

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 679**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2012 PCT/EP2012/062379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13000922**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2012 E 12733026 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2723360**

54 Título: **Péptidos antagonistas de CCR2**

30 Prioridad:

27.06.2011 EP 11305816

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.10.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)
(100.0%)
4, Place Jussieu
75005 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**COMBADIÈRE, CHRISTOPHE;
SENNLAUB, FLORIAN;
AUVYNET, CONSTANCE;
CHEMTOB, SYLVAIN y
QUINIOU, CHRISTIANE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 636 679 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

Péptidos antagonistas de CCR2

La invención se refiere a los péptidos antagonistas del receptor 2 de quimiocina CC (CCR2).

Antecedentes de la invención

- 5 CCR2 es un miembro de la familia de receptores RAPG (receptor acoplado a proteínas G) como todos los receptores de quimiocina conocidos y son expresados por los monocitos y linfocitos T memoria. La cascada de señalización de CCR2 implica la activación de las proteínas G heterotriméricas, fosfolipasas (y particularmente PLC β 2), proteínas cinasas como PKC y PI-3K y el aumento de calcio citosólico.
- 10 Las citocinas quimioatrayentes (es decir, quimiocinas) son proteínas relativamente pequeñas (8-10 kD) que desencadenan la migración de las células. La familia de quimiocinas se divide en cuatro subfamilias en función de la cantidad y espacio de los residuos de aminoácidos entre la primera y segunda cisteína altamente conservadas.
- 15 La quimiocina denominada CCL2 (también conocida como proteína quimiotáctica de monocitos-1 o MCP-1) es un miembro de la subfamilia de quimiocinas CC (en donde CC representa la subfamilia que contiene la primera y segunda cisteína adyacentes) y se une al receptor 2 de quimiocina (CCR2) de la superficie celular. CCL2 es un factor quimiotático potente que, luego de unirse a CCR2, intercede en la migración de monocitos y linfocitos (es decir, quimiotaxis) hacia un sitio de inflamación. Una gran variedad de tipos celulares producen CCL2 en respuesta a afecciones inflamatorias, tales como células del músculo cardíaco, células endoteliales del vaso sanguíneo, fibroblastos, condrocitos, células del músculo liso, células mesangiales, células alveolares, linfocitos T, macrófagos, neuronas y similares.
- 20 Luego de que los monocitos ingresan al tejido inflamatorio y se diferencian en macrófagos, la diferenciación de monocitos proporciona una fuente secundaria de varios moduladores proinflamatorios, que incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina -1 (IL-1), CXCL-8 (un miembro de la subfamilia de la quimiocina CXC, en donde CXC representa un residuo de aminoácido entre la primera y segunda cisteína), IL-12, metabolitos del ácido araquidónico (por ejemplo, PGE2 y LTB4), radicales libres derivados del oxígeno, metaloproteinasas de matriz y
- 25 componentes del complemento.
- Estudios de modelos en animales de enfermedades inflamatorias crónicas han demostrado que la inhibición de la unión entre CCL2 y CCR2 por un antagonista suprime la respuesta inflamatoria. La interacción entre CCL2 y CCR2 ha sido implicada (véase Rollins B J, Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease, *Mol. Med. Today*, 1996, 2:198; y Dawson J, et ál., Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signaling in disease, *Expert Opin. Ther. Targets*, Febrero 2003, 7(1):35-48) en patologías
- 30 de enfermedades inflamatorias tales como uveítis, aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, nefritis, rechazo del aloinjerto de órganos, pulmón fibroide, insuficiencia renal, diabetes y complicaciones de la diabetes, nefropatía diabética, retinopatía diabética, retinitis diabética, microangiopatía diabética, tuberculosis, sarcoidosis, estafilococia invasiva, inflamación posterior a la cirugía de cataratas, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, urticaria crónica, asma alérgico, enfermedades periodontales, periodontitis, gingivitis, enfermedad periodontal, cardiomiopatías diastólicas, infarto de miocardio, miocarditis, insuficiencia cardíaca crónica, angioestenosis, restenosis, trastornos por reperfusión, glomerulonefritis, tumores sólidos y cánceres, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, mieloma maligno, enfermedad de Hodgkin y carcinomas de vejiga, mama, cuello de útero, colon, pulmón, próstata o estómago.
- 35 La migración de monocitos es inhibida por los antagonistas de CCL2 (tanto anticuerpos como fragmentos inactivos, solubles de MCP-1) que se ha demostrado inhiben el desarrollo de la artritis, asma y uveítis. Los ratones knockout (KO) para CCR2 y CCL2 han demostrado que la infiltración de monocitos en lesiones inflamatorias está significativamente disminuida. Además, dichos ratones KO son resistentes al desarrollo de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE, un modelo de esclerosis múltiple humano), asma inducido por alérgenos de cucaracha, aterosclerosis y uveítis. Los pacientes con artritis reumatoide y enfermedad de Crohn han mejorado durante el tratamiento con antagonistas de TNF- α (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y receptores solubles) a niveles de dosis correlacionadas con disminuciones en la expresión de CCL2 y la cantidad de macrófagos infiltrantes.
- 40 Por lo tanto, los antagonistas de CCR2 representan una nueva clase de agentes terapéuticos importantes. Hasta ahora los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de químicos (véase, por ejemplo, Brodmerkel et ál, *J. Immunol*, 2005, 175:5370-7378) o anticuerpos anti CCR2 (véase, por ejemplo, US 7,566,539). Ejemplos de antagonistas de CCR2 se describen en Struthers et ál, *Current topics in medicinal chemistry*, 2010, 10(13):1278-1298; Xia Mingde et ál, *Expert Opinion on therapeutic patents*, 2009, 19(3):295-303; Gong et ál, *the Journal of Experimental Medicine*, 1997, 180(1): 131-137; Me Quibean et ál, *Blood*, 2002, 100(4):1160-1167.
- 45 Siguen siendo necesarias las moléculas pequeñas antagonistas de CCR2 específicas para la prevención, tratamiento o mejora de un trastorno mediado por CCR2.
- 55

Compendio de la invención

Los inventores diseñaron una serie de péptidos pequeños entre 5 y 7 aminoácidos desde las regiones yuxtamembranas extracelulares de CCR2. Entre todos los péptidos analizados, el heptapéptido LGTFLKC, denominado ECL1 (C) inverso, presentó las propiedades más interesantes como péptido antagonista no competitivo de CCR2. Este péptido corresponde a una secuencia invertida en el tercer dominio transmembrana de CCR2, más precisamente en la región N- terminal y yuxtamembrana del tercer dominio transmembrana.

Por lo tanto, la descripción proporciona un péptido que comprende o consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos Thr-Phe-Leu-Lys-Cys (SEQ ID NO:1).

Los inventores luego comprobaron que el residuo de cisteína podría eliminarse o reemplazarse, mostrando aún una actividad de interés del antagonista de CCR2, en particular, los péptidos correspondientes aún presentan el nivel de actividad del péptido de SEQ ID NO:1.

Se describe además un péptido que comprende o consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos Thr-Phe-Leu-Lys (SEQ ID NO:17).

Un objeto de la invención es un péptido que consiste en

i) LGTFLKC (SEQ ID NO: 3) o AGTFLKC (SEQ ID NO:20);

ii) una secuencia que deriva de SEQ ID NO:3 o 20 por el extremo N-terminal en la forma de

un grupo acetilo, y/o el extremo C-terminal en la forma de un grupo amida;

y en donde todos los aminoácidos del péptido están en la configuración D.

Otro objeto de la invención es un compuesto que comprende cualquiera de dichos péptidos enlazados con al menos un resto no peptídico que puede ser polietilenglicol, por ejemplo.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un péptido o compuesto tal como se describe en la presente memoria, en relación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los péptidos de la invención son fáciles de producir y de administrar.

Títulos de las figuras

Figura 1: ECL1 (C) inverso es un potente antagonista de CCR2. (A) efecto inhibitor de ECL1 (C) inverso en concentraciones indicadas sobre la liberación de calcio inducido por CCL2 (50 nM) sobre HEK-CCR2. El IC₅₀ para ECL1 (C) inverso es 0,75 μM. Se muestra uno de tres experimentos representativos y los datos se incluyen en una curva de respuesta de dosis estándar (software GraphPad Prism 5). **Inserto:** Las células HEK-CCR2, analizadas para la respuesta de calcio en función de CCL2 en concentraciones indicadas, permiten determinar una EC₈₀ de 50 nM. (B) Efecto inhibitor de ECL1 (C) inverso sobre la incorporación de β-arrestina inducida por CCL2 a una EC₈₀ de 12,5 nM. Los datos representan triplicados de tres experimentos independientes.

Figura 2: ECL1 (C) inverso es un antagonista específico de CCR2. (A) No hay efecto inhibitor de ECL1 (C) inverso en concentraciones indicadas sobre la liberación de calcio inducida por CCL5 (25 nM) sobre HEK-CCR5 (•) o HEK-CCR1 (Δ), por CX3CL1 (20 nM) sobre HEK- CX3CR1 (▼) o por ATP (10 μM) sobre células HEK (□). (B) No hay efecto citotóxico de ECL1 (C) inverso en concentraciones indicadas sobre HEK-CCR2 luego de 4 horas de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se repitieron los triplicados tres veces de forma independiente.

Figura 3: ECL1 (C) inverso inhibe específicamente la migración de células HEK-CCR2 estimuladas por CCL2. ECL1(C) inverso inhibe la migración de HEK-CCR2 inducida por CCL2 100 nM (A) con un IC₅₀ de 2 μM, pero no la de HEK-CCR5 inducida por CCL5 (10 nM) (B), de HEK-CX3CR1 inducida por CX3CL1 (10 nM) (C) o de HEK-CCR1 inducida por CCL5 (10 nM) (D). ECL1 (C) inverso a 15 μM no induce la migración de ninguna de las células HEK analizadas. ECL1 (C) inverso inhibe la migración de monocitos de ratón (CD11 b⁺ Ly6G⁻) (E) y monocitos clásicos (CD11 b⁺ Ly6G⁻ 7/4^{alto}) (F) que expresan CCR2 con una IC₅₀ de 2 μM. Los datos son el promedio de tres triplicados independientes y cada barra es un promedio de triplicados.

Figura 4: ECL1 (C) inverso es un antagonista no competitivo. (A) CCL2 reemplaza, en función de la dosis, la unión de CCL2-Alexa-647 con HEK-CCR2. (B) ECL1 (C) inverso, en concentraciones indicadas, no reemplaza la unión de CCL2-Alexa-647 con HEK-CCR2.

Figura 5: ECL1 (C) inverso inhibe la infiltración de monocitos en un modelo no infeccioso de peritonitis. Luego de la inyección intraperitoneal de 1 ml de tioglicolato al 3 %, se trató a los ratones C57BL/6 14 horas después con ECL1 (C) inverso o péptido control (90 μg/TID). 12 horas después de la última inyección, se sacrificaron a los ratones y se recolectaron células peritoneales. (A) ECL1 (C) inverso inhibe la captación de macrófagos peritoneales (CD11b⁺ Ly6G⁻ F4/80⁺), monocitos (CD11 b⁺ Ly6G⁻ F4/80⁻) pero no de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺). (B) ECL1 (C) inverso tiene un efecto inhibitor sobre la captación de todos los subconjuntos de monocitos definidos como (7/4^{alto}, 7/4^{int} y 7/4^{bajo}). n=6 ratones por grupo y los experimentos se realizaron tres veces.

Figura 6: ECL1 (C) inverso reduce la gravedad de los síntomas clínicos y evita recaídas en un modelo de esclerosis múltiple. Se evaluaron diariamente los signos clínicos de EAE mediante el siguiente sistema de puntuación: 0, ausencia de signos; 1, debilidad de extremidades posteriores; 2, debilidad de extremidades posteriores y parálisis de cola; 3, parálisis de cola y de extremidades posteriores; 4, parálisis de cola y de extremidades posteriores y debilidad de extremidad anterior; 5, moribundo; y 6, muerte. Los ratones recibieron 2 inyecciones intraperitoneales de 90 µg de ECL-1 ECL1 (C) inverso en el tiempo señalado en la figura. Los grupos control recibieron solamente PBS o péptido revuelto a la misma concentración que el ECL1 (C) inverso.

Figura 7: ECL1 (C) inverso aumenta la supervivencia de los ratones que desarrollan metástasis hepática.

Se inyectaron por vía intravenosa células del linfoma EL4 y se monitoreó la supervivencia de los ratones. Se inyectó por vía intraperitoneal ECL1 (C) inverso (90 µg/ratón/inyección) o péptidos irrelevantes comenzando el día 12 luego de la inoculación del tumor 3 veces por semana hasta el día 23.

Figura 8: ECL1 (C) inverso reduce la acumulación de células microgliales en el espacio subretiniano en la degeneración retiniana. Se analizaron modelos de ratones de degeneración retiniana con el péptido ECL1 (C) inverso, tal como se explicó en el Ejemplo 4. Se evaluaron la acumulación de células microgliales (MC, por sus siglas en inglés) y la degeneración retiniana.

Las figuras 9A, 9B, 9C, 9D muestran los resultados de la inhibición de la quimiotaxis por los péptidos ECL1, M2, M8 y M1, respectivamente, tal como se explicó en el Ejemplo 5. t- = control negativo (solución salina); t+= control positivo (CCL2, agonista natural de CCR2)

Descripción detallada

Definiciones

El término "paciente" o "sujeto" se refiere a un animal humano o no humano, preferiblemente un mamífero que incluye machos, hembras, adultos y niños. El paciente necesita un tratamiento en donde se desea un efecto proapoptótico y/o antiinflamatorio. Preferiblemente, se refiere típicamente a un paciente con un síndrome, trastorno o enfermedad mediada por CCR2, que es especialmente un paciente con un síndrome, trastorno o enfermedad que está asociado con una elevada expresión de CCL2 o sobreexpresión de CCL2, o un paciente con una afección inflamatoria que acompaña síndromes, trastornos o enfermedades asociados con una elevada expresión de CCL2 o sobreexpresión de CCL2.

Como se emplea en esta memoria, el término "tratamiento" y/o "terapia" incluye un tratamiento curativo y/o profiláctico. Más particularmente, el tratamiento curativo se refiere al alivio, mejora y/o eliminación, reducción y/o estabilización (por ejemplo, detener la evolución hacia estadios más avanzados) de un síntoma, así como la demora en la evolución de un síntoma de un trastorno particular.

El tratamiento profiláctico se refiere a cualquiera de: detener el comienzo, reducir el riesgo de desarrollo, reducir la incidencia, retardar el comienzo, reducir el desarrollo, así como prolongar el tiempo del comienzo de los síntomas de un trastorno particular.

El término "composición" o "composición farmacéutica" se refiere a un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulta, de forma directa o indirecta, de dichas combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables para tal fin.

El término "medicamento" se refiere a un producto para uso en el diagnóstico médico, cura, tratamiento o prevención de enfermedades, en donde dicha enfermedad, dentro del alcance de la presente descripción, puede ser un síndrome o trastorno mediado por CCR2.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares que tienen suficiente pureza y calidad para uso en la formulación de una composición o medicamento de la invención y que cuando se administra de forma adecuada a un animal o a un humano, no producen una reacción adversa, alérgica ni otra reacción perjudicial. Dado que tanto el uso humano como veterinario se incluye dentro del alcance de la invención, una formulación farmacéuticamente aceptable incluye una composición o medicamento para uso tanto humano como veterinario.

El término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de ingrediente activo (especialmente el péptido o compuesto de la invención) que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano, que procura un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico, que incluye la prevención, tratamiento o mejora de los síntomas de un síndrome, trastorno o enfermedad que está siendo tratado.

La expresión "trastorno, síndrome mediado por CCR2" se refiere, de modo no taxativo, a síndromes, trastornos o enfermedades asociados con una expresión elevada de CCL2, una sobreexpresión de CCL2 o afecciones inflamatorias que acompañan los síndromes, trastornos o enfermedades asociados con una elevada expresión de

CCL2 o sobreexpresión de CCL2.

Las expresiones "expresión elevada de CCL2" o "sobreexpresión de CCL2" se refieren a la activación no regulada o regulada en ascenso de CCR2 como resultado de la unión del CCL2, especialmente en comparación con un control que es preferiblemente un paciente saludable.

5 La expresión "no regulada" se refiere a la activación no deseada de CCR2 en un organismo multicelular que causa daños (tales como malestar o expectativa de vida disminuida) al organismo multicelular.

10 La expresión "regulada en ascenso" se refiere a: 1) actividad o expresión de CCR2 no regulada o aumentada, o 2) aumento en la expresión de CCR2 que conduce a la migración no deseada de linfocitos y monocitos, especialmente en comparación con un control que es preferiblemente un paciente saludable. La existencia de un nivel inadecuado o anormal de CCL2 o actividad de CCR2 es determinada por procedimientos bien conocidos en la técnica.

15 La expresión "sustitución conservativa" como se emplea en esta memoria denota el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro, sin alterar la conformación global y actividad biológica de un péptido, que incluye, de modo no taxativo, el reemplazo de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de unión al hidrógeno, ácidos, básicas, de forma, hidrofóbicas, aromáticas y similares). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina son aminoácidos básicos hidrofílicos y pueden intercambiarse. De manera similar, la isoleucina, un aminoácido hidrofóbico, puede remplazarse con leucina, metionina o valina. Los aminoácidos hidrofílicos neutros, que pueden sustituirse entre sí, incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. Por "sustituido" o "modificado" la presente invención incluye aquellos aminoácidos que han sido alterados o modificados a partir de aminoácidos de origen natural.

20 Como tal, debe entenderse que en el contexto de la presente invención, una sustitución conservativa se reconoce en la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades similares. Ejemplos de sustituciones conservativas se presentan en la Tabla 1 que figura a continuación:

Tabla 1. Sustituciones Conservativas I

CARACTERÍSTICA DE LA CADENA LATERAL	AMINOÁCIDO
No polar	G A P I L V
Polar no cargado	C S T M N Q
Polar cargado	D E K R
Aromático	H F W Y
Otro	N Q D E

25

De manera alternativa, los aminoácidos conservativos pueden agruparse como se describe en Lehninger, 1975, tal como se presentan en la Tabla 2 inmediatamente a continuación.

Tabla 2. Sustituciones Conservativas II

CARACTERÍSTICA DE LA CADENA LATERAL	AMINOÁCIDO
No polar (hidrofóbica)	
A. Alifática:	A L I V P
B. Aromática:	F W
C. Contiene azufre:	M
D. Limitante:	G
Polar no cargado	
A. Hidroxilo:	STY
B. Amidas:	NQ
C. Sulfhidrilo:	C
D. Limitante:	G
Cargado positivamente (básico):	KRH
Cargado negativamente (ácido):	DE

En aun otra alternativa, ejemplos de sustituciones conservativas se presentan en la Tabla 3, inmediatamente a continuación.

Tabla 3. Sustituciones Conservativas III

Residuo original	Ejemplo de sustitución
Ala (A)	Val (V), Leu (L), Ile (I)
Arg (R)	Lys (K), Gln (Q), Asn (N)
Asn (N)	Gln (Q), His (H), Lys (K), Arg (R)
Asp (D)	Glu (E)
Cys (C)	Scr (S)
Gln (Q)	Asn (N)
Glu (E)	Asp (D)
His (H)	Asn (N), Gln (Q), Lys (K), Arg (R)
Ile (I)	Leu (L), Val (V), Met (M), Ala (A), Phe (F)
Leu (L)	Ile (I), Val (V), Met (M), Ala (A), Phe (F)
Lys (K)	Arg (R), Gln (Q), Asn (N)
Met (M)	Leu (L), Phe (F), Ile (I)
Phe (F)	Leu (L), Val (V), Ile (I), Ala (A)
Pro (P)	Gly (G)
Ser (S)	Thr (T)
Thr (T)	Ser (S)
Trp (W)	Tyr(T)
Tyr(Y)	Trp (W), Phe (F), Thr (T), Ser (S)
Val (V)	Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Ala (A)

Preparación de péptidos

- Los péptidos descritos en la presente memoria pueden ser sintetizados utilizando métodos sintéticos estándar conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, síntesis química o recombinación genética. En una realización preferida, los péptidos se obtienen por condensación gradual de residuos de aminoácidos, tanto por condensación de un fragmento preformado que ya contenga una secuencia de aminoácidos en un orden adecuado, o por condensación de varios fragmentos previamente preparados, mientras se protegen los grupos funcionales de los aminoácidos salvo aquellos implicados en la unión de péptidos durante la condensación. En particular, los péptidos pueden sintetizarse según el método originalmente descrito por Merrifield.
- 5
- 10 Características de los péptidos:
- Opcionalmente, la secuencia SEQ ID NO:1 puede extenderse por uno o varios aminoácidos, por ejemplo 1 a 20 aminoácidos, preferiblemente entre 1 y 14 aminoácidos, o por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos.
- Un péptido preferido de la presente descripción muestra la secuencia X1-**TFLKC**-X2 (SEQ ID NO:2),
- 15 en donde X1 está ausente, es glicina o representa una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en AG, LG, YLG, y HYLG;
- y X2 independientemente está ausente, es metionina o representa una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en MA, MAN, MANG, MANGF, MANGFV, MANGFVW, MANGFWE, y MANGFWEN.
- Se describe además un péptido que comprende
- la secuencia de aminoácidos Thr-Phe-Leu-Lys (SEQ ID NO:17).
- 20
- una secuencia que deriva de la SEQ ID NO:17 por una o más modificaciones químicas que confieren resistencia a la proteólisis;

- o una secuencia que deriva de la SEQ ID NO:17 por una o más sustituciones conservativas.

Un péptido preferido de la presente descripción consiste en

X1-TFLK-X3 (SEQ ID NO:18),

- 5 en donde X1 está ausente, es glicina o representa una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en AG, LG, YLG, y HYLK;

y X3 independientemente está ausente, o es alanina

o una secuencia que deriva de la SEQ ID NO:18 por una o más modificaciones químicas que confieren resistencia a la proteólisis;

o una secuencia que deriva de la SEQ ID NO: 18 por una o más sustituciones conservativas.

- 10 Los péptidos particulares descritos en la presente memoria se seleccionan del grupo que consiste en:

- LGTFLK (SEQ ID NO:3),
- HYLGTFLK (SEQ ID NO:4),
- LGTFLK (SEQ ID NO:5),
- HYLGTFLK (SEQ ID NO:6),
- 15 - GTFLKCMANGF (SEQ ID NO:7),
- TFLKCMANGFV (SEQ ID NO:8),
- HYLGTFLKCMANGFVWEN (SEQ ID NO: 9);
- LGTFLK (SEQ ID NO:19)
- AGTFLK (SEQ ID NO:20)
- 20 - LGTFLKA(SEQ ID NO: 21)
- GTFLK(SEQ ID NO: 22)
- AGTFLKA (SEQ ID NO: 23).

Se prefiere el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 3.

- 25 Preferiblemente, el péptido descrito en la presente memoria consiste en un péptido de no más de 18 aminoácidos, preferiblemente no más de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, u 8 aminoácidos, típicamente no más de 10 aminoácidos.

También se describen péptidos resistentes a la proteólisis que derivan de la SEQ ID NO: 1 a 9 o 19 a 23 por una o más modificaciones químicas, o péptidos sustancialmente homólogos que derivan de la secuencia SEQ ID NO: 1 a 9 o 19 a 23 por una o más sustituciones conservativas.

- 30 En una realización particular, los péptidos resistentes a la proteólisis o los péptidos homólogos aún muestran la secuencia TFLK básica.

- 35 En una realización preferida, los péptidos resistentes a la proteólisis o los péptidos homólogos presentan sustancialmente las mismas propiedades biológicas que los péptidos de los cuales derivan. Especialmente los péptidos de la invención reducen la quimiotaxis de monocitos inducida por CCL2, preferiblemente con una IC50 para la reducción en la quimiotaxis de monocitos inducida por CCL2 de entre alrededor de 5 μ M a alrededor de 5 nM, preferiblemente en el intervalo nanomolar, aún preferiblemente alrededor de 1nM. Estos reducen la movilización de calcio intracelular de CCL2 con una IC50 para la reducción en la movilización de calcio intracelular inducida por CCL2 de entre alrededor de 5 μ M a alrededor de 5 nM, preferiblemente alrededor de 0,75 μ M o 1 nM o más generalmente en el intervalo nanomolar.

- 40 Los extremos C y N terminales de los péptidos descritos en la presente memoria pueden ser opcionalmente protegidos contra la proteólisis. Por ejemplo, el extremo N terminal puede estar en la forma de un grupo acetilo, y/o el extremo C terminal puede estar en la forma de un grupo amida. Modificaciones internas de los péptidos resistentes a la proteólisis también se visualizan, por ejemplo en donde al menos un enlace peptídico -CONH- se modifica y se reemplaza por un enlace reducido (CH2NH), un enlace retro inverso (NHCO), un enlace oximetileno (CH2-O), un enlace tiometileno (CH2-S), un enlace carba (CH2CH2), un enlace cetometileno (CO-CH2), un enlace

hidroxietileno (CHOH-CH₂), un enlace (N-N), un enlace alqueno E o también un enlace -CH=CH-.

Los péptidos descritos en la presente memoria pueden estar compuestos por aminoácidos de configuración D, que convierten a los péptidos resistentes a la proteólisis. De manera alternativa, todos los aminoácidos o parte de estos pueden ser de configuración L.

- 5 De forma significativa, los péptidos originalmente analizados eran de configuración D simplemente por razones de conveniencia, ya que dichos péptidos típicamente tienden a ser menos susceptibles a la hidrólisis o proteólisis, particularmente in vivo. Sin embargo, el experto en la técnica entendería que los péptidos correspondientes que comprenden L-aminoácidos de origen natural, o una mezcla de aminoácidos L y D, comparten una similitud conformacional/estructural significativa con todos los péptidos D, así como también se espera que tengan actividad inhibitoria de CCR2.

- 10 Los péptidos también pueden estabilizarse mediante reticulación intramolecular, por ejemplo al modificar al menos dos residuos de aminoácidos con cadenas laterales olefinicas, preferiblemente cadenas alqueno C3-C8, preferiblemente cadenas penten-2-il seguidas de reticulación química de las cadenas, según la denominada tecnología "grapa" descrita en Walensky et ál, Science, 2004, 305:1466-1470.

- 15 Se describen en la presente memoria todos estos péptidos modificados químicamente resistentes a la proteólisis.

- También se incluyen péptidos sustancialmente homólogos que derivan de la secuencia (I) por una o más sustituciones conservativas. Preferiblemente, estos péptidos homólogos no incluyen dos residuos de cisteína para evitar la ciclación. Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando uno o más residuos de aminoácidos se reemplazan por un residuo biológicamente similar o cuando más del 80 % de los aminoácidos son idénticos, o más de alrededor del 90 %, preferiblemente más de alrededor del 95 % son similares (funcionalmente idénticos). Preferiblemente, las secuencias homólogas o similares se identifican mediante alineación al utilizar, por ejemplo, el programa *pileup* GCG (Genetics Computer Group, Manual del Programa para el Paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los programas conocidos en la técnica (BLAST, FASTA, etc.).

- 25 En otro aspecto de la descripción, los péptidos se unen covalentemente a una molécula de polietilenglicol (PEG) por su extremo C-terminal o a un residuo de lisina, particularmente un PEG de 1500 o 4000 MW, para una disminución en la depuración urinaria y en dosis terapéuticas utilizadas y para un aumento de la semivida en el plasma sanguíneo. En aun otra realización, la vida media de los péptidos aumenta al incluir al péptido en un material de polímero biodegradable y biocompatible para sistemas de administración de fármacos que forman microesferas. Los polímeros y copolímeros son, por ejemplo, poli(D, L-láctido-co-glicólido) (PLGA) (como se ilustra en US2007/0184015, SoonKap Hahn et ál).

Indicaciones terapéuticas

Los péptidos de la invención son agentes terapéuticos útiles, como los antagonistas de CCR2.

- 35 Por lo tanto, un objeto de la invención es una composición farmacéutica o medicamento que contiene dicho péptido o compuesto, solo o en combinación.

Los péptidos de la invención reducen la quimiotaxis de monocitos inducida por CCL2, preferiblemente con una IC₅₀ para la reducción en la quimiotaxis de monocitos inducida por CCL2 de entre alrededor de 5 µM a alrededor de 5 nM, preferiblemente en el intervalo nanomolar, aún preferiblemente alrededor de 1 nM.

- 40 Estos reducen la movilización de calcio intracelular de CCL2 con una IC₅₀ para la reducción en la movilización de calcio intracelular inducida por CCL2 de entre alrededor de 5 µM a alrededor de 5 nM, preferiblemente alrededor de 0,75 µM o 1 nM o más generalmente en el intervalo nanomolar.

Por consiguiente, los péptidos o compuestos de la invención son útiles en un método para la prevención, tratamiento o mejora de un trastorno mediado por CCR2, tal como un síndrome, trastorno o enfermedad inflamatoria de CCR2.

- 45 Por lo tanto, se proporciona un método para el tratamiento de un síndrome, trastorno o enfermedad mediado por CCR2 en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un péptido o compuesto de la invención.

La cantidad eficaz del péptido o compuesto en dicho método terapéutico puede ser típicamente de alrededor de 0,001 mg/kg/día a alrededor de 300 mg/kg/día, o de alrededor de 50 µg a 20 g diarios.

- 50 La invención incluye el uso de péptidos o compuestos como se describe en la presente memoria para la preparación de una composición o medicamento para el tratamiento de un síndrome, trastorno o enfermedad mediado por CCR2 en un sujeto que lo necesita, en donde la composición o medicamento comprende un péptido o compuesto de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los síndromes, trastornos o enfermedades mediados por CCR2 incluyen, de modo no taxativo, trastornos

oftálmicos, uveítis, aterosclerosis, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, nefritis, rechazo del aloinjerto de órganos, pulmón fibroide, insuficiencia renal, diabetes y complicaciones de la diabetes, nefropatía diabética, retinopatía diabética, retinitis diabética, microangiopatía diabética, tuberculosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sarcoidosis, estafilococia invasiva, inflamación posterior a la cirugía de cataratas, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, urticaria crónica, asma, asma alérgico, enfermedades periodontales, periodontitis, gingivitis, enfermedad periodontal, cardiomiopatías diastólicas, infarto de miocardio, miocarditis, insuficiencia cardíaca crónica, angioestenosis, restenosis, trastornos por reperfusión, glomerulonefritis, tumores sólidos y cánceres, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, mieloma maligno, enfermedad de Hodgkin y carcinomas de vejiga, mama, cuello de útero, colon, pulmón, próstata o estómago.

En una realización particular, el péptido de la invención es útil para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad o la degeneración retiniana.

En otra realización, el péptido de la invención es útil para la prevención, tratamiento de una enfermedad cardiovascular, especialmente para la prevención o tratamiento de la aterogénesis o isquemia de los miembros inferiores o del corazón.

En aun otra realización, el péptido de la invención es útil en el tratamiento del dolor, en particular dolor periférico, tal como dolor del nervio ciático.

Se describe un método para la prevención, tratamiento o mejora de un síndrome, trastorno o enfermedad inflamatoria mediado por CCR2 en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un péptido como se describe en la presente memoria en una terapia de combinación con uno o más agentes antiinflamatorios (tales como una pequeña molécula, antibióticos, corticosteroides, esteroides, y similares), agentes antiinfecciosos o agentes inmunosupresores.

Composiciones farmacéuticas

El péptido puede ser administrado por cualquier vía conveniente que incluye la vía intravenosa, oral, transdérmica, subcutánea, mucosa, intramuscular, intrapulmonar, ocular, intranasal, parenteral, rectal, vaginal y tópica. La inyección en el cuerpo vítreo del ojo es de particular interés, especialmente para tratar la degeneración macular relacionada con la edad o la degeneración retiniana.

El péptido está típicamente formulado en relación con un portador farmacéuticamente aceptable.

La composición o medicamento que comprende el péptido o compuesto de la invención puede estar en una unidad de dosificación tales como un comprimido, pastilla, cápsula, polvo, gránulo, liposoma, portador biodegradable, resina de intercambio de iones, solución estéril y similar (que facilita la liberación inmediata, liberación controlada o liberación sostenida), solución parenteral o suspensión, aerosol de dosis medida o pulverizador líquido, gota, ampolla, dispositivo autoinyector o supositorio.

Las composiciones o medicamentos adecuados para la administración oral incluyen formas sólidas tales como pastillas, comprimidos oblongos, cápsulas (cada una incluye formulaciones de liberación inmediata, liberación controlada y liberación sostenida), gránulos y polvos y formas líquidas tales como soluciones, jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones. Las formas útiles para la administración nasal incluyen soluciones estériles o dispositivos de administración nasal. Las formas útiles para la administración ocular incluyen soluciones estériles o dispositivos de suministro ocular. Las formas útiles para la administración parenteral incluyen emulsiones, suspensiones y soluciones estériles.

La dosificación es seleccionada por el experto para que se logre un efecto y depende de la vía de administración y de la forma de dosificación que se utiliza.

La composición o medicamento puede contener una cantidad eficaz de alrededor de 0,001 mg a alrededor de 5000 mg (preferiblemente, de alrededor de 0,001 a alrededor de 500 mg) de un péptido de la invención.

Un intervalo previsto de la cantidad eficaz incluye de alrededor de 0,001 mg a alrededor de 300 mg/kg de peso corporal por día. Un intervalo previsto también incluye de alrededor de 0,003 a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal por día. Otro intervalo previsto incluye de alrededor de 0,005 a alrededor de 15 mg/kg de peso corporal por día. La composición o medicamento puede administrarse según un régimen de dosificación de alrededor de 1 a alrededor de 5 veces por día.

Para la administración oral, la composición o medicamento está preferiblemente en la forma de un comprimido que contiene 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 150, 200, 250 y 500 miligramos del péptido activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente a tratar. Las dosificaciones óptimas variarán dependiendo de factores asociados con el paciente particular a tratar (por ejemplo, la edad, el peso, la dieta y el momento de administración), la gravedad de la afección a tratar y el compuesto que se utilice, el modo de administración y la solidez de la preparación. Puede emplearse tanto el uso de la administración diaria como la

dosificación variable.

Para la administración ocular, la composición se encuentra preferiblemente en la forma de una composición oftálmica. Las composiciones oftálmicas se formulan preferentemente como formulaciones de gotas oftálmicas y se rellenan en recipientes adecuados para facilitar la administración en el ojo, por ejemplo, un cuentagotas equipado con una pipeta adecuada. Preferiblemente, las composiciones son estériles y de base acuosa, con agua purificada.

Aspectos adicionales y ventajas de la presente invención se describirán en la siguiente sección de experimentación que debería considerarse ilustrativa y no limitativa del alcance de la presente solicitud.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño y análisis del péptido "ECL1 (C) inverso"

Se determinaron las regiones transmembrana y yuxtamembrana de CCR2 utilizando software PredictProtein, ProtScale y Prosite. Los perfiles de hidrofobicidad y flexibilidad también se determinaron con los mismos softwares. La estructura 3D de CCR2 fue modelizada mediante el uso de rodopsina y visualizada con MOE (Molecular operating Environment; Montreal, Canadá). Los péptidos se derivaron de la secuencia primaria humana de CCR2 y se llevó a cabo un análisis BLAST para garantizar la especificidad de la secuencia.

Materiales y métodos

Síntesis de péptidos

La síntesis de ECL1 (C) inverso se llevó a cabo mediante un procedimiento de química Fastmoc de fase sólida en un sintetizador de péptidos automático 433A de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Francia). Las resinas y aminoácidos protegidos de Fmoc se obtuvieron de Merck Chemicals (Novabiochem, RU) y los solventes de SdS (Francia) tal como se describió anteriormente (Vanhoye et al., 2004 Biochemistry, 43(26):8391-409). Todos los aminoácidos eran D-aminoácidos. Se utilizó la resina Fmoc-Leu-Wang (100-200 mesh) para ECL1 (C) inverso. En resumen, los productos de síntesis de ECL1 (C) inverso fueron escindidos de la resina por una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés) (94 %), H₂O (2,5 %) Triisopropilsilano (TIS) (2,5 %), precipitados en éter, centrifugados y liofilizados. Los péptidos fueron purificados por un RP-HPLC (columna de fase reversa C18, PrepLC módulo de 25 mm, 250 mm X 100 mm, partículas de 15 mm de Waters) en una bomba HPLC binaria 1252 de Waters (velocidad de flujo 8 ml.min⁻¹). La pureza fue evaluada analíticamente por el RP-HPLC (columna C18, 5 µm, Luna C18(2), 4,6 mm X 250 mm, diámetro de poro 100 Å, Phenomenex) en una bomba HPLC binaria 1252 de Waters (velocidad de flujo 0,75 ml.min⁻¹) y mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Voyager DE-PRO, Applied Biosystems).

Cultivo celular

Células nativas y que expresan de forma estable CCR2, CX3CR1, CCR1 o CCR5 HEK293 o CHO fueron cultivadas en DMEM con el añadido de L-glutamina 2mM, 1 % de aminoácidos no esenciales, piruvato sódico 2mM, FBS al 10 %, penicilina (50 U/mL), y estreptomina (50 µg/mL). Se describieron anteriormente todas las células HEK o CHO que expresan receptores de quimiocinas. HEK- o CHO-CCR2, -CCR5, -CX3CR1 crecieron en presencia de G418 (200 µg/mL) y HEK-CCR1 en presencia de higromicina (100 µg/mL).

Las células de la médula ósea del ratón (MBMC, por sus siglas en inglés) se obtuvieron a partir de ratones C57BL/6.

Animales

Los ratones C57BL/6 machos o hembras de 10 semanas fueron conservados en condiciones libres de patógenos con alimentos y agua disponibles ad libitum y almacenados en un ciclo de 12 h luz/12h oscuridad (100-500 lux).

Ensayo de unión

Ensayos de unión del radioligando

Se llevó a cabo un ensayo de unión utilizando I125-CCL2 (actividad específica 2200 Ci/mmol; Perkin elmer, inc.). 300.000 células HEK que expresan CCR2 de forma estable y células nativas fueron incubadas con I125-CCL2 en presencia o ausencia de CCL2 humano recombinante (10 nM o 100 nM) o ECL1 (C) inverso (1-10-30 µM) en un amortiguador de 200 µl (PBS que contiene ASB al 5 % y HEPES al 0,01 %). Luego de 1 h de incubación a 37 °C, se lavaron las células tres veces con 1 ml de solución de lavado frío. Luego se cuantificaron las emisiones gamma en el sedimento de la célula con un espectrómetro gamma. La unión no específica representó menos de un 15 % de la unión total y fue eliminada de la unión total para definir la unión I125-CCL2 específica.

Ensayo de unión de CCL2-Alexa 647

La unión se llevó a cabo con las mismas células. 200.000 células fueron previamente incubadas durante 30 minutos a 4 °C en 100 µl de amortiguador (PBS, que contiene ASB al 0,5 %, EDTA al 0,2 % y Na₃N al 0,01 %) con CCL2

humano recombinante (50 nM, 100 nM y 500 nM), ECL1 (C) inverso (11,3 μ M, 28,2 μ M y 56,3 μ M) o con amortiguador. Luego, se agregó CCL2-alexa 647 (Almac) 50 nM durante 30 minutos a 4 °C y se lavó tres veces con 1 ml de amortiguador frío. Se incubaron las células con 10 μ l de CCR2 antihumano (BD pharmingen) durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad y se lavaron tres veces con 1 ml de amortiguador frío. Se cuantificaron células y perlas en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron los datos con el software FlowJo.

Ensayo de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET, por sus siglas en inglés).

Las células fueron sembradas a una densidad de 100.000 células/pocillo en una placa de 12 pocillos 24 h antes de la transfección. Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo con el reactivo de transfección de polímero catiónico JePEI (Polyplus transfection, Ozyme) en NaCl 150 mM. Se transfectaron 0,5 μ g de diversos constructos de CCR2-pRluc solos o con 2,5 μ g de diversos constructos de CCR2- pEYFP. Luego de incubarlos durante la noche, las células transfectadas se separaron con un amortiguador fosfato salino (PBS) y se lavaron con el amortiguador HBSS al que se le añadió HEPES 10 mM, CaCl₂ 1 mM, y MgCl₂ 0,5 mM. Se recolectó y se sembró un homogeneizado celular en una placa negra de 96 pocillos (Perkin Elmer) en 100 μ l de HBSS añadido. Se agregó coelenteracina H (Interchim, Montlignon, Francia) para alcanzar 5 μ M. Se incubaron ECL1 (c) inverso y péptidos control 15 min antes de la lectura. Las lecturas se midieron con un analizador de microplaca (Fusion; PerkinElmer) que permitió la integración secuencial de señales detectadas en la ventana de 485 \pm 20 nm para luciferasa y la ventana de 540 \pm 20 nm para emisiones de luz de la proteína amarilla fluorescente (YFP, por sus siglas en inglés). La señal BRET se determinó al calcular la relación de la intensidad de luz emitida por el CCR2-YFP sobre la intensidad de luz emitida por la CCR2-Luciferasa (Luc). Se corrigieron los valores al eliminar la señal BRET de fondo detectada cuando se expresó solo el constructo de CCR2-Luc. Los valores son el promedio de 15 medidas.

Ensayo de flujo de calcio

El ensayo del calcio libre citosólico fue medido mediante la detección fluorescente con el kit de ensayo HitHunterTM Calcium No WashPLUS (Ca NWPLUS) (DiscoverX, #90-0091). En resumen, HEK o CHO que expresan el receptor de quimiocinas de interés (5.104) fueron colocados en placa durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 % antes de la precarga con un colorante sensible al calcio (reactivo de trabajo Ca NWPLUS) añadido con probenecid (Sigma-Aldrich, #P8761) para evitar el derramamiento de colorante de calcio desde las células durante 1 h a 37 °C. Luego se trataron a las células con amortiguador control o péptidos en diversas concentraciones y agonistas adecuados. La señal se midió en función del tiempo sobre un lector de placa fluorescente equipado con el manejo de dispositivos fluidicos (Dispositivos Moleculares FlexStation 3). El cambio máximo en la fluorescencia sobre el punto de referencia (señal pico) fue utilizado para determinar la respuesta del agonista, tal como se cuantifica al utilizar el software SoftMax Pro. Todos los experimentos se llevaron a cabo en triplicado y los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Ensayo de β -Arrestina

La captación de la β -arrestina en células vivas fue medida por detección quimioluminiscente con el kit de ensayo de la β -Arrestina PathHunterTM eXpress (DiscoverX, #93-00446E1). En resumen, 100 μ l de células PathHunter eXpress que expresaban CCR2 fueron colocadas en una placa tratada de cultivo de tejido de 96 pocillos durante 48 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Primero se incubaron células con ECL1 (C) inverso o péptido control y antes de agregar 10 μ l del agonista, se diluyó el CCL2 en un medio de OCC para alcanzar el EC₈₀ determinado de antemano o solamente con un medio de OCC durante 60 y 90 min respectivamente a 37 °C, CO₂ al 5 %. La reacción se detuvo al agregar 55 μ l de la Solución de Reactivo de Detección de Trabajo (reactivo de detección PathHunter) durante 90 min a temperatura ambiente. La señal quimioluminiscente fue leída en un lector de placa luminiscente TriStar LB 941, Berthold Technologies, Thoiry, Francia). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Ensayo de migración

Los ensayos de migración se realizaron en insertos transwell 24 (Corning Costar Avon, Francia) con 8 μ m de filtro de policarbonato para células HEK o CHO y 5 μ m para MBMC. Se resuspendieron las células en un amortiguador de quimiotaxis (5.105 células en 100 μ l de RPMI que contiene ASB al 0,5 % y HEPES 10 nM) en presencia o no de ECL1 (C) inverso a una concentración adecuada y localizadas en la cámara superior. El fondo de cada pocillo fue completado con 600 μ l de amortiguador de quimiotaxis precalentado a una concentración de quimiocinas indicada. Las placas se incubaron entonces durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las células que atravesaron la membrana se cuantificaron mediante citometría de flujo FACSCalibur con una cantidad predeterminada de perlas (perlas de carboxilato Polybead, Polyscience, Inc) agregadas al tubo. Antes de cuantificar las células mediante citometría de flujo, se inmunofenotipificaron leucocitos de ratón con una mezcla de anticuerpos fluorescentes (Ly6G-PE antirratón, NK1.1-PE antirratón, CD1b-PCP antirratón, 7/4-FITC antirratón, BD Biosciences) y receptores de quimiocinas que expresan HEK con un adecuado receptor de quimiocinas antihumano fluorescente. Se analizaron los datos con el software FlowJo y los resultados se expresan como una cantidad de células que migran en presencia o ausencia de quimioatrayentes. Los experimentos se llevaron a cabo en triplicado y los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Citotoxicidad

Se analizó la citotoxicidad de ECL1 (C) inverso al incubar 5.10⁵ leucocitos de ratón en 100 µl de RPMI que contiene ASB al 0,5 % y HEPES 10 nM con ECL1 (C) inverso o péptido control durante 4 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se inmunofenotipificaron las células al agregar una mezcla de anticuerpos fluorescente ((anti LY-6G-PE, anti CD11b-PerCP, anti 7/4-FITC, anti F4/80- APC, anti NK-PE) y se cuantificaron mediante citometría de flujo FACSCalibur con una cantidad predeterminada de perlas (perlas de carboxilato Polybead, Polyscience, Inc) agregadas a las muestras. Los datos se analizaron con FlowJo.

Inflamación peritoneal inducida por tioglicolato

Se inyectó a los ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal 1 ml de tioglicolato al 3 % (p/vol) (Sigma-Aldrich, l'Île d'Abeau, Francia) y disuelto en PBS estéril y luego 14, 19 y 24 horas después se les inyectó ECL1 (C) inverso o péptido control (30 µg) por vía intraperitoneal. 12 horas luego de la última inyección, se mataron a los ratones y se inyectaron 3 mL de PBS frío por vía intraperitoneal para recolectar células peritoneales que luego fueron marcadas con Ly6G-PE antirratón, NK1.1-PE antirratón, CD11b-PCP antirratón, 7/4-FITC antirratón y F4/80-APC antirratón (BD Biosciences). Las células y perlas luego fueron cuantificadas mediante citometría de flujo FACSCalibur y se analizaron los datos con FlowJo. Se consideraron a las células CD11b^{hi}Ly6G⁺NK1.1⁻ como monocitos, y se realizó la discriminación de subconjuntos con respecto a la expresión 7/4. Se ha demostrado que la expresión 7/4 es equivalente a la expresión Ly6C en subconjuntos de monocitos.

Resultados

Cribado de péptidos derivados de las regiones yuxtamembranas extracelulares. Los inventores diseñaron una serie de péptidos pequeños entre 5 y 7 aminoácidos que reprodujeron las regiones yuxtamembranas extracelulares de CCR2. Todos los péptidos fueron sintetizados con D-aminoácidos para aumentar su estabilidad para un mayor uso in vivo.

Los péptidos fueron analizados para su capacidad de inhibir la liberación de calcio inducida por CCL2, que está clásicamente asociada con la estimulación de RAPG.

A continuación se muestra la secuencia de estos péptidos:

Péptido	Secuencia
ECL1 (C)	CKLFTGL (SEQ ID NO: 10)
ECL1 (C) inverso	LGTFCLK (SEQ ID NO: 3)
ECL2 (N)	LFTKC (SEQ ID NO: 11)
ECL2 (N) inverso	CKTFL (SEQ ID NO: 12)
ECL3 (C)	HTLMRNL (SEQ ID NO: 13)
ECL3 (C) inverso	LNRMLTH (SEQ ID NO: 14)
ECL3 (N)	LNTFQEF (SEQ ID NO: 15)
ECL3 inverso	FEQFTNL (SEQ ID NO: 16)

Antes de analizar los péptidos, los inventores confirmaron primero que el CCL2 provocaba la liberación de calcio sobre células HEK-CCR2 con un valor EC₈₀ de 50 nM. Entre todos los péptidos analizados, el heptapéptido LGTFCLK (SEQ ID NO: 3), denominado ECL1 (C) inverso, presentó las propiedades más interesantes al suprimir, en función de la dosis, la respuesta de calcio inducida por CCL2 50 nM, con un valor de IC₅₀ de 0,75 µM (**Figura 1A**). Estos resultados fueron confirmados al analizar la captación de la β-arrestina en células vivas, que es otro evento acoplado a los RAPG. Tal como se muestra en la **Figura 1B**, CCL2 podría inducir la captación de la β-arrestina en HEK-CCR2 con un valor de EC₈₀ de 12,5 nM y esta captación podría ser inhibida al agregar ECL1 (C) inverso con un valor de IC₅₀ de 2 µM. Los inventores también observaron que, a diferencia de CCL2, ECL1 (C) inverso podría no inducir una respuesta de calcio significativa o la captación de β-arrestina en concentraciones de hasta 500 µM en células HEK-CCR2 pero también en CHO-CCR2.

Las respuestas quimiotácticas y de flujo de calcio inducidas por CCL2 están inhibidas específicamente por ECL1 (C) inverso.

Los inventores evaluaron la selectividad de ECL1 (C) inverso para CCR2 al analizar su efecto inhibitorio sobre la respuesta de calcio en otros receptores de quimiocinas, CCR1, CCR5 y CX3CR1 cuyas secuencias están estrechamente relacionadas con la del CCR2 y también sobre otros RAPG, como el ácido lipofosfatídico (LPA)-GPCR. A diferencia del efecto inhibitorio de ECL1 (C) inverso en la liberación de calcio inducida por CCL2 sobre HEK-CCR2, no se observó inhibición significativa en la liberación de calcio inducida por CCL5 (25 nM) sobre HEK-

CCR5 y HEK-CCR1, CX3CL1 (20 nM) sobre HEK-CX3CR1 o por LPA (10 μ M) o ATP (30 μ M) sobre células HEK (**Figura 2A**). Los inventores también confirmaron que la inhibición de la liberación de calcio inducida por CCL2 por ECL1 (C) inverso no fue debida a la citotoxicidad. Para esto, HEK-CCR2 o MBCM fueron incubadas en presencia de ECL1 (C) en diversas concentraciones (**Figura 2B**). Luego de 4 horas de incubación, no se observó ninguna muerte celular significativa.

Los inventores luego investigaron el efecto de ECL1 (C) inverso en la quimiotaxis mediada por CCR2. HEK-CCR2 migraron tras CCL2 a una concentración de 100 nM. ECL1 (C) inverso inhibió esta quimiotaxis dependiente de CCL2 en función de la dosis con un valor de IC₅₀ de 2 μ M (**Figura 3A**). Se obtuvieron resultados similares con monocitos, macrófagos (**Figura 3E**) y células NK MBMC o CHO-CCR2. Además, ECL1 (C) inverso inhibió a la quimiotaxis mediada por CCL2 de los monocitos inflamatorios (CD11b+Ly6G- 7/4altoCCR2+) (**Figura 3F**) pero no mostró ningún efecto sobre los monocitos residentes (CD11b+Ly6G-7/4bajoCCR2-) (no se muestran los datos). Por el contrario, ECL1 (C) inverso no antagonizó el efecto de la quimiotaxis inducido por CCL5 (10 nM) o CX3CL1 (1 nM) sobre HEK-CCR5 o-CCR1 o HEK-CX3CR1 respectivamente (**Figuras 3B, C, D**).

ECL1 (C) en concentraciones de hasta 500 μ M no indujo la quimiotaxis de tanto HEK- CCR2, -CCR5, -CX3CR1 como de los leucocitos de ratón.

Todos los resultados indican que el ECL1 (C) inverso es un antagonista de CCR2 específico que inhibe el calcio y la respuesta quimiotáctica.

Caracterización de ECL1 (C) inverso como un antagonista no competitivo. Para caracterizar además este nuevo antagonista de CCR2, los inventores analizaron si ECL1 (C) inverso se une al mismo sitio de CCR2 como CCL2. Para esto, se comparó la afinidad de unión de ECL1 (C) inverso para CCR2 con la de CCL2 nativo en una unión de competición con células HEK-CCR2 y [125I]-CCL2 o CCL2 acopladas a un (Alexa-647) fluorescente como indicador. Tal como se muestra en las **Figuras 4A y B**, mientras que CCL2 podría sustituir la unión [125I]-CCL2 o CCL2-Alexa 647 en función de la dosis, ECL1 (C) inverso no lo podría hacer, lo que indica que el ECL1 (C) inverso no se unió al mismo sitio de unión como sí lo hizo el ligando natural CCL2.

Todos los resultados indican que ECL1 (C) inverso es un antagonista no competitivo.

ECL1 (C) inverso inhibe la captación de leucocitos in vivo

El efecto antagonista in vivo de ECL1 (C) inverso, como un posible tratamiento antiinflamatorio terapéutico, fue evaluado en primer lugar en el modelo de peritonitis no infecciosa. 14 horas antes de tratar a los ratones C57BL/6 con ECL1 (C) inverso o con un péptido control, se provocó una inflamación severa mediante una inyección de tioglicolato por vía intraperitoneal. Se sacrificaron a los ratones 12 horas después de la última inyección del péptido. Se analizó la captación de leucocitos en la cavidad peritoneal mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la **Figura 5A**, los monocitos (CD11b+Ly6G- F4/80-), macrófagos (CD11b+Ly6G-F4/80+) y neutrófilos fueron captados en la cavidad peritoneal luego de la inyección de tioglicolato. La captación de monocitos y macrófagos fue fuertemente inhibida luego del tratamiento con 90 μ g de ECL1 (C) inverso inyectado por vía intraperitoneal tres veces por día, pero no con péptido control. Sorprendentemente, también disminuyó la captación de neutrófilos, aunque en menor medida, lo que sugiere un mecanismo inhibitor indirecto sobre neutrófilos dado que no expresan CCR2. Un análisis más detallado (**Figura 5B**) también mostró que todas las poblaciones de monocitos (monocitos "inflamatorios" 7/4 alto CCR2+ y "residentes" 7/4 bajo CCR2) fueron afectadas por el efecto inhibitor de ECL1 (C) inverso lo que indica un efecto interdependiente entre la población.

Ejemplo 2: ECL1 (C) inverso en un modelo de esclerosis múltiple

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en ratones es el modelo animal reconocido de la esclerosis múltiple (una enfermedad inflamatoria que involucra al CCR2). Los ratones invalidados para CCR2, no desarrollaron la enfermedad.

La inducción de la EAE fue adaptada de Ephrem et ál, Blood 2008, Ene 15;111(2):715-22.

Los ratones C57BL/6J (que pesan aproximadamente 20 g) fueron inmunizados con 200 μ g de péptido MOG35-55 (fragmento 35-55 de la proteína MOG) emulsificado en el adyuvante completo de Freund (CFA; Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, Francia) 1:1 en volumen que contiene 800 μ g de Mycobacterium tuberculosis H37RA desecada no viable (Difco Laboratories, L'Arbresk, Francia). Se inyectó un volumen final de 200 μ L por vía subcutánea en 4 sitios sobre los flancos. Además, se administraron por vía intravenosa 300 ng de toxina Pertussis (List Biologic Laboratories, Meudon, Francia) el mismo día y 2 días después. Se evaluaron diariamente los signos clínicos de EAE mediante el siguiente sistema de puntuación: 0, ausencia de signos; 1, debilidad de extremidades posteriores; 2, debilidad de extremidades posteriores y parálisis de cola; 3, parálisis de cola y de extremidades posteriores; 4, parálisis de cola y de extremidades posteriores y debilidad de extremidad anterior; 5, moribundo; y 6, muerte. Los ratones recibieron 2 inyecciones intraperitoneales de 90 μ g de ECL1 (C) inverso en el tiempo indicado en la Figura 6. Los grupos control recibieron solamente PBS o péptido revuelto a la misma concentración que ECL1 (C) inverso.

Tal como se muestra en la **Figura 6**, la inyección de ECL1 (C) inverso en el curso de la evolución de la enfermedad

(días 7 y 8) reduce la gravedad de los síntomas clínicos. La inyección de ECL1 (C) inverso en el pico de la enfermedad (días 12 y 13) evita recaídas.

Ejemplo 3: ECL1 (C) inverso en el tratamiento del cáncer

5 El microambiente de los tumores comprende macrófagos que derivan de los monocitos circulantes. La disminución de los macrófagos infiltrantes está asociada a un mejor pronóstico en los pacientes.

En ese contexto, se analizaron las inyecciones de ECL1 (C) inverso en un modelo murino de metástasis tumoral.

Para ese fin, se inyectaron por vía intravenosa células del linfoma EL4 y se monitoreó la supervivencia de los ratones. Se inyectaron por vía intraperitoneal ECL1 (C) inverso (90 kg/ratón/inyección) o péptidos irrelevantes comenzando el día 12 luego de la inoculación del tumor 3 veces por semana hasta el día 23.

10 Tal como se muestra en la **Figura 7**, las inyecciones de ECL1 (C) inverso aumentaron la supervivencia de los ratones que desarrollaron metástasis hepática.

Ejemplo 4: ECL1 (C) inverso en el tratamiento de la degeneración retiniana

La degeneración retiniana inducida por la luz, esto es, un modelo para la degeneración macular relacionada con la edad, está asociada con una infiltración dependiente de CCR2 subretiniana de monocitos sanguíneos.

15 Se analizaron modelos de ratones de degeneración retiniana con el péptido ECL1 (C) inverso.

20 Los ratones KO CX3CR1 de dos a cuatro meses de edad se adaptaron a la oscuridad durante 6 h y las pupilas estaban totalmente dilatadas con Atropina al 1 % (Novartis). Luego los animales fueron expuestos a la luz LED verde (4500 Lux, JP Vezon equipements) durante 4 días y posteriormente se mantuvieron en condiciones normales de instalación de animales en un ciclo de 12 h/12 h. La acumulación de células microgliales (MC) y la degeneración retiniana fueron evaluadas respectivamente a los 10 días luego de la exposición a la luz. Se trataron diariamente a los ratones durante la exposición a la luz verde con un ECL-1 (90 µg/ratón) o PBS.

25 Los ojos fueron enucleados, fijados en PFA al 4 % y seccionados a nivel del limbo; se descartaron la córnea y el cristalino. Las retinas fueron cuidadosamente despegadas del EPR (epitelio pigmentario retinal)/coroides/esclerótica. Las retinas fueron fijadas durante 20 min adicionales en acetona fría. Se incubaron las retinas y coroides con anti-Iba1 (Wako Chemicals) seguido del anticuerpo secundario Alexa 488 anticonejo (Molecular probes). Los coroides y retinas se colocaron en superficies horizontales y se observaron con un microscopio de fluorescencia DM5500B (Leica). Se cuantificaron las MC en todas las superficies planas coroidales/de RPE y en el lado del segmento externo de la retina.

30 Tal como se muestra en la **Figura 8**, la inyección de ECL1 (C) inverso reduce la acumulación de células microgliales en el espacio subretiniano.

Ejemplo 5: Diseño y análisis de otros péptidos

Los ensayos de migración de la quimiotaxis se llevaron a cabo utilizando varios péptidos:

Péptido ECL1 (C) inverso: LGTFLKC

Péptido M1: LGTFLK

35 Péptido M2: AGTFLKC

Péptido M8: LGTFLKA

40 Los ensayos de migración se realizaron en insertos transwell 24 (Corning Costar, Avon, Francia) con filtros de diámetro del poro de 8 µm para células CHO, que fueron resuspendidas en un amortiguador de la quimiotaxis (150x103 células en 100 µl de DMEM que contiene FCS al 10 %) y cargadas en la cámara superior. El fondo de cada pocillo fue completado con 600 µL de amortiguador de la quimiotaxis precalentado a la concentración de quimiocinas indicada. Las placas fueron luego incubadas durante 5 horas a 37 °C en una atmósfera de CO2 al 5%. Los resultados se expresan como cantidad de células que migran en presencia frente a la ausencia de quimioatrayentes. Todos los estados se llevaron a cabo en duplicado y los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

45 **Las figuras 9A, 9B, 9C, 9D** muestran los resultados de la inhibición de la quimiotaxis por los péptidos ECL1 (C) inverso, M2, M8 y M1, respectivamente.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universite Pierre et Marie Curie
- 5 <120> Péptidos antagonistas de CCR2
- <130> PR1288
- <160> 23
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- 15 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> péptido sintético
- 20 <400> 1
- Thr Phe Leu Lys Cys
- 1 5
- <210> 2
- <211> 7
- 25 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 30 <223> péptido sintético
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (1)..(1)
- 35 <223> "Xaa en posición 1" está ausente, es glicina o representa una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en LG, YLG y HYLG
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 40 <222> (7)..(7)
- <223> "Xaa en posición 7" independientemente está ausente, es metionina, o representa una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en MA, MAN, MANG, MANGF, MANGFV, MANGFW, MANGFVWE y MANGFWEN
- 45 <400> 2
- Xaa Thr Phe Leu Lys Cys Xaa
- 1 5
- <210> 3
- <211> 7
- 50 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> péptido sintético
- 55 <400> 3
- Leu Gly Thr Phe Leu Lys Cys
- 1 5
- <210> 4
- <211> 11
- 60 <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

5 <400> 4
 His Tyr Leu Gly Thr Phe Leu Lys Cys Met Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

15 <400> 5
 Leu Gly Thr Phe Leu Lys Cys Met Ala
 1 5

<210> 6
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> péptido sintético

<400> 6
 His Tyr Leu Gly Thr Phe Leu Lys Cys
 1 5

30 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 7
 Gly Thr Phe Leu Lys Cys Met Ala Asn Gly Phe
 1 5 10

40 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 8
 Thr Phe Leu Lys Cys Met Ala Asn Gly Phe Val
 1 5 10

50 <210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 55 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

60 <400> 9

ES 2 636 679 T3

His Tyr Leu Gly Thr Phe Leu Lys Cys Met Ala Asn Gly Phe Val Trp
 1 5 10 15

Glu Asn

<210> 10

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

10

<400> 10

Cys Lys Leu Phe Thr Gly Leu

1

5

<210> 11

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido sintético

<400> 11

Leu Phe Thr Lys Cys

1

5

25 <210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> péptido sintético

<400> 12

Cys Lys Thr Phe Leu

1

5

35

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> péptido sintético

<400> 13

His Thr Leu Met Arg Asn Leu

45 1

5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

55 <400> 14

Leu Asn Arg Met Leu Thr His

1

5

<210> 15

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 15
Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe
 1 5

10 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 16
Phe Glu Gln Phe Thr Asn Leu
 1 5

20 <210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> péptido sintético

30 <400> 17
Thr Phe Leu Lys
 1

35 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> péptido sintético

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> "Xaa en posición 1" está ausente, es glicina o representa una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en AG, LG, YLG y HYLG

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> "Xaa en posición 6" independientemente está ausente o es alanina

50 <400> 18
Xaa Thr Phe Leu Lys Xaa
 1 5

55 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 19

Leu Gly Thr Phe Leu Lys
 1 5

 <210> 20
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético
 10
 <400> 20
 Ala Gly Thr Phe Leu Lys Cys
 1 5

 <210> 21
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> péptido sintético

 <400> 21
 Leu Gly Thr Phe Leu Lys Ala
 1 5

 25 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 22
 Gly Thr Phe Leu Lys
 1 5
 35
 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 23
 Ala Gly Thr Phe Leu Lys Ala
 45 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en
 - i) LGTFLKC (SEQ ID NO: 3) o AGTFLKC (SEQ ID NO:20);
 - o ii) una secuencia según SEQ ID NO:3 o 20 en donde el extremo N terminal está en la forma de un grupo acetilo, y/o el extremo C terminal está en la forma de un grupo amida; y en donde todos los aminoácidos del péptido están en la configuración D.
2. El péptido de la reivindicación 1, que es LGTFLKC (SEQ ID NO:3).
3. El péptido de la reivindicación 1, que es AGTFLKC (SEQ ID NO:20).
4. Un compuesto que comprende cualquiera de los péptidos tal como se definen en las reivindicaciones 1 a 3, enlazados con al menos un resto no peptídico.
5. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el resto no peptídico es polietilenglicol.
6. Una composición farmacéutica, que comprende el péptido o compuesto según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.
7. El péptido o compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de un síndrome, trastorno o enfermedad mediada por CCR2.
8. El péptido o compuesto para uso en el tratamiento de un síndrome, trastorno o enfermedad mediada por CCR2 según la reivindicación 7, en donde el síndrome, trastorno o enfermedad mediada por CCR2 se selecciona del grupo que consiste en trastornos oftálmicos, uveítis, aterosclerosis, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, nefritis, rechazo del aloinjerto de órganos, pulmón fibroide, insuficiencia renal, diabetes y complicaciones de la diabetes, nefropatía diabética, retinopatía diabética, retinitis diabética, microangiopatía diabética, tuberculosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sarcoidosis, estafilococia invasiva, inflamación posterior a la cirugía de cataratas, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, urticaria crónica, asma, asma alérgico, enfermedades periodontales, periodontitis, gingivitis, enfermedad periodontal, cardiomiopatías diastólicas, infarto de miocardio, miocarditis, insuficiencia cardíaca crónica, angioestenosis, restenosis, trastornos por reperfusión, glomerulonefritis, tumores sólidos y cánceres, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, mieloma maligno, enfermedad de Hodgkin y carcinomas de vejiga, mama, cuello de útero, colon, pulmón, próstata o estómago.
9. El péptido o compuesto para uso en el tratamiento de un síndrome, trastorno o enfermedad mediado por CCR2 según la reivindicación 8, en donde el síndrome, trastorno o enfermedad es la degeneración macular relacionada con la edad o degeneración retiniana.
10. El péptido o compuesto para uso en el tratamiento de un síndrome, trastorno o enfermedad mediada por CCR2 según la reivindicación 8, en donde el síndrome, trastorno o enfermedad es una enfermedad cardiovascular, especialmente isquemia de los miembros inferiores o del corazón, o en la prevención o tratamiento de la aterogénesis.
11. El péptido o compuesto para uso en el tratamiento de un síndrome, trastorno o enfermedad mediada por CCR2 según la reivindicación 8, en donde el síndrome, trastorno o enfermedad es dolor, en particular, dolor periférico, tal como dolor del nervio ciático.

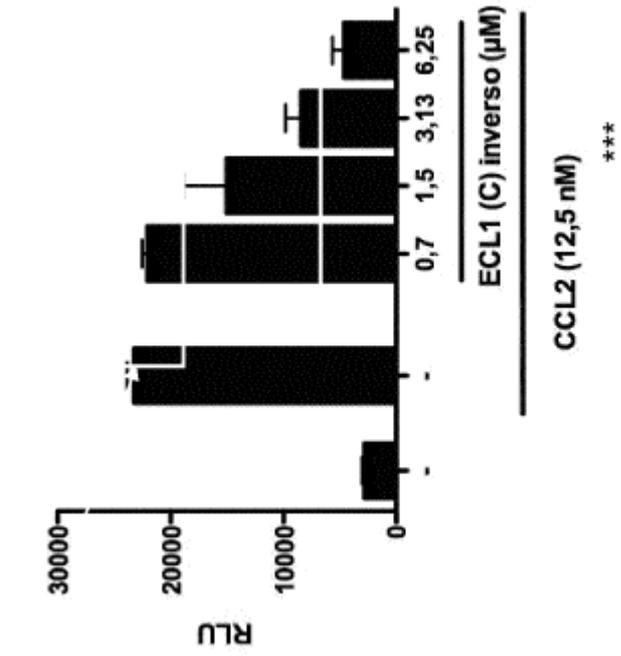


Figura 1B

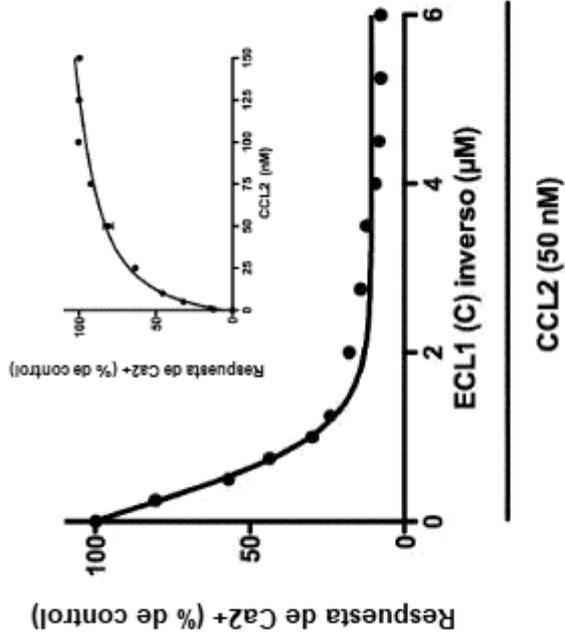


Figura 1A

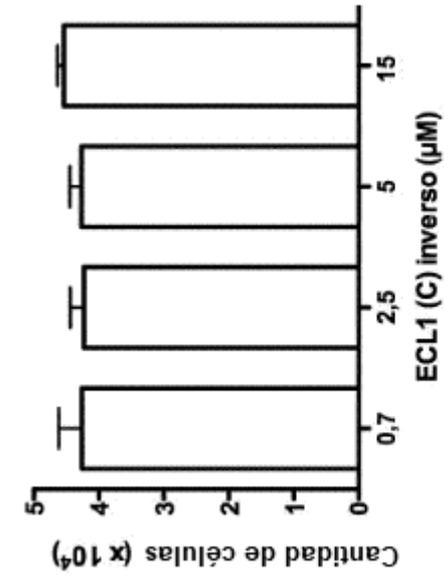


Figura 2B

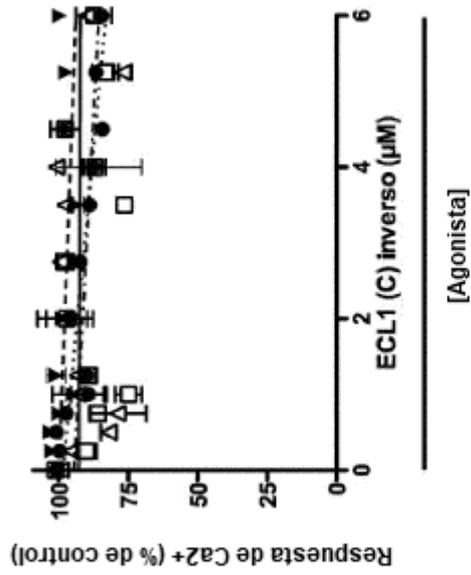


Figura 2A

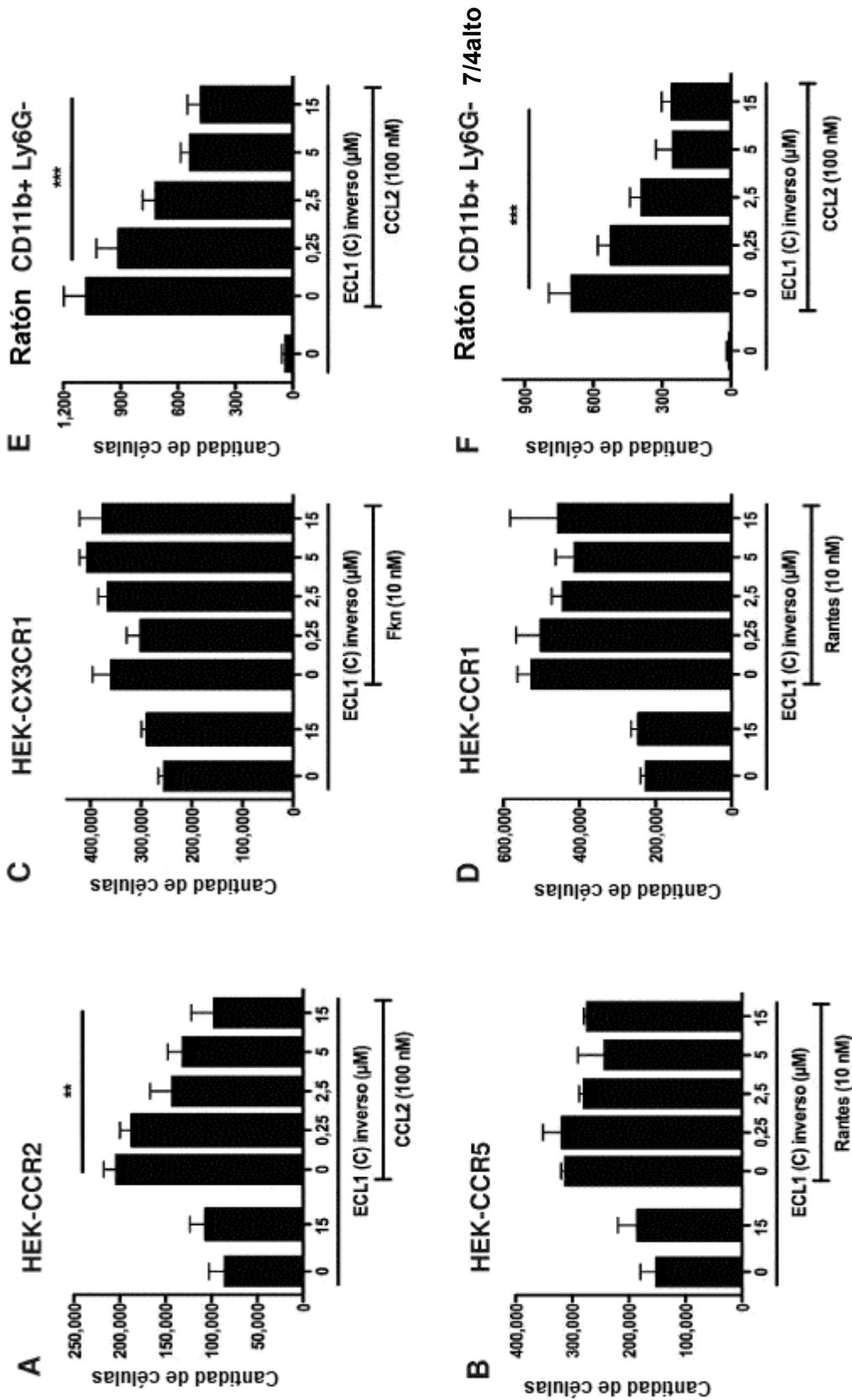


Figura 3

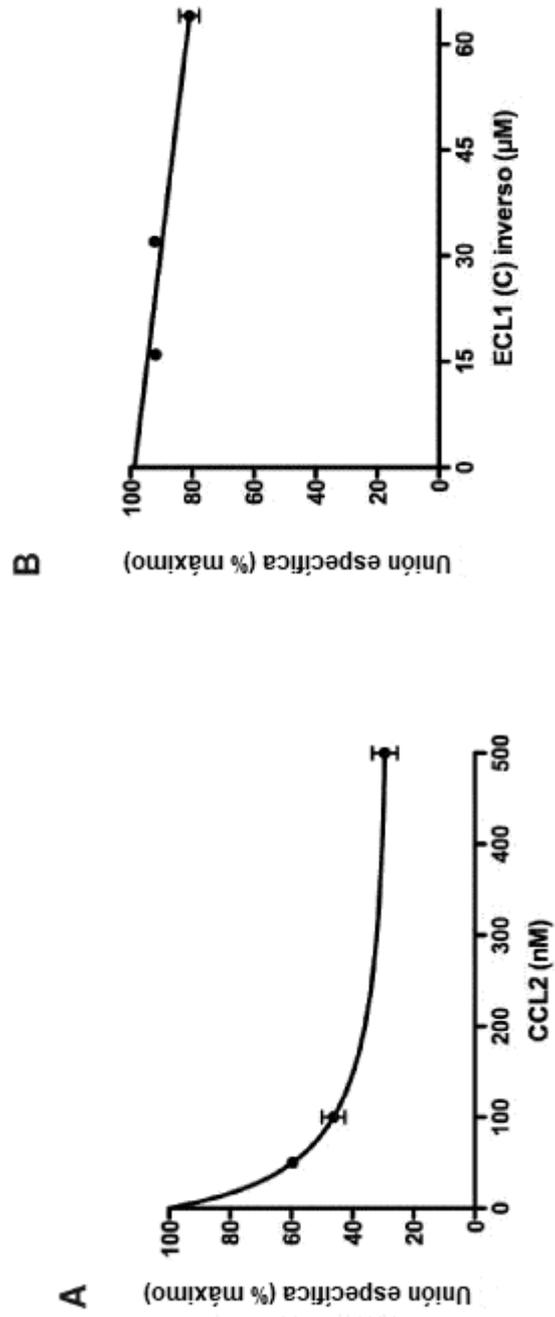
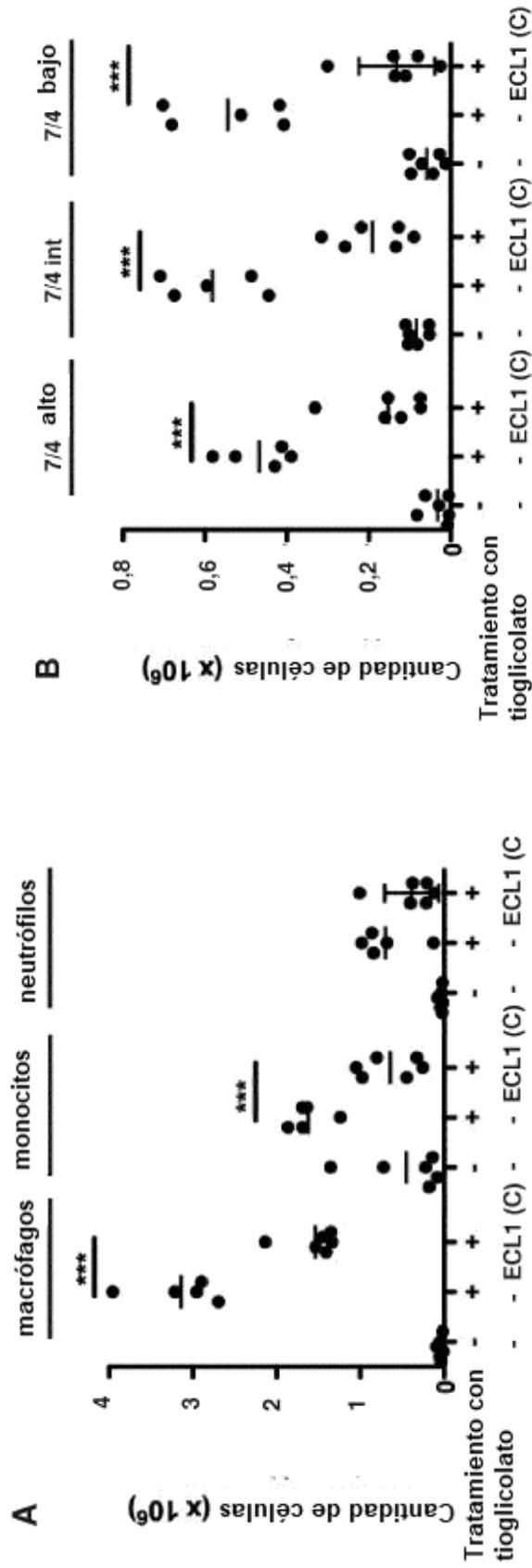


Figura 4



f

Figura 5

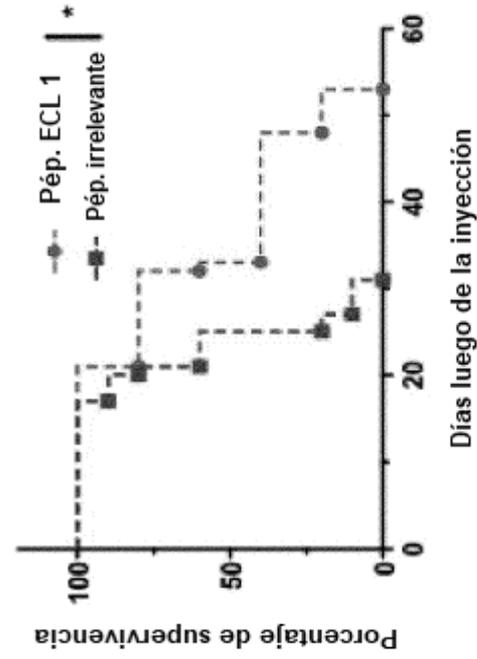


FIGURA 7

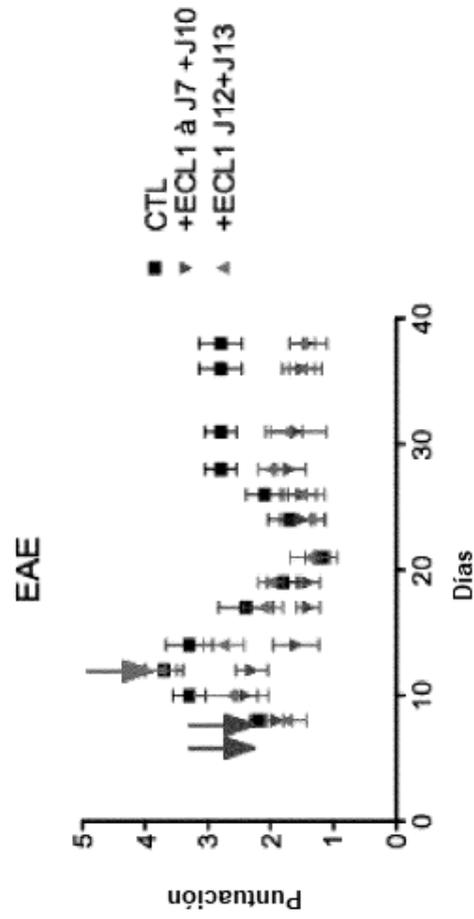


FIGURA 6

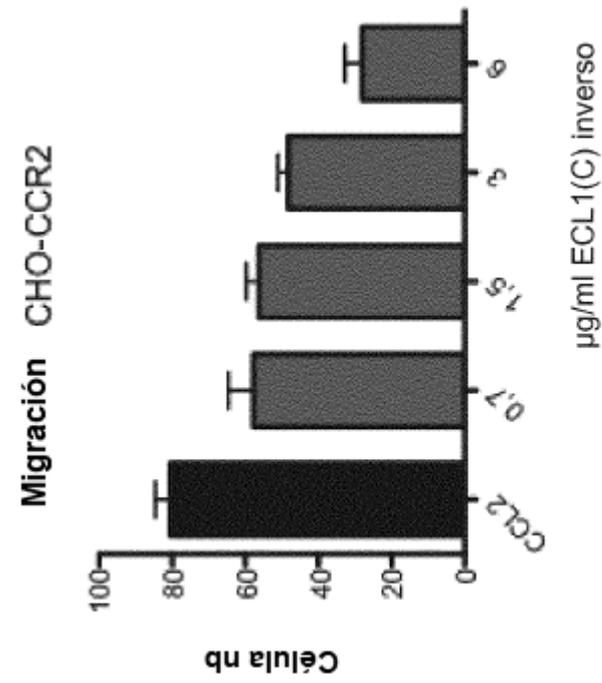


FIGURA 9A

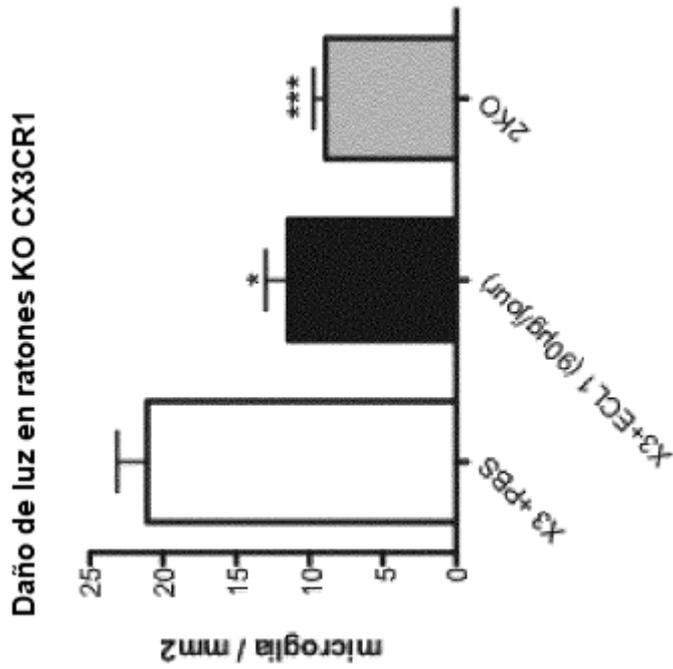


FIGURA 8

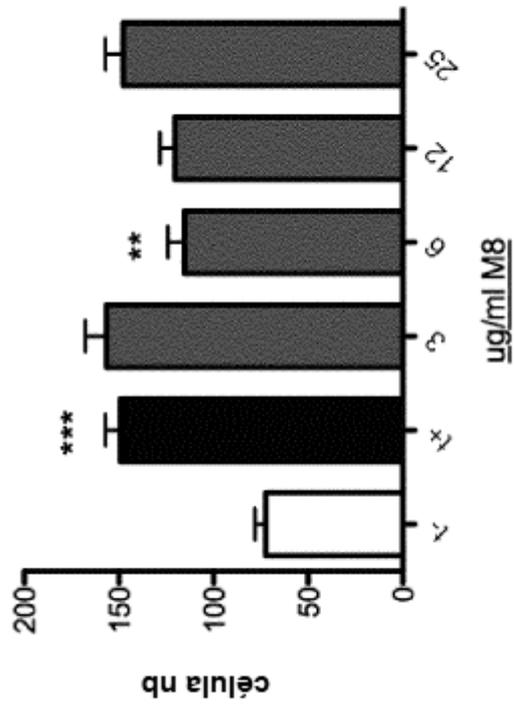


FIGURA 9C

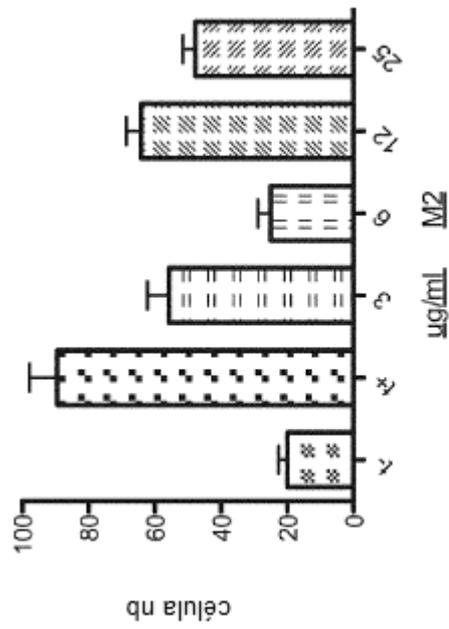


FIGURA 9B

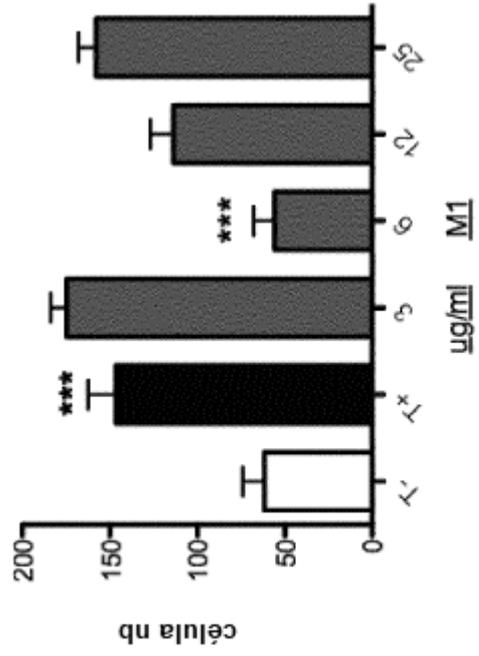


FIGURA 9D