio activo del receptor de CD154 y capaz de inhibir la interacción CD40:CD154, que comprende la secuencia de siete aminoácidos de enlazamiento de CD154 SEQ ID NO: 13.
- 5 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que es de 7 a 30 aminoácidos de longitud.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de aminoácidos de enlazamiento de CD154 SEQ ID NO. 13 está flanqueada por 1 cisteína en cada extremo de la secuencia, proporcionando de este modo la secuencia de nueve aminoácidos SEQ ID NO: 6.
4. El péptido de acuerdo con la reivindicación 3, que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.
- 10 5. Una estructura multimérica que comprende una pluralidad de copias del péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. La estructura multimérica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde cada una de las copias del péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 está enlazada con al menos otra copia por medio de al menos un espaciador de aminoácidos.
- 15 7. La estructura multimérica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el espaciador de aminoácidos es un residuo de Gly (G).
8. La estructura multimérica de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende un núcleo de aminoácidos al cual está directa o indirectamente enlazado cada una de las copias del péptido, en donde el núcleo de aminoácidos se compone de una pluralidad de residuos de Lys (K).
- 20 9. Un conjugado que comprende al menos un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o al menos una estructura multimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, conjugado con una molécula seleccionada del grupo que consiste de biomoléculas, agentes de diagnóstico y agentes terapéuticos.
10. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el agente terapéutico es un agente antiinflamatorio, inmunosupresor, inmunomodulador o anti-tumoral.
- 25 11. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la estructura multimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para uso como un medicamento.
12. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una estructura multimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la interacción CD40:CD154.
- 30 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la enfermedad o el trastorno es inflamación.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la inflamación es una enfermedad inflamatoria seleccionada entre aterosclerosis, enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la enfermedad es una enfermedad tumoral.
- 35 16. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una estructura multimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

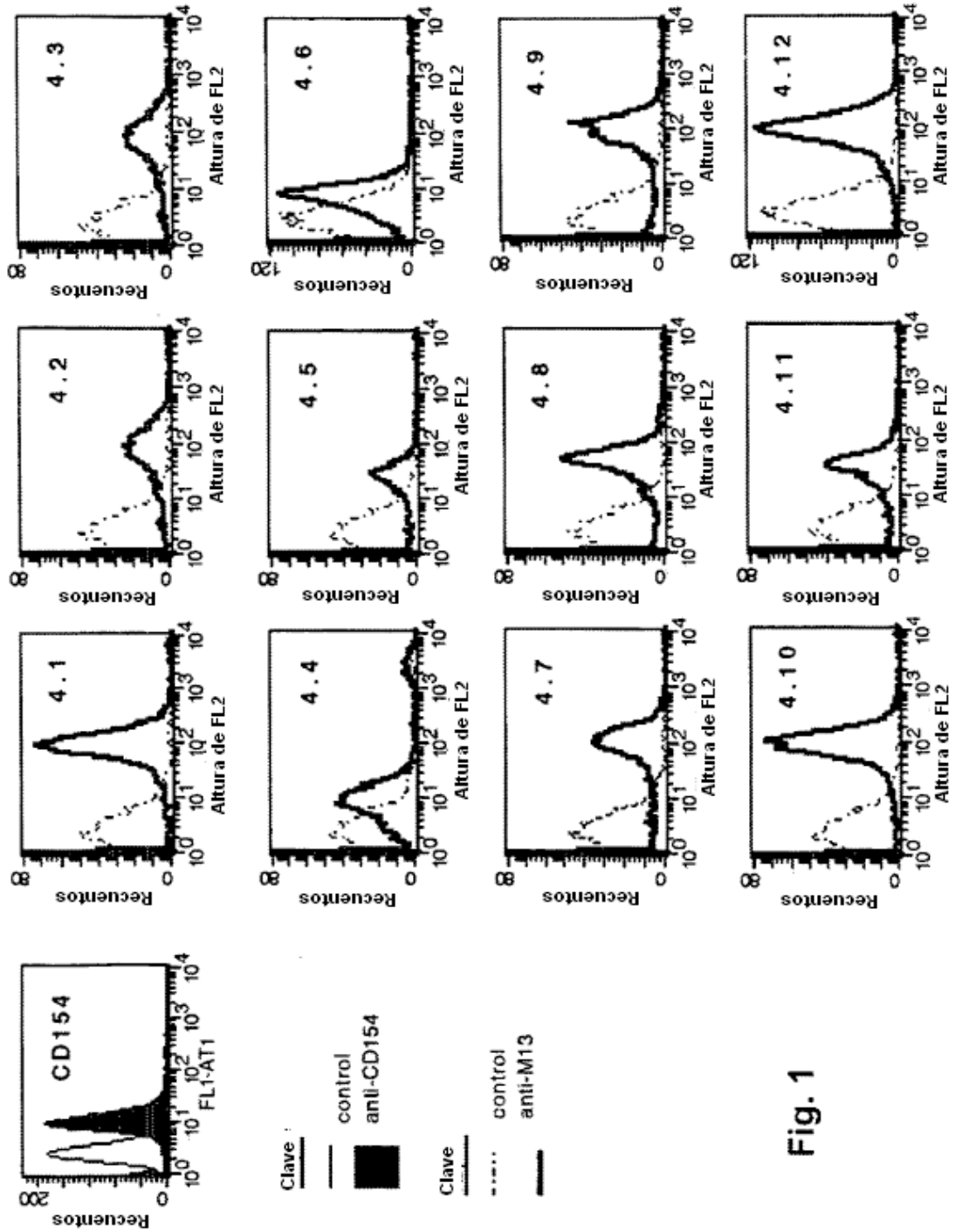


Fig. 1

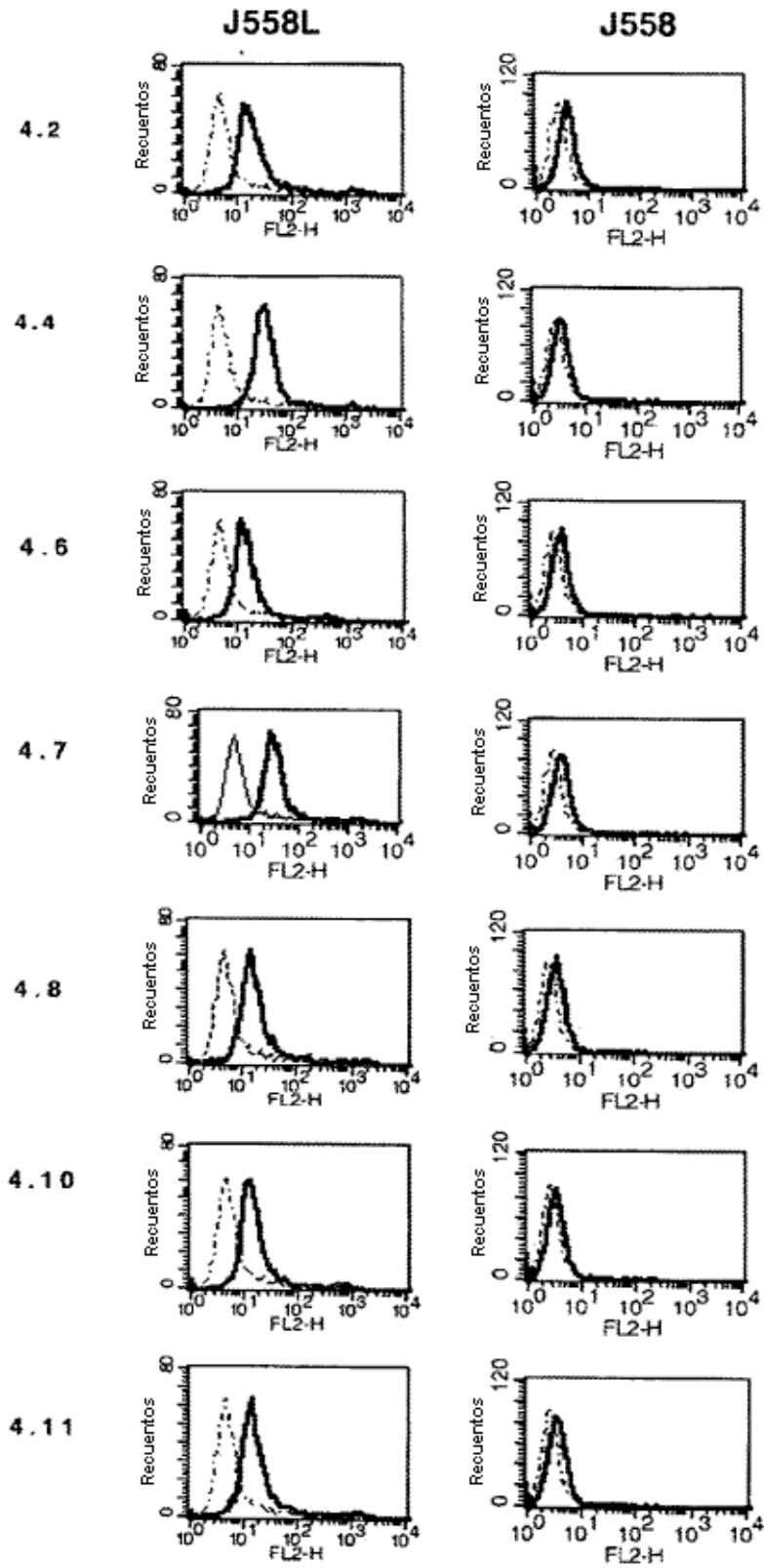
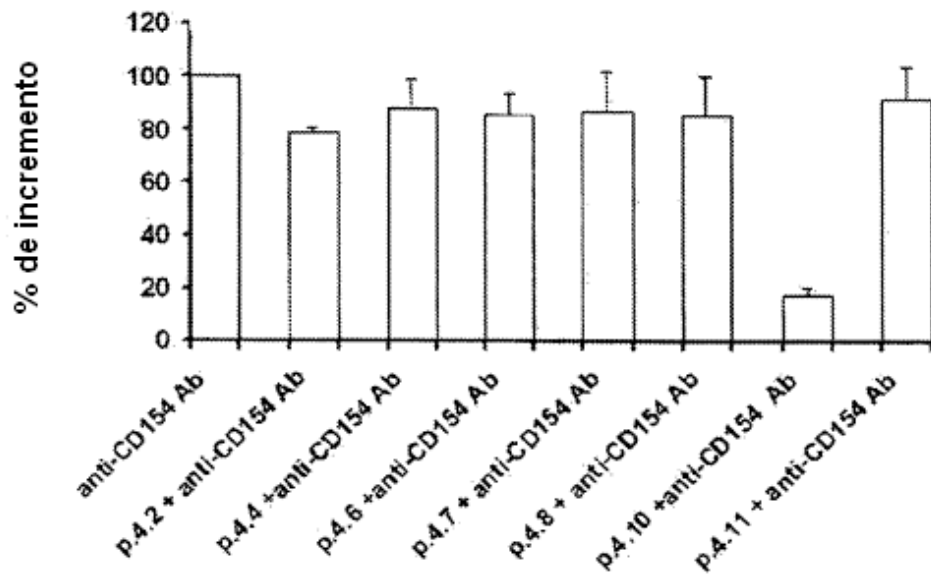


Fig. 2

A



B

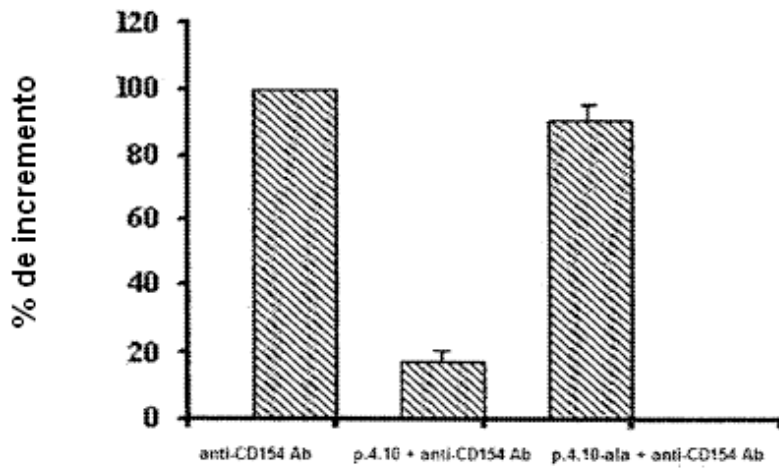


Fig. 3

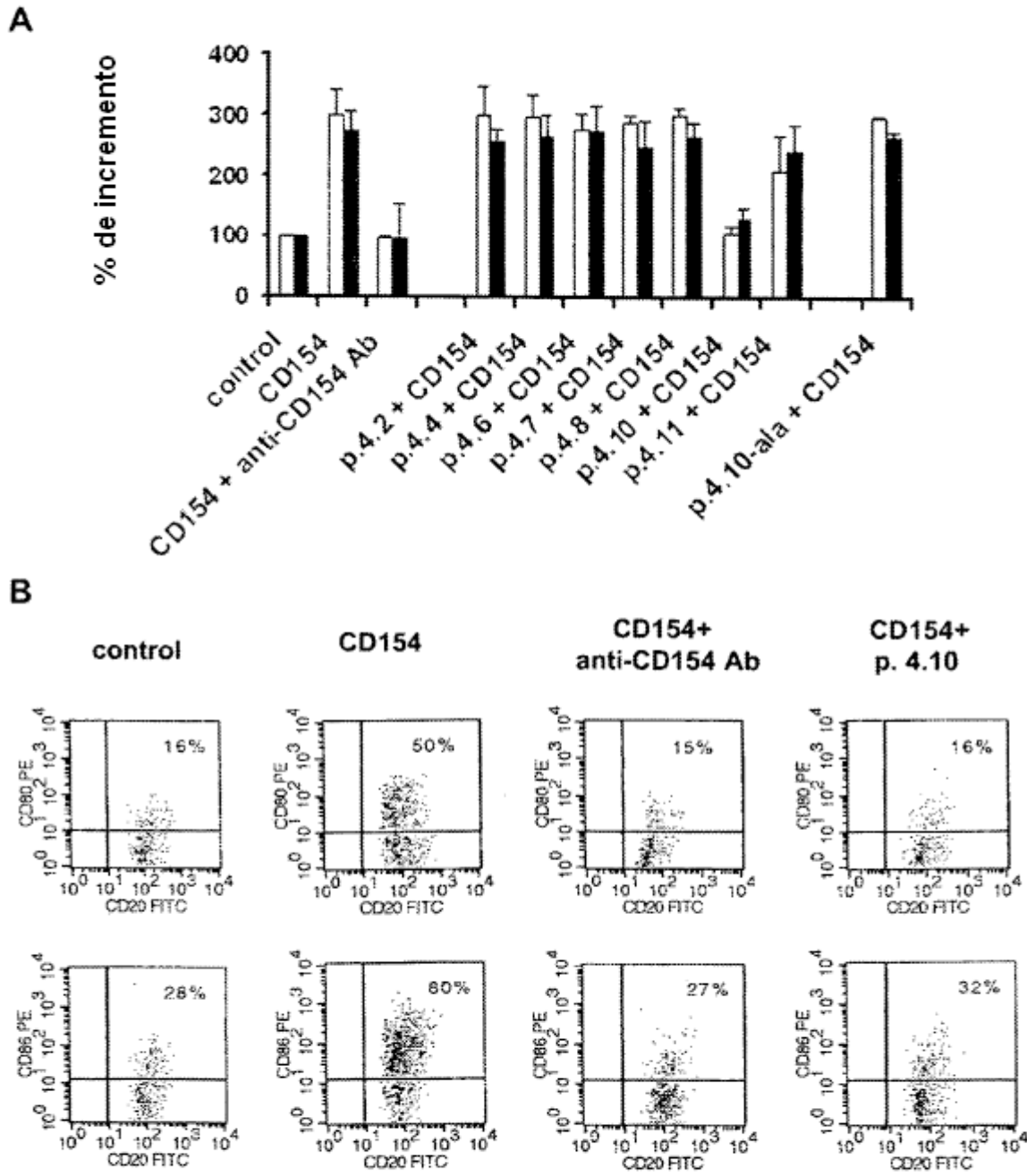
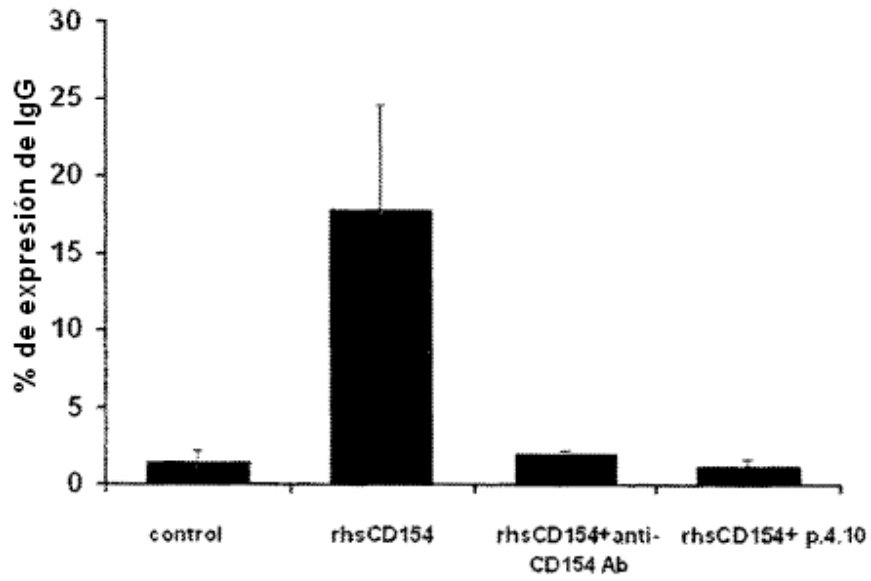


Fig. 4

A



B

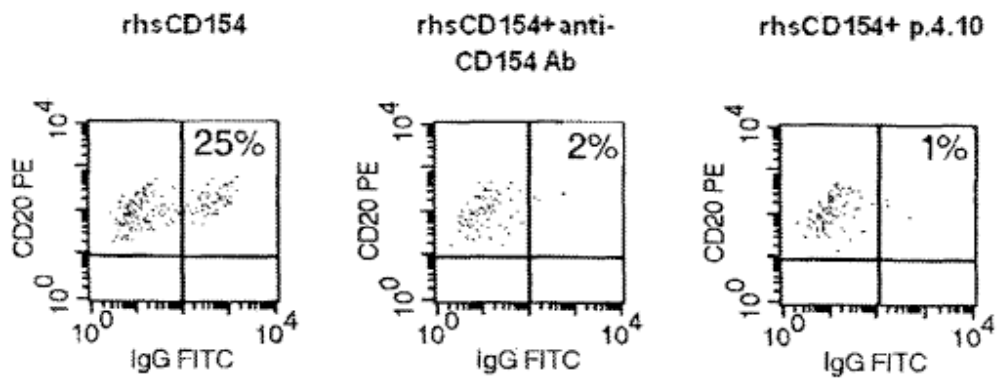


Fig. 5

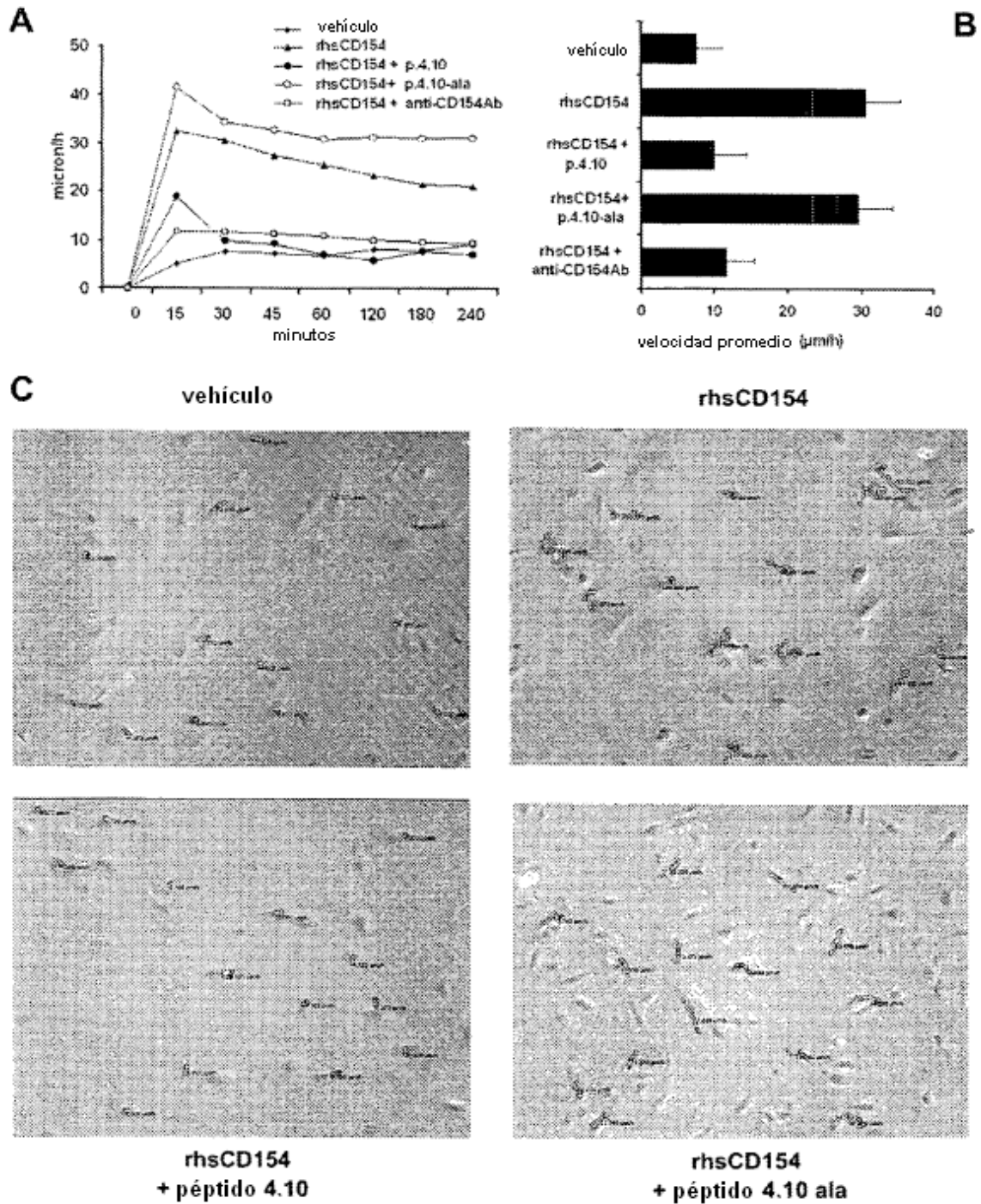


Fig. 6

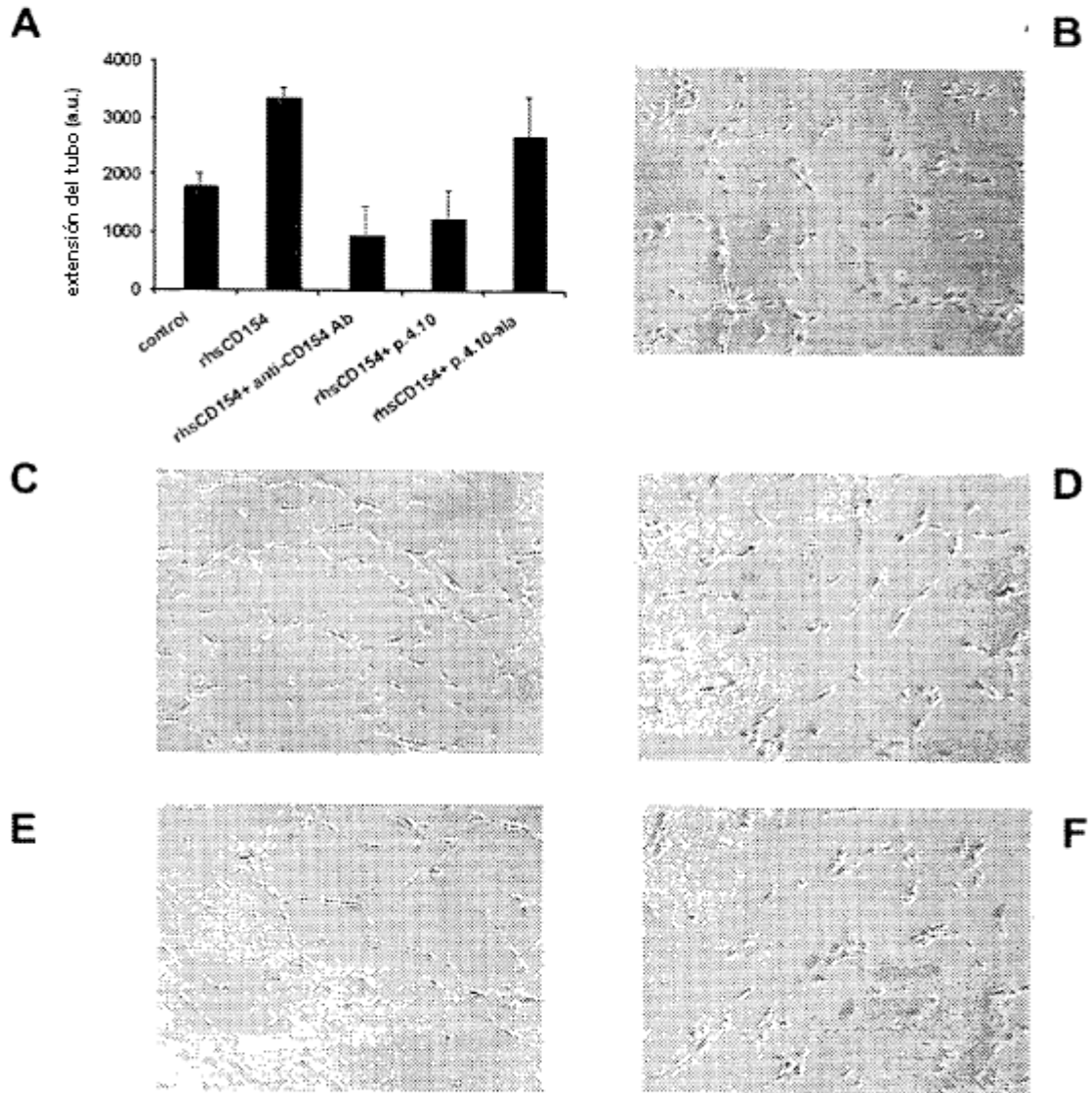


Fig. 7

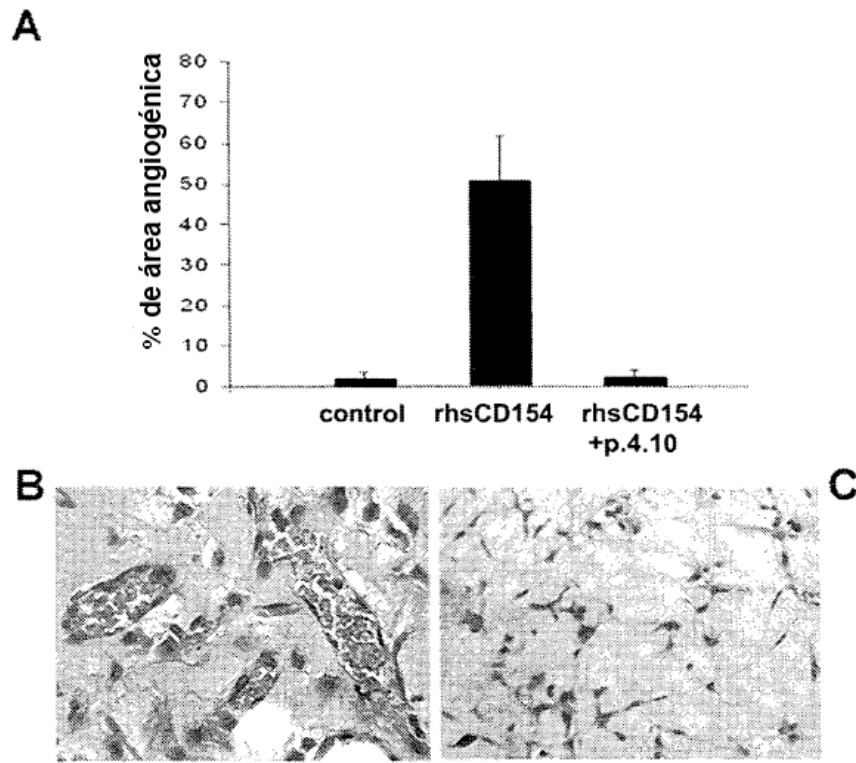


Fig. 8

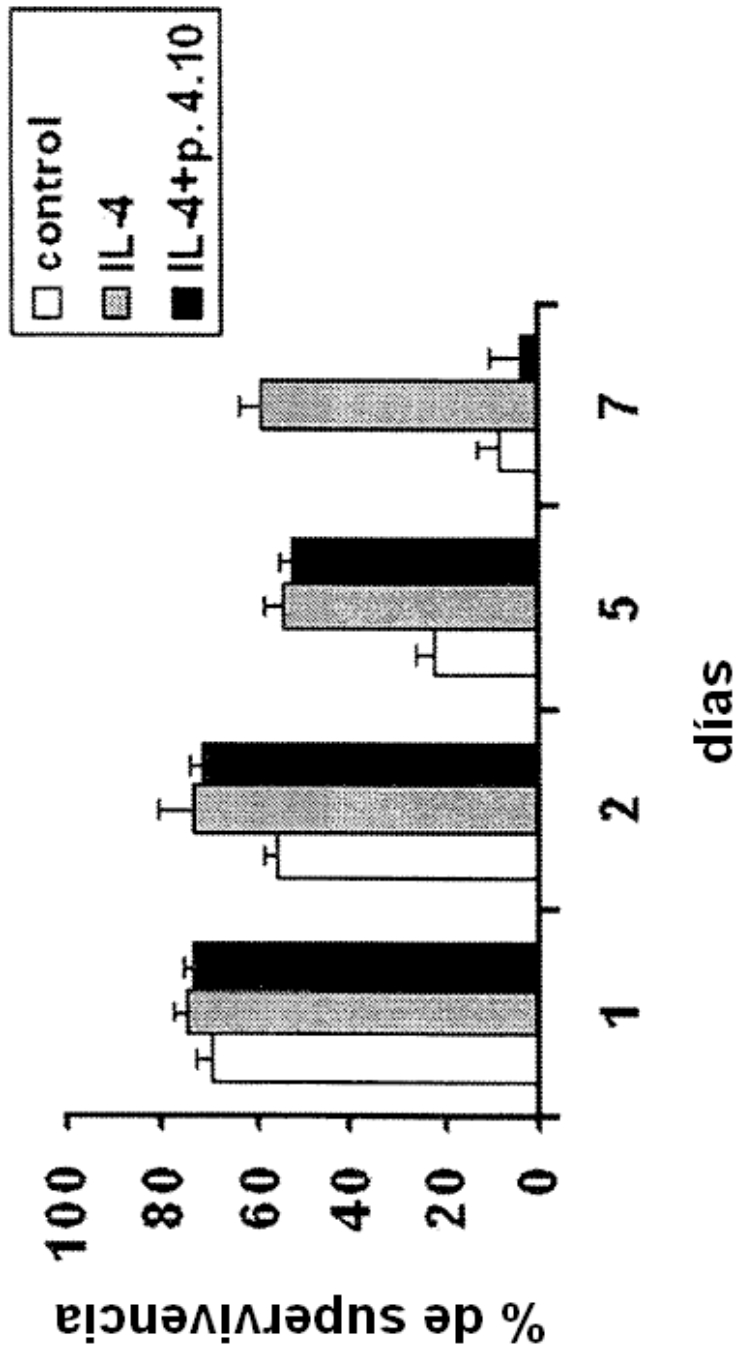


Fig. 9

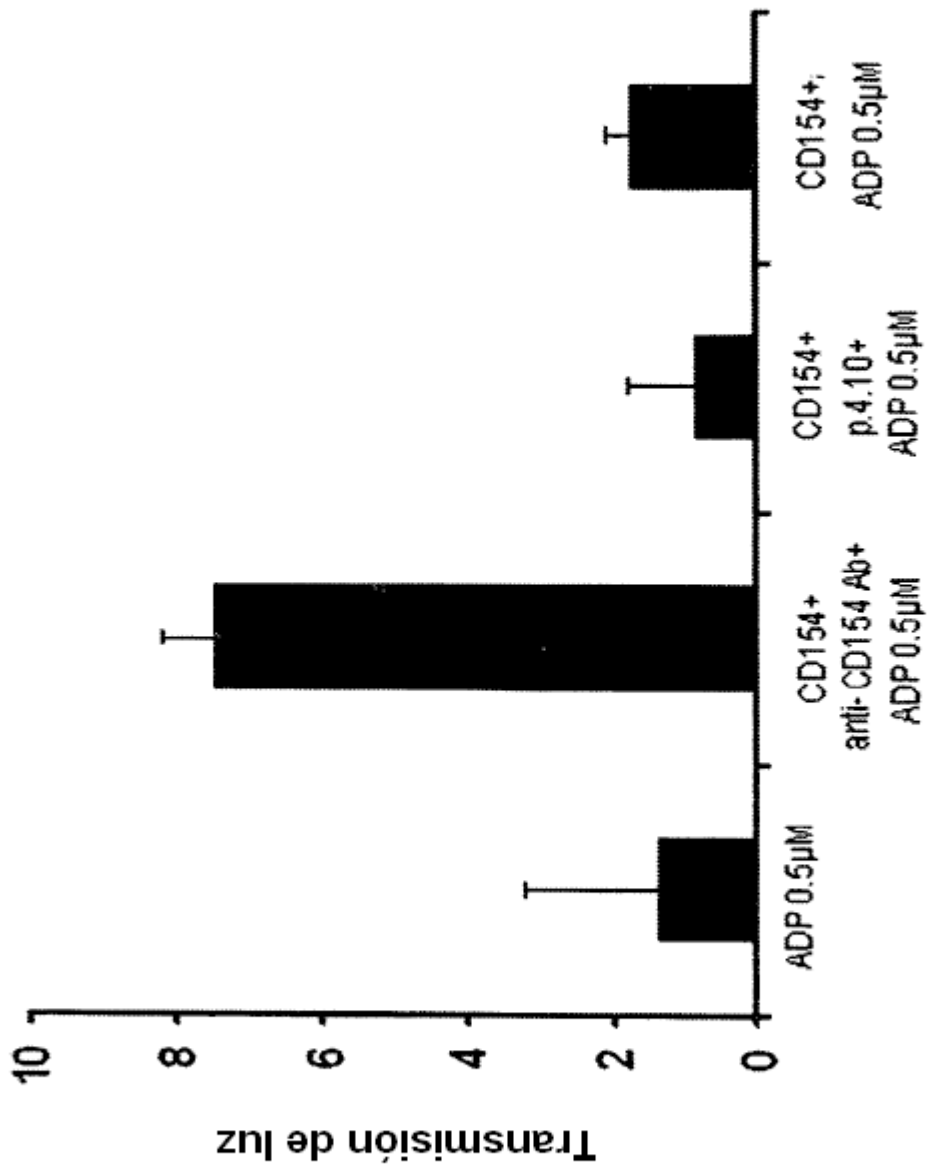


Fig. 10