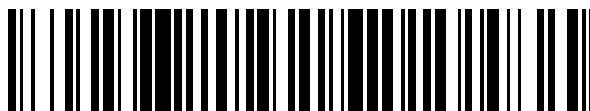


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 289**

51 Int. Cl.:

C07K 14/765 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2008** **PCT/EP2008/058566**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009** **WO09004054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2008** **E 08774691 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2162462**

54 Título: **Polipéptido antagonista del receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR-4)**

30 Prioridad:

03.07.2007 DE 102007030904

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

19.02.2018

73 Titular/es:

PHARIS BIOTEC GMBH (100.0%)

Feodor-Lynen-Strasse 31

30625 Hannover, DE

72 Inventor/es:

FORSSMANN, WOLF-GEORG;

KIRCHHOFF, FRANK;

MÜNCH, JAN y

STÄNDKER, LUDGER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 655 289 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

Polipéptido antagonista del receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR-4)

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido (proteína) antagonista de recetor 4 de quimioquina CXC (CXCR4) que inhibe la infección de virus dependientes de CXCR4, como VIH-1, y bloquea el desplazamiento de células de tumor a través de la unión de CXCL12 a CXCR4: fragmento de albúmina antiviral en circulación (ALB408-423) y su uso terapéutico y de diagnóstico. La invención incluye la forma de origen natural de ALB408-423 y fragmentos derivados de la misma y/o análogos o derivados y, finalmente, un medicamento que contiene dichos péptidos naturales, recombinantes y sintéticos para su uso para indicaciones médicas y para su uso como agente de diagnóstico. Por otra parte, la invención incluye formas modificadas y derivados de ALB408-423 que tienen una eficacia terapéutica particularmente favorable. Asimismo, incluye una sonda de ácido nucleico que se hibrida con ALB408-423 o uno de sus fragmentos y/o derivados y anticuerpos o antagonistas dirigidos contra ALB408-423 o uno de sus fragmentos y/o derivados, para fines terapéuticos o de diagnóstico, especialmente, en enfermedades víricas para el tratamiento de infecciones por VIH-1 y VIH-2, así como el tratamiento de enfermedades neoplásicas, para prevenir metástasis de células cancerosas o para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, como asma, fibrosis pulmonar o artritis reumatoide.

Antecedentes de la invención

Los receptores de quimioquina se expresan en la superficie de determinadas células que interactúan con las citoquinas denominadas quimioquinas. El receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4) es un receptor acoplado a proteína G que transduce señales de su ligando endógeno, la quimioquina CXCL12 (factor derivado de célula estromal 1, SDF-1). Tras la interacción de CXCR4/CXCL12, se desencadenan los flujos de iones de calcio intracelulares (Ca^{2+}). Esto provoca respuestas celulares, incluyendo quimiotaxis, que permiten que las células se desplacen dentro del organismo. CXCR4 se expresa en células mieloides, linfocitos T, Linfocitos B, células epiteliales, células endoteliales y células dendríticas. La quimioquina CXCL12 es el único ligando agonista de CXCR4 conocido. La interacción entre CXCL12 y CXCR4 desempeña un papel crucial en el desplazamiento de células progenitoras durante el desarrollo embriológico de los sistemas cardiovascular, hematopoyético o nervioso central. Se sabe asimismo que dicha interacción está relacionada con varias enfermedades, tales como infección por VIH/SIDA, metástasis de células cancerosas, progresión celular de leucemia, fibrosis pulmonar y artritis reumatoide. Se supone que dicha interacción puede ser una diana terapéutica crítica en todas estas enfermedades. Se supone que las sustancias que interfieren con la señalización de CXCR4/CXCL12 tienen potencial como fármaco, terapia contra el VIH/SIDA o para prevenir los procesos de desplazamiento celular relacionados con la metástasis del cáncer, la leucemia y enfermedades inflamatorias como fibrosis pulmonar, artritis reumatoide o asma (revisado en Tsutsumi y col., 2007, Peptide Science 88: 279 - 289). A diferencia de los agonistas de receptor como CXCL12, que inducen respuestas celulares, los antagonistas de receptor son ligandos o fármacos que no inducen una respuesta biológica, es decir, el desplazamiento celular o señalización del Ca^{2+} , tras la unión a su receptor. Los antagonistas de receptor son fármacos útiles que se está utilizando ya clínicamente (p.ej., antagonistas de angiotensina, antagonistas β -adrenérgicos, antagonista serotoninérgico o antagonistas CCR5) que pueden bloquear la infección por VIH-1 (antagonista de CCR5) o disminuir las respuestas celulares mediadas por agonista. La interacción de los agonistas de receptor con el receptor inhibe la función de un agonista. La mayoría de los antagonistas de fármaco consiguen su potencia compitiendo con ligandos endógenos o sustratos en sitios de unión estructuralmente definidos en receptores.

Se ha demostrado ya que los antagonistas de CXCR4 *in vitro* e *in vivo* bloquean el desplazamiento de células cancerosas y, por tanto, la metástasis. CXCR4 se expresa en la superficie de diversas células (células mieloides, Linfocitos T, linfocitos B, células epiteliales, células endoteliales y células dendríticas), así como en 23 tipos diferentes de células cancerosas. La interacción CXCL12-CXCR4 está relacionada con la metástasis de varios tipos de cáncer, entre los que se incluyen cáncer de mama, riñón, próstata, pulmón y páncreas y melanoma, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de ovarios y tumores cerebrales malignos (revisado en Tsutsumi y col., 2007, Peptide Science 88: 279 - 289). Se ha demostrado que los antagonistas de CXCR4, como por ejemplo análogos de T140, suprimen el desplazamiento y la invasión de células pancreáticas inducidos por CXCL12 o el desplazamiento de células de carcinoma de mama *in vitro* e *in vivo* (revisado en Tsutsumi y col., 2007, Peptide Science 88: 279 - 289). Se ha demostrado asimismo que los antagonistas de CXCR4 suprimen eficazmente la invasión y adhesión de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) *in vitro* (revisado en Tsutsumi y col., 2007, Peptide Science 88: 279 - 289), lo que confirma la participación de la interacción CXCL12-CXCR4 en la metástasis de SCLC. La interacción CXCR4/CXCL12 también participa en el desarrollo de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores B (pre-B) y leucemia linfocítica crónica (LLC). Los antagonistas de CXCR4 también atenúan el desplazamiento de células LLA pre-B (revisado en Tsutsumi y col., 2007, Peptide Science 88: 279 - 289). Asimismo, se ha demostrado que la artritis reumatoide está causada por la acumulación de linfocitos T de memoria CD4^+ que expresan CXCR4 en la sinovia inflamada. La concentración de CXCL12 en la sinovia de los pacientes con artritis reumatoide es muy elevada en virtud de lo cual atrae linfocitos T de memoria. Las moléculas antagonistas de CXCR4 bloquean el desplazamiento de linfocitos T de memoria a la sinovia (revisado en Tsutsumi y col., 2007, Peptide Science 88: 279 - 289).

Los antagonistas de CXCR4 no solamente inhiben la unión del agonista de CXCL12 a CXCR4, sino que también impiden la interacción de la glicoproteína de VIH gp120 con CXCR4 inhibiendo así la infección vírica. Se han descrito antagonistas de CXCR4 como potentes inhibidores para la replicación de VIH (Gerlach, et. al., Journal of Biological Chemistry, 27 abril 2001, vol. 276 (17), páginas 14153-14160; Wieslaw, et. al, Chemical Biology & Drug Design, enero 2006, vol. 67(1), páginas 13-26). Los virus de inmunodeficiencia humanas 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2) utilizan CD4 expresado en la superficie celular como principal receptor y los receptores de quimioquina CCR5 o CXCR4 como co-receptores para la entrada celular. Los virus que infectan las células a través de CD4 y CXCR4 se denominan CXCR4 (X4) trópicos, las variantes de VIH-1 que usan CD4 y CCR5 se llaman trópico R5 y aquellos que pueden utilizar ambos co-receptores se llaman trópicos duales. Las variantes de VIH-1 trópico X4 pueden encontrarse tan solo en aproximadamente un 50 % de todos los pacientes con SIDA, mientras que las variantes de VIH trópicas R5 predominan en las primeras etapas y la fase asintomática de la infección VIH-1. Se ha demostrado que la infección VIH-1 trópico X4 puede bloquearse *in vitro* y en seres humanos VIH-1 infectados mediante el tratamiento de células o los pacientes con antagonistas de CXCR4 como AMD3100. Cabe destacar que Maraviroc, un antagonista de CCR5, es el primer fármaco clínico aprobado en la terapia del SIDA que bloquea la infección de variantes de VIH-1 trópico R5 (revisado por Tsimbri y Kuritzkes, 2007, Annual Review of Medicine 58:445-459).

Por lo tanto, el receptor de quimioquina CXCR4 es una atractiva diana terapéutica para el tratamiento de VIH/SIDA, patologías asociadas con cáncer y enfermedades inflamatorias crónicas, como asma o fibrosis pulmonar. Los antagonistas de CXCR4 que bloquean las respuestas celulares mediadas por CXCL12 podrían inhibir estas importantes rutas del desarrollo y progresión de la enfermedad.

Sumario de la invención

La presente invención se define en su sentido más amplio con las reivindicaciones adjuntas. La invención concierne a un péptido que consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 21 IVRYTKKVPQVS y sus derivados amidados, acetilados, sulfatados, fosforilados y/o glicosilados. Otro objeto de la presente invención son polinucleótidos que codifican el péptido de la invención. Los polinucleótidos de la invención se caracterizan por estar constituidos por ADN, ARN, ADN genómico o APN. Los polinucleótidos que codifican los péptidos de la invención se utilizarán para la expresión de péptido recombinante en células procariotas o eucariotas, estudios de mutagénesis, clonación en vectores de interés, en particular, aquellos que se pueden utilizar para enfoques de transferencia de genes.

Otro objeto más de la presente invención es un vector que contiene los polinucleótidos de acuerdo con la invención. Los vectores que codifican secuencias de polinucleótidos que codifican el péptido de la invención deberán utilizarse para la expresión de péptido recombinante en células procariotas o eucariotas, estudios de mutagénesis.

Otro objeto de la presente invención es una célula hospedadora modificada por ingeniería genética que contiene el vector de acuerdo con la invención. Una célula transgénica modificada por ingeniería genética se puede utilizar para enfoques de terapia génica que permiten la expresión y secreción del péptido de la invención en individuos que necesitan antagonistas de CXCR4, en particular, pacientes de cáncer y SIDA.

Otro objeto más de la invención es un anticuerpo dirigido contra el polipéptido de acuerdo con la invención. Los anticuerpos son útiles para detectar el péptido en muestras del cuerpo, como sangre, suero, plasma en ELISA; RIA o fluorescencia inmune para fines de diagnóstico.

El péptido de la invención se puede administrar en un procedimiento para el tratamiento de pacientes que necesitan el péptido de la invención.

Otro objeto más de la presente divulgación es un procedimiento para el tratamiento de pacientes que necesitan la inhibición de ALB408-423 a través de la administración de cantidades terapéuticas de los péptidos antagonista/inhibidor de la invención. ALB408-423 y sus derivados son antagonistas de CXCR4 que permiten tratar enfermedades como Infección VIH/SIDA, metástasis de células de cáncer, progresión de células de leucemia, fibrosis pulmonar y artritis reumatoide y otras enfermedades de cáncer e inflamatorias.

También es objeto de la invención una formulación galénica que consiste en el polipéptido de la invención.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona también un procedimiento para el tratamiento de pacientes en los que se consigue un efecto terapéutico del polipéptido por administración de ADN que codifica el péptido de la invención y su expresión *in vivo* en el paciente. El péptido de la invención puede proporcionarse a través de un procedimiento que comprende una extracción desde un hemofiltrado por extracción de intercambio catiónico seguido de la elución de las sustancias absorbidas, una nueva cromatografía de intercambio catiónico del extracto que contiene los péptidos y cromatografía en fase inversa fraccionada.

Alternativamente, se puede llevar a cabo el procedimiento para la fabricación del péptido de acuerdo con la invención por síntesis en fase sólida en términos de síntesis de Merrifield o síntesis en fase líquida a través de procedimientos conocidos de por sí entre las personas especializadas utilizando aminoácidos protegidos y su purificación.

Otro procedimiento más para la fabricación del péptido de acuerdo con la invención emplea procedimientos de expresión heteróloga conocidos entre las personas especializadas empleando vectores biotecnológicos comunes.

También es objeto de la presente invención un agente de diagnóstico que contiene un anticuerpo poli- o monoclonal de la invención o que contiene el ácido nucleico o ARNm que codifica el péptido de la invención.

- 5 El agente de diagnóstico de la invención contiene el péptido o los polinucleótidos de la invención para su uso en sistemas de ensayo para determinar los niveles de esta sustancia en muestras como tejido, plasma, orina y fluido cefalorraquídeo.

- 10 También es objeto de la invención un agente de diagnóstico que contiene el péptido de la invención como marcador para enfermedades víricas, infecciones bacterianas y fúngicas, procesos inflamatorios y neoplásicos y como marcador en procesos inflamatorios, reacciones de inflamación alterada, enfermedades tumorales, trastornos del crecimiento, enfermedades del sistema inmune y marcadores de enfermedades óseas.

La presente invención proporciona también un medicamento que contiene el péptido de la invención como principio activo de formas galénicas para administración oral, intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intratecal y como aerosol para la administración transpulmonar.

- 15 El péptido, los polinucleótidos, los anticuerpos/antagonistas y la formulación galénica de acuerdo con la invención se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades víricas, especialmente VIH-1, VIH-2, citomegalovirus, virus herpes simplex (tipos 1 y 2), virus varicela-zóster, virus de la hepatitis A y la hepatitis B, virus influenza, poliovirus, rinovirus, virus de la rubeola, virus del sarampión, virus de la rabia, virus de sarcoma de Rous, virus Epstein-Barr y para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas, procesos inflamatorios, reacciones de inflamación alterada, enfermedades tumorales, trastornos del crecimiento, enfermedades neuronales, enfermedades de coagulación de la sangre y hematopoyesis, enfermedades vasculares, enfermedades del sistema inmune y para la cicatrización de heridas y ósea.
- 20

- 25 La invención se describe con mayor detalle utilizando ALB408-423 como ejemplo específico. Se puede deducir fácilmente que es posible igualmente reemplazar el péptido de la invención ALB408-423 en las descripciones expuestas a continuación.

Descripción detallada de la invención

La Figura 1A-F presenta detalles del aislamiento de ALB408-423 desde hemofiltrado humano.

La Figura 2 presenta como ALB408-423 que contiene la fracción 31 bloquea la infección VIH-1 NL4-3.

- 30 La Figura 3 presenta como ALB408-423 químicamente sintetizado bloquea específicamente la infección VIH-1 trópico X4.

La Figura 4 presenta como ALB408-423 bloquea la infección por lentivirus trópico X4.

La Figura 5 representa actividades antivirales de derivados de ALB.

La Figura 6 presenta actividades antiviral de derivados de ALB.

La Figura 7 presenta actividades antivirales de derivados de ALB.

- 35 La Figura 8 presenta actividades antivirales de derivados de ALB.

La Figura 9 presenta un ensayo de citotoxicidad de derivados de ALB.

La Figura 10 presenta como ALB408-423 y derivados de ALB truncadlos bloquean específicamente la infección VIH-1 trópico X4.

- 40 La Figura 11 presenta como ALB408-423 y derivados inhiben la infección VIH-1 trópico X4 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La Figura 12 presenta como ALB408-423 inhibe la unión de CXCL12 a CXCR4.

La Figura 13 presenta como ALB408-423 no es agonista de CXCR4, CCR5 o CXCR1.

La Figura 14 presenta como ALB408-423 inhibe específicamente la movilización de Ca^{2+} evocada por CXCL12- en células que expresan CXCR4.

- 45 La Figura 15 presenta como ALB408-423 bloquea la internalización de CXCR4 medida por CXCL12.

La Figura 16 presenta como ALB408-423 bloquea dependiendo de la dosis el desplazamiento de linfocitos T Jurkat mediado por CXCL-12.

La Figura 17 presenta actividades antagonistas de CXCR4 de derivados de ALB.

Se podría aislar ALB408-423 desde hemofiltrados humanos a través de procedimientos cromatográficos y un ensayo biológico. La caracterización bioquímica del péptido de acuerdo con la invención se llevó a cabo por espectrometría de masa incluyendo análisis de secuencia completa de los aminoácidos.

- 5 El que se describe en el presente documento tiene la siguiente secuencia de aminoácidos SEQ ID No 8:

LVRVTKKVPQVSTPTL

El peso molecular del péptido ALB408-423 es:

1830,2 Da

El punto isoelectrico (pI) del péptido ALB408-423 es 10,3.

- 10 Sorprendentemente, el péptido es un fragmento que comprende 16 aminoácidos de proteína albúmina de suero de plasma humano conocida (No. de referencia NP000468), que consiste en 585 aminoácidos en su forma procesada. La albúmina humana es una proteína del suero monomérica soluble que tiene un peso molecular de aproximadamente 65.000 que representa más de la mitad del total de la proteína del plasma (concentración: 3,5 a 5 g/dl). La función de la albúmina humana se describe predominantemente como una molécula vehículo para todos los
- 15 tipos de sustancias tanto hidrófobas como hidrófilas, p.ej., hormonas esteroideas y péptido, ácidos grasos, vitaminas, sustancias farmacéuticas y cationes. Dada su muy alta concentración en suero, contribuye sustancialmente a la estabilización del pH de la sangre, el volumen de líquido extracelular y el mantenimiento de la presión coloidal-osmótica. La albúmina tiene una estructura globular, estabilizada por una serie de puentes disulfuro y normalmente no está glicosilada, si bien, frecuentemente, se producen alteraciones debidas a la acetilación, la glicosilación
- 20 enzimática y la glicosilación no enzimática en el transcurso del envejecimiento molecular o tras los cambios patofisiológicos. Es sintetizada por el hígado como pre-pro-albúmina que tiene 609 aminoácidos; el péptido de señal N-terminal que comprende 18 aminoácidos se escinde intracelularmente tras la entrada en el retículo endoplásmico; se separan otros 6 aminoácidos en el aparato de Golgi antes de que la albúmina madura que comprende 585 aminoácidos sea secretada por las células del hígado. El aclaramiento de la albúmina tiene lugar a través del riñón,
- 25 el tracto gastrointestinal y en las células del tejido del hígado.

La secuencia de péptidos del ALB408-423 divulgado arranca del aminoácido 408 y, por tanto, comprende los aminoácidos 408 a 423 de la forma de albúmina en circulación. Se produce evidentemente por un proceso natural del precursor de albúmina mediante las correspondientes proteasas.

- 30 Sorprendentemente, el péptido de acuerdo con la invención es un antagonista del receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4) y causa una supresión de la infección VIH-1 y la replicación de células humanas, así como la supresión de las respuestas celulares inducidas por CXCL12/CXCR4 como desplazamiento celular, movilización de Ca^{2+} o internalización de CXCR4.

- El péptido se puede obtener por purificación cromatográfica a partir de hemofiltrado humano (HF). HF se obtiene en grandes cantidades durante la ultrafiltración de la sangre de pacientes renales (ejemplo 1). HF contiene todos los
- 35 péptidos y proteínas en la circulación de la sangre humana con un peso molecular por debajo de 30 kDa. Los péptidos y proteínas en HF fueron extraídos utilizando cromatografía de intercambio catiónico. Se eluyeron los péptidos y proteínas unidos a columna con sistemas de tampones de varios valores de pH y se sometieron a cromatografía de fase inversa los eluatos (ejemplo 1). Para identificar las fracciones que bloquean infección VIH-1, se disolvieron fracciones de péptido en PBS y se añadieron a células indicadoras permisivas de VIH. A continuación,
- 40 se infectaron las células con VIH-1 trópico CXCR4 y se determinaron los índices de infección tres días después de la infección (dpi) (ejemplo 1). Una fracción presentó una potente actividad anti VIH y fue sometida a otras rondas de purificación cromatográfica y ensayos de inhibición de VIH dirigidos a identificar el péptido biológicamente activo (ejemplo 1). Tras cuatro rondas de purificación, la espectroscopia de masas de la fracción activa 31 reveló un solo péptido con un peso molecular de 1830 Da (ejemplo 2). Los análisis de la secuencia tuvieron como resultado la
- 45 identificación de LVRVTKKVPQVSTPTL y la comparación de la secuencia presentó un 100 % de homología con la proteína altamente abundante en suero "Albumina de suero humano (ALB)" que abarca los restos de aminoácidos 408-423 (ALB408-423) (ejemplo 2). Se demostró la prueba de la actividad, ya que el péptido químicamente sintetizado (ejemplo 3) bloquea dependiendo de la dosis la infección VIH-1 trópico X4 (ejemplo 4). ALB408-423 bloquea específicamente la infección de las variantes de VIH-1 trópico X4, pero no tiene efecto sobre la infección de
- 50 VIH-1 trópico R5 (ejemplo 4 y 5) en células indicadoras. ALB408-423 también suprimió la infección de VIH-2 trópico X4 (ejemplo 5). En el ejemplo 6 se resumen los datos obtenidos de un estudio de relación estructura-actividad (SAR) cuyo objeto es identificar restos cruciales para la actividad antiviral y demuestran que es importante la integridad N-terminal de ALB408-423 para su actividad antiviral. En contraposición, los truncamientos en el término C de hasta 6 restos de aminoácidos no anularon la actividad antiviral. El estudio SAR también permitió identificar derivados de
- 55 ALB408-423 como ALB408-419 o ALB L408I-419 que presentaron una mayor actividad antiviral en comparación con ALB408-423 de tipo silvestre (ejemplo 6). Ninguno de los derivados de ALB es citotóxico (ejemplo 7). ALB408-423, ALB408-419 y ALB L408I-419 bloquearon dependiendo de la dosis la infección de diversas variantes de VIH-1 trópico X4, pero no VIH-1 trópico R5 en células indicadoras (ejemplo 8) o células mononucleares de sangre primaria

(ejemplo 9). Todos estos datos indican una interacción específica de ALB408-423 o sus derivados con el co-receptor CXCR4 de VIH.

Mediante el uso de técnicas basadas en fluorescencia se podría demostrar que ALB408-423 se une directamente e interactúa con CXCR4 impidiendo así la unión de CXCL12, el agonista natural de CXCR4 (ejemplos 10-12). ALB408-423 o sus derivados en solitario no inducen la movilización de Ca^{2+} a través de CXCR4 u otros receptores de quimioquina tales como CCR5 y CXCR1 lo que indica que ALB408-423 es un antagonista de CXCR4 por definición (ejemplos 10-12 y 14). En presencia de ALB408-423, se podría bloquear el desplazamiento de células mediado por CXCL12 (ejemplo 13) y la internalización del receptor CXCR4 también proporcionando una mayor prueba de que ALB408-423 es un antagonista de CXCR4 (ejemplo 12). En conjunto, se identificó ALB408-423, un fragmento de albúmina de suero humano, explorando una biblioteca de péptidos derivada de HF utilizando un ensayo de inhibición de infección VIH-1. El péptido químicamente sintetizado y sus derivados bloquean dependiendo de la dosis la infección VIH-1 y VIH-2 trópico X4 por interacción directa con el receptor CXCR4 receptor. ALB408-423 y sus derivados actúan de forma antagonista ya que no median respuestas celulares y suprimen la actividad de CXCL12, el agonista CXCR4 natural. Estos datos prueban que ALB408-423 es el primer antagonista de CXCR4 humano. ALB408-423 y sus derivados podrían ser útiles en el tratamiento de pacientes infectados con VIH-1 trópico X4, para prevenir metástasis de cáncer e interferir en enfermedades inflamatorias crónicas en las que participa la señalización CXCR4/CXCL12 y suprime la señalización mediada por CXCL12 a través de CXCR4.

El péptido de acuerdo con la invención así como análogos, fragmentos y derivados del péptido, su ADNc, su gen y los anticuerpos que neutralizan la actividad de ALB408-423 pueden emplearse como medicamentos. Su actividad biológica corresponde a la de inhibición del virus, inhibición de desplazamiento de célula cancerosa y sustancias antagonistas de CXCR4. ALB408-423 se une específicamente a CXCR4 impidiendo así la infección de variantes de VIH-1 trópicas CXCR4 y uniéndose al agonista CXCL12 de CXCR4. El péptido de acuerdo con la invención se puede administrar en una forma habitual para péptidos en una ruta parental, intravenosa, intramuscular, intranasal, local-tópica, subcutánea o bucal. La cantidad de péptido que se administre está comprendida entre 1 μg y 1 g por dosis unitaria al día. La actividad del péptido de acuerdo con la invención puede inhibirse administrando inhibidores/antagonistas apropiados.

El agente de diagnóstico de acuerdo con la invención contiene anticuerpos poli- o monoclonales contra el péptido de acuerdo con la invención, opcionalmente, en una forma marcada por fluorescencia o marcada radioactivamente, para emplearse en ELISA o RIA conocidos por sí mismos. El agente de diagnóstico de acuerdo con la invención contiene ADN, ARN y/o APN, opcionalmente, en una forma modificada y/o marcada, para su uso en sistemas de ensayo conocidos entre las personas especializadas, tales como PCR o huella dactilar.

La invención se describirá con mayor detalle con los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1 (Ejemplo de referencia)

Aislamiento de ALB408-423 antiviralmente eficaz desde hemofiltrado humano

Se diluye opcionalmente hemofiltrado humano con agua y se acidifica. El valor pH está comprendido preferentemente entre 1,5 y 3,5, especialmente entre 2,5 y 3,0. A continuación, se pasa el hemofiltrado a través de un intercambiador de cationes, por ejemplo, un material de soporte modificado con grupos ácido sulfónico (Fraktogel SP-650 (M), Merck, Darmstadt, Alemania). Se eluyen los péptidos unidos al intercambiador de cationes con una concentración relativamente alta de una solución de sal. La concentración iónica del eluato es aproximadamente la de una solución de acetato amónico 0,5 a 1 M.

Se somete el eluato recogido a otra cromatografía de intercambio de cationes. Esta cromatografía es preferentemente una elución fraccionada con tampones que tienen valores de pH crecientes.

Posteriormente, se purifican además las fracciones que contienen el péptido de acuerdo con la invención por cromatografía en fase inversa preparativa seguido de cromatografía en fase inversa semi-preparativa, por ejemplo, sobre materiales de soportes modificados con C18. Preferentemente, se lleva un seguimiento del grado de purificación utilizando cromatografía en fase inversa analítica, por ejemplo, sobre materiales de soporte modificados con C18.

1ª etapa: Extracción discontinua de hemofiltrado

Se ajusta el valor de pH de 800 a 1000 litros de hemofiltrado a 2,7 con HCl y se diluye con agua a una conductividad de 5,5 mS/cm y se carga en un intercambiador de cationes fuerte con un caudal de 3 l/min.

Condiciones de la cromatografía:

Columna:	Vantage VA 250 (Amicon, Witten, Alemania)
Material de columna:	Fractogel TSK SP 650 (M), 25 cm x 20 cm
Caudal:	3 l/min
Detección:	280 nm, pH, conductividad
Tampón A:	Hemofiltrado pH 2,7, conductividad 5,5 mS/cm

(continuación)

Tampón B: acetato amónico 0,5 M
 Equipo: Sistema de cromatografía de piloto automático (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, Alemania)

- 5 Después de cargar el total de 1.000 litros de líquido durante toda la noche, se lleva a cabo el aclarado con varios volúmenes de columna de 5 mM HCl. Se lleva a cabo la elución de los péptidos unidos como una elución continua con acetato amónico 0,5 M. Se consigue una elución completa de los péptidos a través de un valor de pH en rampa (6,8 a 7,2) y una conductividad en rampa (56 mS/cm) en aproximadamente 5 litros de eluato.

2ª etapa: Primera separación preparativa (Lote 01/2003)

- 10 Se combinan los eluatos de acetato amónico de la extracción discontinua en una cantidad de 10.000 litros de péptido de hemofiltrado. Después de ajustar el pH a 2,7, se carga el extracto de péptido en el intercambiador de cationes preparativo con la adición de agua completamente desalada con una conductividad de 5,5 mS/cm.

Condiciones de cromatografía:

- 15 Columna: Vantage 250 VA
 Material de columna: Fractogel TSK SP 650 (M), 25 cm x 20 cm
 Caudal: hasta 3 l/min durante la carga; 0,5 a 1 l/min durante la elución
 Detección: 280 nm, pH, conductividad
 Muestra: Hemofiltrado pH 2,7, conductividad 5,5 mS/cm
 20 Equipo: Sistema de cromatografía con piloto automático (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, Alemania)

Después de cargar el extracto en bruto durante 240 minutos, se aclara la columna con HCl 0,01 M hasta que la conductividad está por debajo de 1 mS/cm. Se lleva a cabo la elución en varias etapas con los tampones que se indican a continuación.

Tampón	Valor pH	Sustancias tampón	Conductividad (mS/cm)
Tampón de lavado	2,0	0,01 M HCl	1
Tampón de elución 1	3,6	0,1 M Monohidrato de ácido cítrico	2,9
Tampón de elución 2	4,5	0,1 M Ácido acético +0,1 M Acetato sódico	4,0
Tampón de elución 3	5,0	0,1 M Ácido málico	6,2
Tampón de elución 4	5,6	0,1 M Ácido succínico	6,1
Tampón de elución 5	6,6	0,1 M NaH ₂ PO ₄	4,9
Tampón de elución 6	7,4	0,1 M NaH ₂ PO ₄	6,7
Tampón de elución 7	9,0	0,1 M Carbonato amónico	6,7

- 25 Se diseñan los eluatos 1-7 como agrupaciones de pH I-VII. Se recogen por separado y, finalmente, se aclaran con agua completamente desalada. Se lleva a cabo la elución hasta alcanzar una nueva línea base, alcanzándose volúmenes de elución de 10 a 25 litros para cada agrupación de pH individual de I a VII.

3ª etapa: Segunda separación preparativa:

- 30 Se separa cada una de las agrupaciones de pH individuales por cromatografía de fase inversa por fraccionamiento y desalación simultánea.

Condiciones de cromatografía:

- 35 Columna: FineLine 100 (Pharmacia, Freiburg, Alemania)
 Material de columna: Fuente RPC, 15 µm; 10 x 12,5 cm (FineLine 100)
 Caudal: 150 ml/min (FineLine 100)
 Detección: 280 nm, conductividad, pH
 Tampón A: 10 mM HCl
 Tampón B: 80 % acetonitrilo en HCl 10 mM
 Gradiente: 0-60 % tampón B en 5 volúmenes de columna

- 40 Después de cargar cada una de las agrupaciones de pH individuales, se lava la columna con tampón A. Durante la elución, se recogen fracciones de 200 ml. Se liofilizan las fracciones y se almacenan a -20 °C. Se analizan artes alícuotas de las fracciones formadas en un ensayo de inhibición de VIH. Las fracciones 6-8 de la agrupación de pH II contenían el péptido de acuerdo con la invención.

En la Figura 1A-F: Aislamiento de ALB408-423 de hemofiltrado humano. Se siguió fraccionado el hemofiltrado fraccionado por medio de la etapa de elución de pH por HPLC-RP y se midieron las fracciones en un ensayo de inhibición de VIH.

Control: T20 control.

- 5 A. 3ª etapa de aislamiento. El fraccionamiento de PR de la agrupación 2 de pH presentó una actividad inhibidora en las fracciones 6-8.

B-E. Etapas de aislamiento 4ª a 7ª. Se purificó la actividad inhibidora hasta que se obtuvo una sustancia pura.

F. Espectro de masas (MALDI-EM) y análisis de secuencia de ALB408-423 purificado.

- 10 Se llevaron a cabo ensayos de inhibición de VIH sembrando células 4000 P4-R5 MAGI (P. Charneau y col., J. Mol. Biol. 241: 651, 1994) en 100 µl de DMEM (10% FCS, 100 U/ml penicilina G y 100 mg/ml sulfato de estreptomicina). Se transfectan establemente células P4-R5 con un casete LTR-lacZ y una vez infectado con éxito con VIH-1 expresa β-galactosidasa dependiendo de Tat, que se puede detectar en un ensayo de quimioluminiscencia. Al día siguiente se añadieron partes alícuotas de las fracciones. A continuación, se resuspendieron las fracciones liofilizadas en 80 µl de DMEM y se pipetearon 25 µl de cada una de ellas en células P4-R5, incubadas a 37 °C durante 1 hora y, a
- 15 continuación, se infectaron con VIH-1 NL4_3 (1 ng de antígeno p24). Se obtuvieron reservas de virus por infección transitoria de linfocitos T 293 con ADN proviral por método de fosfato cálcico (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Clontech). Se recogieron reservas de virus 48 horas después de la transfección, se filtraron y se utilizaron para infección. Tres días después de la invención, se detectó la actividad de β-galactosidasa en células P4-R5 infectadas utilizando un ensayo GalScreen (Tropix) según la recomendación del fabricante. Brevemente, se separó el
- 20 sobrenadante, se añadieron 40 µl de una dilución 1:1 de sustrato PBS/GalScreen+, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se transfirieron 30 µl de lisados en lumiplacas de 96 pocillos. A continuación, se detectó la luminiscencia como unidades de luz relativas por segundo en un luminómetro (Berthold, Orion). Se sustrajo de todas las mediciones, la actividad de fondo de β-galactosidasa media de células de control no infectadas. Se calculó el % de valores de infección para cada infección en relación con los controles que
- 25 no contenía péptido (100 %). Se establecieron las actividades de enzima en las mediciones sin ALB408-423 a 100 % y todos los valores se basaron en ellos. Se examinó la purificación final (etapa 7ª) en exactamente las mismas condiciones en células TZM-bl (X. Wei y col., Antimicrob. Agents Chemother. 46: 1896, 2002).

4ª Etapa: Cromatografía semipreparativa C18 en fase inversa:

- 30 Se separó un total de 200 mg (que corresponde a 1087 litros de cantidad equivalente de hemofiltrado) de las fracciones 6-8 de la agrupación de pH II, que eran bioactivas en el ensayo (Fig. 1A) a través de una columna en fase inversa semi-preparativa. Las fracciones 33 + 34 contenían el sustrato de acuerdo con la invención (Figura 1B).

Condiciones de cromatografía:	
Columna:	4,7 cm x 30 cm columna de acero
Material de relleno:	Bakerbond RP-C18, 15-30 µm, 300 Å)
35 Tampón A:	100 % agua, HCl 10 mM
Tampón B:	80 % acetonitrilo, 20 % agua, HCl 10 mM
Gradiente:	0-30 % B en 2000 ml
Caudal:	40 ml/min (presión: 40 bar)
Detección:	214 nm y 280 nm
40 Equipo de cromatografía:	BioCad 250, Perseptive Biosystems
Fracciones:	50 ml cada uno desde el inicio del gradiente (min 10,75)

5ª etapa: Cromatografía C18 semi-preparativa en fase inversa:

- 45 Se separaron las fracciones 33 + 34 de la etapa de cromatografía anterior, que resultaron bioactivas en el ensayo, a través de una columna en fase inversa semi-preparativa similar utilizando diferentes fases móviles. Los ensayos de infección de VIH posteriores revelaron que las fracciones 5 + 6 contenían la sustancia de acuerdo con la invención (Figura 1C).

Condiciones de la cromatografía:	
Columna:	columna de acero de 4,7 cm x 30 cm
Material de relleno:	Bakerbond RP-C18, 15-30 µm, 300 Å)
50 Tampón A:	30 % metanol, 70 % agua, HCl 10 mM
Tampón B:	100 % metanol, HCl 10 mM
Gradiente:	0-15 % B en 40 ml; 15-60 % B en 1900 ml
Caudal:	40 ml/min (presión: 30 bar)
Detección:	214 nm y 280 nm
55 Equipo de cromatografía:	BioCad 250, Perseptive Biosystems
Fracciones:	50 ml cada una desde el inicio del gradiente (min 9,75)

6ª etapa: cromatografía C4 en fase inversa analítica:

Se separaron las fracciones bioactivas 5 + 6 de la cromatografía anterior a través de una columna en fase inversa analítica. Se sometieron a ensayo partes alícuotas en un bioensayo (ensayo de inhibición VIH). Las 51 a 57 contenían la sustancia de acuerdo con la invención (Figura 1D).

5	Condiciones de cromatografía:	
	Columna:	columna de acero de 2 cm x 25 cm
	Material de relleno:	RP-C4, 5 µm, 100 Å, Biotek Silica, Ostringen, Alemania)
	Tampón A:	agua, 0,1 % TFA
	Tampón B:	80 % acetonitrilo, 20 % agua, 0,1% TFA
10	Gradiente:	0-5 % B en 2 min, 5-35 % B en 60 min, 35-100% B en 3 min
	Caudal:	7 ml/min
	Detección:	214 nm y 280 nm
	Equipo de cromatografía:	Kontron
	Fracciones:	1 min cada una desde min 1

7ª etapa: cromatografía C18 en fase inversa analítica:

Se separaron las fracciones bioactivas 51-57 de la cromatografía anterior a través de una columna en fase inversa analítica. Se sometieron a ensayo partes alícuotas en un bioensayo. La fracción 31 contenía la sustancia de acuerdo con la invención en forma pura (Figura 1E).

	Condiciones de cromatografía:	
20	Columna:	columna de acero de 1 cm x 25 cm
	Material de relleno:	RP-C18, 5 µm, 300 Å, Vydac (Hesperia, Estados Unidos)
	Tampón A:	agua, 0,1 % TFA
	Tampón B:	80 % acetonitrilo, 20 % agua, 0,1 % TFA
	Gradiente:	0-15 % B en 5 min, 15-45 % B en 60 min, 45-100 % B en 1 min
25	Caudal:	2 ml/min
	Detección:	214 nm y 280 nm
	Equipo de cromatografía:	Kontron
	Fracciones:	1 min cada una desde min 1

La sustancia pura de acuerdo con la invención estaba contenida en la fracción 31 y se examinó en un bioensayo dependiendo de la dosis y se caracterizó por química de péptidos (ejemplo 2).

Ejemplo 2 (Ejemplo de referencia)**Determinaciones de masa**

Se llevaron a cabo determinaciones de masa del péptido aislado desde el hemofiltrado (desde la fracción 31 de la etapa 7ª en el Ejemplo 1) y en el péptido químicamente sintetizado (Ejemplo 3) en un espectrómetro de masa MALDI (Voyager DE-Pro). Se determinaron las masas moleculares de los péptidos para corresponder con las siguientes cifras de masa (Pm):

ALB408-423, aislado del hemofiltrado humano (Figura 1F):	1830,9 Da
ALB408-423, péptido químicamente sintetizado:	1830,6 Da

Determinación de secuencia

Se analizó el péptido nativo purificado por análisis de acoplamiento EM-EM (ESI-TRAP) suministrado por la empresa PROTEOMEFACORY AG, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlín (Alemania) por comparación de la base de datos de las masas EM-EM ESI establecidas por medio de un motor de búsqueda Mascot, que tuvo como resultado la siguiente secuencia con la probabilidad máxima:

LVRYYTKKVPQVSTPTL (Figura 1F).

Comparación de base de datos

Una posterior comparación de la base de datos con la base de datos SwissProt demuestra que la secuencia de péptidos tiene un 100 % de identidad con los aminoácidos 408-423 de la proteína humana albúmina de suero (No. de referencia NP000468) y la secuencia contiene los aminoácidos: LVRYYTKKVPQVSTPTL.

La fracción 31 purificada es activa en el bioensayo de inhibición de VIH-1

Se disolvieron 1,6 mg de la fracción 31 de la 7ª etapa del Ejemplo 1 en 160 µl de DMEM. A continuación, se añadieron 10 µl de diluciones en serie de la fracción 31 que contenía ALB408-423 a 60 µl de células TZM-bl (60 µl) y se infectaron con 1 ng de antígeno p24 de VIH-1 NL4_3 en un volumen total de 100 µl. Tres días después, se

determinaron los índices de infección en un ensayo GalScreen (véase Ejemplo 1). La fracción 31 bloqueó la infección de VIH-1 trópico X4 NL4_3 dependiendo de la dosis. La dosis que bloqueó la infección a la mitad del valor máximo (IC_{50}) fue 21,45 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 2).

- 5 La Figura 2: ALB408-423 que contiene la fracción 31 bloquea la infección VIH-1 NL4-3. Se incubaron células TZM-bl con diluciones en serie de la fracción 31 y se infectaron con VIH-1NL4-3 trópico X4. 3 días después de la infección, se determinaron los índices de infección por ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios $\pm$ la desviación típica de infecciones por triplicado en relación con controles tratados con PBS (100 %).

Ejemplo 3 (Ejemplo de referencia)

Síntesis química de ALB408-423

- 10 Se llevó a cabo la síntesis química de ALB408-423 por síntesis en fase sólida convencional en un sintetizador de péptidos 9050 (Applied Biosystems) utilizando química Fmoc conocida. Se purificó el péptido obtenido por cromatografía en fase inversa y se estableció su identidad y su pureza por RP-HPLC analítica y por determinación MALDI EM tal como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 4

- 15 **ALB408-423 sintético bloquea específicamente la infección de variantes de VIH-1 trópico X4**

Se sembraron 5000 células TZM-bl en 100 μl de DMEM (10 % FCS, 100 U/ml de penicilina G y 100 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina). Se disolvió ALB408-423 en PBS (10 mg/ml). Un día después, se añadieron 20 μl de diluciones en serie de ALB408-423 en PBS a las células y, a continuación, se infectaron las células con 0,5 ng de antígeno p24 de VIH-1 en un volumen total de 200 μl . Se utilizaron clones moleculares VIH-1 que diferían en el tropismo co-receptor y se generó según la descripción (Papkalla y col., J. Virol. 76: 8455-9, 2002).

- 20 La Figura 3: ALB408-423 químicamente sintetizado bloquea específicamente la infección VIH-1 trópico X4. Se infectaron células TZM-bl que contenían las diluciones de péptido indicadas con variantes de VIH-1 que diferían en su tropismo co-receptor. 3 días después, se utilizó el ensayo GalScreen para medir los índices de infección. A) inhibición dependiente de dosis de variantes de VIH-1 trópico X4, NL4-3, P51-Sc, P59-S/27 y P34-S o 92ht593.1 trópico dual. B) Índices de infección en presencia de 500 $\mu\text{g/ml}$ ALB408-423 que demostraron que el péptido bloquea específicamente la infección VIH-1 trópico X4, pero no R5. Los datos mostrados son los valores medios $\pm$ desviación típica derivados de infecciones por triplicado en relación con células que contenían PBS (100 % de infección).

- 30 Al cabo de 3 días, se detectó la infección utilizando el ensayo GalScreen (Tropix) (Ejemplo 1). ALB408-423 bloqueó dependiendo de la dosis la infección de todas las variantes de VIH-1 trópico X4 analizados (Figura 3A) (IC_{50} media de 24,2 $\mu\text{g/ml}$). La variante trópica dual (usando CXCR4 y CCR5) 92ht593.1 fue bloqueada con menos eficacia. En contraposición, las variantes de VIH-1 trópico CCR5 no fueron inhibidas ni siquiera en presencia de dosis muy altas de ALB408-423 (500 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 3B). Debido a la inhibición específica de la infección causada por variantes de VIH-1 trópico X4, se supone que ALB408-423 interactúa con el receptor de quimioquina CXCR4.

- 35 Tanto ALB408-423 purificado desde el hemofiltrado (Ejemplo 2) como ALB408-423 químicamente sintetizado (Ejemplo 4) presentaron una inhibición dependiente de dosis de replicación de VIH-1 en células diana lo que da prueba de que ALB408-423 es una molécula de inhibición de VIH-1 humana natural.

Ejemplo 5 (Ejemplo de referencia)

ALB408-423 sintético bloquea dependiendo de la dosis de infección por lentivirus trópico CXCR4

- 40 Se generaron VIH-1 trópico X4 NL4-3 y VIH-2ROD10 o VIH-1 trópico CCR5 NL4-3 92ht014, VIH-1-7312 y SIVmac239 por transfección transitoria de linfocitos T 293 y se utilizaron para infectar células TZM-bl que contenían las concentraciones indicadas de ALB408-423. Dos días después, se determinaron los índices de infección y se calcularon según la descripción. (Ejemplo 4). Los resultados demuestran que ALB408-423 bloquea dependiendo de dosis la infección de VIH-1 y VIH-2 trópico X4 ($IC_{50} \sim 10\text{-}20 \mu\text{M}$) mientras que el péptido no tuvo efecto en la infección de lentivirus trópico R5 lo que demuestra una inhibición específica de VIH-1 y VIH-2 trópicos CXCR4 (Fig. 4).

Figura 4. ALB408-423 bloquea la infección de lentivirus trópico X4. Se utilizaron reservas de VIH-1, VIH-2 y VIS de infectividad normalizada para infectar células TZM-bl que contenían ALB408-423. Al cabo de tres días, se determinaron los índices de infección utilizando un ensayo Gal Screen. Se muestran los valores medios $\pm$ desviación típica derivados de medidas por triplicado. Índices de infección de células que no contienen péptido = 100 %.

- 50 Tabla 1. Actividad antiviral de varios fragmentos de ALB contra infección VIH-1 trópico X4 NL4-3. Se infectaron células TZM-bl que contenían diluciones en serie de péptidos sintéticos infectados con VIH-1 NL4-3 y se determinaron los índices de infección y se calcularon tal como se ha descrito en el ejemplo 1 y 2 dos días después de la infección. Se determinaron los valores IC_{50} utilizando el paquete de software GraphPad Prism. Abreviaturas: Da, peso molecular; IC_{50} μM , concentración inhibitoria máxima media (50 %) obtenida de los experimentos

realizados por triplicado; SEM, error típico de la media; exp, número de experimentos realizados;

		Tabla 1			
		Da	IC ₅₀ ± SEM	exp.	SEQ ID No
ALB415-423	VPQVSTPTL	941	>100	3	1
ALB414-423	KVPQVSTPTL	1068	>100	3	2
ALB413-423	KKVPQVSTPTL	1196	>100	3	3
ALB412-423	TKKVPQVSTPTL	1298	>100	3	4
ALB411-423	YTKKVPQVSTPTL	1461	>100	3	5
ALB410-423	RYTKKVPQVSTPTL	1618	>100	3	6
ALB409-423	VRYTKKVPQVSTPTL	1717	>100	3	7
ALB408-423	LVRYTKKVPQVSTPTL	1832	7,6 ± 1,2	7	8
ALB408-422	LVRYTKKVPQVSTPT	1720	11,8 ± 3,1	4	9
ALB408-421	LVRYTKKVPQVSTP	1619	11,3 ± 3,3	4	10
ALB408-420	LVRYTKKVPQVST	1522	11,2 ± 2,9	4	11
ALB408-419	LVRYTKKVPQVS	1422	4,4 ± 1,0	8	12
ALB408-418	LVRYTKKVPQV	1334	18,3 ± 6,8	4	13
ALB408-417	LVRYTKKVPQ	1232	19,9 ± 4,1	2	14
ALB408-416		n.d.	n.d.		15
ALB408-415	LVRYTKKV	1006	17,4 ± 6,5	2	16
ALB408-414	LVRYTKK	907	>50	2	17
ALB408-413	LVRYTK	779	>50	2	18
ALB407-414	LLVRYTKK	1025	>100	2	19
ALB407-419	LLVRYTKKVPQVS	1536	11,1 ± 1,0	2	20
ALB408I-419	IVRYTKKVPQVS	1421	1,55 ± 1,2	4	21
ALB408F-419	FVRYTKKVPQVS	1454	93,2 ± 2,1	2	22
ALB408A-419	AVRYTKKVPQVS	1378	>100	2	23
ALB408G-419	GVRYSKKVPQVS	1366	>100	2	24
variantes ALB408-415					
ALB-tipo silvestre	LVRYTKKV	1006	17,4 ± 6,5	2	25
ALB-V415A	LVRYTKKA	978	33,0	1	26
ALB-K414A	LVRYTKAV	949	31,0	1	27
variantes ALB408-415					
ALB-K413A	LVRYTAKV	949	56,0	1	28
ALB-T412A	LVRYAKKV	976	11,2 ± 0,1	2	29
ALB-Y411A	LVRATKKV	914	91	1	30
ALB-R410A	LVAYTKKV	921	>1000	1	31
ALB-V409A	LARYTKKV	978	32,9	1	32

Ejemplo 6

5 Estudio de relación estructura-actividad (SAR) utilizando derivados de ALB408-423.

Se sintetizaron químicamente varios derivados de ALB408-423 que contenían delecciones N o C terminales de sustituciones de aminoácidos (Tabla 1) y se disolvieron los péptidos liofilizados en PBS. Se analizó la actividad antiviral en células T2M-bl utilizando VIH-1 trópico X4 NL4-3 tal como se ha descrito (Ejemplo 4). Las delecciones N terminales de ALB408-423 (409-423, 410-423, 411-423, 412-423, 413-423, 414-423, 415-423) deterioraron gravemente o anularon la actividad antiviral lo que indica que la leucina N terminal Leucina (L408) es crucial para la inhibición mediada por ALB408-423 de VIH-1 trópico X4 (Fig. 5 y Fig. 6).

Figura 5. Actividades antivirales de derivados de ALB. Se infectaron células T2M-bl que contenían diluciones en serie de derivados de ALB con VIH-1 trópico X4 NL4-3. Al cabo de 2 días se determinaron los índices de infección por ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios derivados de infecciones por triplicado en relación con muestras que no contenían péptido (índice de infección = 100%).

Figura 6. Actividades antivirales de derivados de ALB. Se infectaron diluciones en serie de derivados de ALB que contenían células T2M-bl con VIH-1 trópico X4 NL4-3. Al cabo de 2 días, se determinaron los índices de infección por ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios derivados de infecciones por triplicado en relación con muestras que no contenían péptido (índice de infección = 100 %).

Los derivados de ALB408-423 que contenían truncamientos de hasta 8 restos de aminoácidos en el término C (408-422, 408-421, 408-420, 408-419, 408-418, 408-417, 408-416, 408-415, 408-414, 408-413) permanecieron activos en el bloqueo de infección VIH-1 trópico X4 (Fig. 5 y 6, Tabla 1). Otras delecciones en el término C (408-414 y 408-413), sin embargo, tuvieron como resultado péptidos inactivos (valores IC₅₀ > 50 µM) (Fig. 6). Cabe destacar que la

variante de delección C terminal ALB408-419 bloqueó la infección VIH-1 trópico X4 más eficazmente que ALB408-423 de tipo silvestre ($4,4 \pm 1,0$ frente a $7,6 \pm 1,2$; valores IC_{50} medios (μM) $\pm$ sem) (Tabla 1; Fig. 5, 6, 7 y 8).

Figura. 7. Actividades antivirales de derivados de ALB. Se infectaron diluciones en serie de derivados ALB que contenían células TZM-bl con VIH-1 trópico X4 NL4-3. Al cabo de 2 días se determinaron los índices de infección por ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios derivados de infecciones por triplicado en relación con muestras que no contenían péptido (índice de infección = 100 %).

Figura 8. Actividades antivirales de derivados de ALB. Se infectaron diluciones en serie de derivados ALB que contenían células TZM-bl con VIH-1 trópico X4 NL4-3. Al cabo de 2 días se determinaron los índices de infección por ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios derivados de infecciones por triplicado en relación con muestras que no contenían péptido (índice de infección = 100 %).

Como solamente los 8 restos de aminoácidos que abarca el derivado ALB408-415 presentaron una potente actividad antiviral ($17,4 \pm 6,5$), se llevó a cabo una exploración de alanina sintetizando y sometiendo a ensayo derivados de ALB408-415 que contenían sustituciones de aminoácido específicas (Tabla 1). Los datos que se muestran en Fig. 7 y la Tabla 1 demuestran que la mayoría de las sustituciones perjudicaron la actividad de ALB408-415. En particular Arginina 410 (ALB-R410A, $IC_{50} > 1000 \mu M$ frente a ALB408-415; $17,4 \pm 6,5$) desempeña un importante papel en la inhibición de VIH-1 (Fig. 7, Tabla 1). La sustitución de Treonina 412 por Alanina (ALB-T412A) tuvo como resultado un péptido con una actividad antiviral moderadamente incrementada ($11,2 \pm 0,1$) (Fig. 7 y Tabla 1).

Para elucidar mejor el papel de Leucina N terminal (L408) en cuanto a la actividad antiviral de ALB408-419, se reemplazó este resto por Fenilalanina (F), Alanina (A), Glicina (G) o Isoleucina (I). Los ensayos de inhibición de VIH-1 revelaron que la mayoría de las sustituciones en el término N tuvieron como resultado péptidos inactivos (ALB408F-419, ALB408A-419 y ALB408G-419) (Fig. 8). Sin embargo, el intercambio homólogo a Isoleucina (ALB L408I-419) tuvo como resultado un péptido con una actividad antiviral moderadamente incrementada ($1,55 \pm 1,2$) (Fig. 8). Una Leucina adicional en el término N de ALB408-419 (407-419) redujo su actividad antiviral (Fig. 8).

En conjunto, los análisis SAR permitieron identificar derivados de ALB truncados con una mayor actividad antiviral y demostró que, en contraste con el término C, la parte terminal N es crucial para la inhibición de infección VIH-1 trópico X4 mediada por ALB408-423.

Ejemplo 7:

Ninguno de los derivados ALB es citotóxico

Para valorar los posibles efectos citotóxicos de variantes de ALB, se incubaron 5×10^3 células TZM-bl con concentraciones crecientes de los péptidos que ejercieron la actividad antiviral más potente (Tabla 1 y Fig. 9) durante 3 días. Se determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, #G7571) según las recomendaciones del fabricante. Este ensayo basado en la luminiscencia mide el número de células viables sobre la base de la cantidad de ATP intracelular. Se registraron los datos utilizando un luminómetro 10 minutos después de la adición de reactivo. Las actividades de luminiscencia derivadas de células incubadas con PBS solamente fueron establecidas en 100 %. Los resultados que se presentan en la Fig. 9 muestran claramente que ninguno de los derivados de ALB sometidos a ensayo presentó efectos citotóxicos a concentraciones de hasta $300 \mu M$.

Figura 9. Ensayo de citotoxicidad de derivados de ALB. Se añadieron diluciones en serie de derivados de ALB a células TZM-bl. Al cabo de 2 días, se midieron los niveles de ATP celular utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo. Los valores se derivaron de medidas por triplicado. Se calculó el % del índice de vitalidad en relación con los niveles de ATP en PBS (sin péptido) que contiene células (100 %).

Ejemplo 8:

Actividad antiviral de ALB408-423 y los derivados más potentes

Para investigar el efecto de los péptidos ALB más activos sobre varios clones de VIH-1, se generaron virus de diferente uso de co-recetor por transfección de linfocitos T 293 con plásmidos provirales (Papkalla y col., J. Virol. 76: 8455-9, 2002). Se titularon primero reservas de virus sobre células TZM-bl. A continuación, se infectaron células TZM-bl que contenían 100 mM de péptidos con cantidades de trópico dual X4 de infectividad normalizada (X4/R5) o VIH-1 trópico R5. Se determinaron los índices de infección tal como se ha descrito (Ejemplo 4) lo que demuestra que ALB408-423 de tipo silvestre, ALB408-419 truncado C terminal y las variantes de ALB L408I-419, así como ALB-T412A bloquearon la infección de todos los clones de VIH-1 trópico X4 analizados (NL4-3, P51-Sc, P34-s) casi completamente (Fig. 10). Los péptidos no tuvieron efecto sobre la infección de VIH-1 trópico R5 e inhibieron la infección de células TZM-bl a través del clon VIH-1 trópico dual 92ht593.1 tan solo moderadamente. Estos datos demuestran que las variantes de ALB con una mayor actividad antiviral (en comparación con ALB408-423) (Tabla 1) son también inhibidores de un amplio espectro de variantes de VIH-1 trópico X4.

Figura 10. ALB408-423 y los derivados de ALB truncados bloquean específicamente la infección VIH-1 trópico X4. Se infectaron células TZM-bl que contenían o bien PBS o bien 100 mM de los péptidos indicados con clones VIH-1 dualtrópico X4 o R5 de infectividad normalizada. Se midieron los índices de infección 2 días después de la infección utilizando el ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios (% de control tratado con PBS) $\pm$ desviaciones típicas derivadas de las mediciones por triplicado.

Ejemplo 9:

ALB408-423, ALB408-419 y ALB L408I-419 bloquean la infección VIH-1 trópico X4 y replicación en PBMC.

Para analizar el efecto de ALB408-423 y sus derivados en células primarias pertinentes, se aislaron células mononucleares de sangre periférica de un revestimiento de Buffy, derivada de DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen utilizando centrifugado de densidad Ficoll. Se estimularon 1×10^6 PBMC por ml con $1 \mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA, Oxoid, #3085280) y 10 ng/ml de interleuquina 2 (IL-2, Strathmann, #9511192) durante tres días. A continuación, se aglomeraron las células y se resuspendieron en medio que contenía IL-2. Se sembraron $1,5 \times 10^5$ PBMC ($250 \mu\text{l}$) en placas de 96 pocillos, se añadieron péptidos y se infectaron las células con 50 pg/ml de antígeno p24 de VIH-1 trópico X4 NL4-3. Se tomaron los sobrenadantes que contenían virus de progenie el día 1, 3 y 6 tras la infección. Se midió la producción de virus según ELISA de antígeno p24 (SAIC-Frederick, Inc [AIDS & Cáncer virus program]). No se pudo detectar antígeno p24 en los sobrenadantes derivados el día 6 de las células que contenían $100 \mu\text{M}$ ALB408-423 y ALB L408I-419 y solamente niveles de p24 marginales en los sobrenadantes que contenían $100 \mu\text{M}$ ALB408-419 (Fig. 11). En presencia de $20 \mu\text{M}$ péptidos, se perjudicó gravemente la replicación del virus. Estos datos demuestran que ALB408-423 y sus dos derivados analizados bloquean la infección y la replicación de VIH-1 trópico X4 en células diana VIH natural.

Figura 11. ALB408-423 y sus derivados inhibe la infección de VIH-1 trópico X4 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se incubaron células con las concentraciones indicadas de ALB408-423 o variantes truncadas y se infectaron con VIH-1 trópico X4. Se analizaron los sobrenadantes obtenidos al cabo de 6 días por ELISA de p24. Se muestra la media de los valores de antígeno p24 (ng/ml) derivados de infecciones por triplicado $\pm$ desviación típica.

Ejemplo 10.

Péptido ALB 408-423 inhibe la unión de CXCL12 a CXCR4.

Para determinar la capacidad de ALB 408-423 de inhibir la unión de quimioquina CXCL12 a su receptor, CXCR4, se llevó a cabo un ensayo de unión fluorescente en células vivas completas tal como se ha descrito anteriormente (Valenzuela-Fernández, y col.; 2001, JBC 276:26550-26558). Se transfecta establemente el receptor CXCR4 en células embrionarias de riñón humanas (HEK) como proteína de fusión con la proteína fluorescente EGFP fusionada con la parte amino terminal extracelular del receptor (EGFPCXCR4). Se sintetizaron las quimioquinas humanas CXCL12 y CXCL12-rojo de Texas, tal como se ha descrito (Amara y col., 1999, JBC 274:23916-23925; Valenzuela-Fernández, y col., 2001, JBC 276:26550-26558). Se llevó a cabo el seguimiento de la fluorescencia en tiempo real de las interacciones ligando-receptor del siguiente modo: se recogieron células HEK293 que expresan el receptor de fusión, EGFP-hCXCR4, en solución salina tamponada con fosfato suplementada con 5 mM EDTA, pH 7,4, se centrifugaron y se resuspendieron en tampón HEPES-albúmina de suero bovino (10 mM HEPES, $137,5 \text{ mM}$ NaCl, $1,25 \text{ mM}$ MgCl_2 , $1,25 \text{ mM}$ CaCl_2 , 6 mM KCl, 10 mM glucosa, $0,4 \text{ mM}$ NaH_2PO_4 , 1% albúmina de suero bovino (p/v), pH 7,4) suplementado con inhibidores de proteasa (40 mg/ml bestatina y bacitracina, $20 \mu\text{g/ml}$ fosforamidón, $50 \mu\text{g/ml}$ quimiostatina y $1 \mu\text{g/ml}$ leupeptina). Se llevaron a cabo los experimentos sobre células suspendidas en tampón HEPES-BSA (normalmente a 10^6 células/ml). Se llevaron a cabo los registros según el tiempo de la fluorescencia emitida a 510 nm (excitación a 470 nm) a 21°C utilizando un espectrofluorímetro (fluorolog 2, Spex) y se extrajeron muestras cada $0,3 \text{ s}$. Se iniciaron las mediciones de la unión de fluorescencia añadiendo a 30 segundos 100 nM de CXCL12-TR a 1 ml de suspensión celular. Para los experimentos de competición, se pre-incubaron células que expresan EGFP-CXCR4 durante 10 minutos en ausencia o presencia de diversas concentraciones del competidor. A continuación, se añadió CXCL12-TR (100 nM) y se registró la fluorescencia hasta que se alcanzó un equilibrio (300 segundos). Se analizaron los datos utilizando un software Kaleidagraph 3.08 (Synergy Software, Reading, PA, Estados Unidos). Se detecta la asociación con CXCL12 fluorescente como un descenso de la emisión de fluorescencia de EGFP que resulta de la transferencia de energía al grupo rojo de Texas (TR) de CXCL12.

Se alcanza la saturación de unión de CXCL12 a concentraciones más allá de 300 nM y la constante de disociación de CXCL12 fluorescente para el receptor CXCR4 equivale a $55 \pm 15 \text{ nM}$ (Valenzuela-Fernández y col., (2001), JBC 276, 26550-26558), Hachet-Haas y col; (2008), JBC]. Las moléculas no marcadas que compiten con CXCL12 fluorescente impiden la disminución de la emisión de EGFP en función de la ocupación de sitios de receptor. La variación de intensidad de fluorescencia detectada se puede cuantificar (Palanche y col., (2001), JBC 276:34853-34861; Vollmer y col., 1999, JBC 274:37915-37922; Ilien y col., 2003, Neurochem 85:768-778) para derivar constantes de unión del competidor.

Los análisis demuestran que ALB408-423 impide dependiendo de la dosis la interacción de CXCL12-Tr con su receptor CXCR4 (Fig. 12). ALB408-423 presenta una constante de disociación (EC_{50}) igual a $8 \pm 3 \text{ mM}$, que

corresponde a un valor KI igual a 3 ± 1 mM. El valor de constante de disociación EC50 es similar a los valores IC₅₀ obtenidos en los ensayos de inhibición de VIH-1.

Figura 12. ALB408-423 inhibe la unión de CXCL12 a CXCR4. Se llevó a cabo el seguimiento de la fluorescencia en tiempo real de las interacciones ligando-receptor utilizando 293 células que expresan EGFP-hCXCR4. Se pre-incubaron las células durante 10 minutos en ausencia o presencia de diversas concentraciones de ALB408-423. A continuación, se añadió CXCL12-TR (100 nM) y se registró la fluorescencia hasta alcanzar el equilibrio (300 segundos). Se analizaron los datos utilizando un software Kaleidagraph 3.08 (Synergy Software, Reading, PA, Estados Unidos). Se muestran los valores medios $\pm$ la desviación típica obtenida de mediciones por triplicado en relación con las intensidades de fluorescencia de células tratadas con CXCL12-Tr solamente (100%).

Ejemplo 11. (Ejemplo de referencia)

El péptido ALB408-423 no induce la movilización de Ca²⁺ a través de CXCR4, CCR5 y CXCR4 e inhibe la respuesta celular del calcio evocada por CXCL12

Se investigó la capacidad de ALB408-423 de regular las respuestas celulares mediadas por CXCR4, CCR5 o CXCR1 en células HEK293on cargadas con indicador de calcio. Se llevó a cabo la medición de la liberación de Ca²⁺ intracelular tal como se ha descrito (Palanche y col., 2001, JBC 276:34853-34861; Vollmer y col., 1999, JBC 274:37915-37922) utilizando éster indo-1-acetoximetilo como sonda de calcio. Se registraron las respuestas celulares a 37°C en una cubeta de 1 ml con excitación ajustada a 355 nm y emisión ajustada a 405 nm y 475 nm utilizando un espectrofluorímetro. Se compraron las quimioquinas humanas CCL5 y CXCL8 de Becton Dickinson Biosciences (San José, CA). Los ensayos de movilización de Ca²⁺ utilizando CXCR4, CCR5 o CXCR1 que expresan células demuestran que los correspondientes agonistas de quimioquina CXCL12 (CXCR4), CCL5 (CCR5) y CXCL8 (CXCR1) inducen la movilización de Ca²⁺ (Fig. 13) mientras que ALB408-423 por sí mismo no induce ninguna respuesta de calcio y, por tanto, no presenta propiedades agonistas de CXCR4, CCR5 y CXCR1 (Fig. 13).

Figura 13. ALB408-423 no es un agonista de CXCR4, CCR5 o CXCR1. Se trataron células HEK293 que expresan los receptores de quimioquina indicados con las correspondientes quimioquinas [10 nM CXCL12 (CXCR4); 20 nM CCL5 (CCR5) o 50 nM CXCL8 (CXCR1)] o 50 μ M ALB408-423. Se midieron las respuestas Ca²⁺ intracelular utilizando un espectrofluorímetro. Se muestran las intensidades de fluorescencia obtenidas tras el tratamiento con ALB408-423 en relación con las medidas para la quimioquina correspondiente (100 %).

Figura 14. ALB408-423 inhibe específicamente la movilización de Ca²⁺ evocada por CXCL12 en células que expresan CXCR4. A) Inhibición dependiendo de la dosis de liberación de Ca²⁺ intracelular mediada por CXCL12 a través de ALB408-423. B) ALB408-423 no tiene efecto en las respuestas del calcio evocadas por CCL5 en células HEK CCR5 o las respuestas evocadas por CXCL8 en células HEK EGFP-CXCR1. Barras negras: quimioquina correspondiente solamente; barras grises: quimioquina correspondiente y 50 μ M ALB408-423. Los valores mostrados son las respuestas al calcio máximas de experimentos por duplicado en relación con células tratadas con quimioquina solamente (100 %).

En relación con la figura, para averiguar si ALB408-423 tiene propiedades antagonistas de CXCR4 o no, se analizó el efecto de ALB408-423 en la unión del agonista de CXCL12 para el receptor CXCR4. Para ello, se incubaron células que expresan CXCR4 con varias concentraciones de ALB408-423 y después se trataron con CXCL12. Se registraron las respuestas de Ca²⁺. Los datos que se muestran en la Fig. 14A demuestran que ALB408-423 inhibe las respuestas de calcio evocadas por CXCL12 dependiendo de la dosis y con una constante de inhibición aparente de 85 μ M. Para examinar la selectividad del compuesto, a continuación, se caracterizó el efecto del péptido sobre las respuestas del calcio de varios pares quimioquina/receptor. En correspondencia con los datos de la Fig. 14A, 50 μ M del péptido inhibe un 70 % de las respuestas de calcio evocadas por CXCL12 en células HEK EGFP-CXCR4 (Fig. 14B). En contraposición, no tiene efecto en las respuestas del calcio evocadas por CCL5 en células HEK CCR5 o las respuestas evocadas por CXCL8 en células HEK EGFP-CXCR1 (Fig. 14B). Estos resultados corroboran la idea de que el péptido presenta selectividad para el receptor CXCR4 y su agonista de CXCR4.

Ejemplo 12 (Ejemplo de referencia)

ALB408-423 inhibe la internalización CXCR4 evocada por CXCL12

Tras la estimulación con la quimioquina apropiada, varios receptores acoplados a proteína G se internalizaron microcavidades revestidas con clatrina. Como antagonista de las respuestas de CXCR4, ALB 408-423 también puede alterar la internalización de receptor CXCR4 inducida por quimioquina. Para analizar las propiedades antagonistas de ALB408-423 en la internalización de CXCR4 mediada por CXCL12, se dividieron células que expresan receptor EGFP-CXCR4 y se cultivaron durante 2 días en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de 12 mm con colágeno de tipo I de rata. A continuación, se incubaron las células durante periodos comprendidos entre 0 y 30 min en tampón HEPES-BSA suplementado con inhibidores de proteasa que contenían 100 nM CXCL12 o 50 μ M de ALB408-423 o 100 nM CXCL12 más 50 μ M de ALB408-423 a 37 °C. Se detuvo la internalización colocando las células sobre hielo y lavándolas inmediatamente después con tampón HEPES-BSA enfriado con hielo. A continuación se fijaron las células en 4 % de paraformaldehído en PBS durante 15 min a 4 °C y se incubó durante 15 minutos en NH₄Cl 50 mM. Se montaron los cubreobjetos en portaobjetos de microscopio utilizando un agente anti-

desvanecimiento, Möviol (Calbiochem), mantenido a temperatura ambiente durante 24 horas y después se almacenó a 20°C. A continuación, se analizaron las células con un microscopio invertido (Leica) y un sistema de procesamiento de imágenes confocal de exploración por láser (Leica AOBSP2 MP) utilizando un objetivo HCX PL APO lbd. BL 63 X 1,40 OIL UV (n°506192). Se ajustó el zoom electrónico a 3, la burbuja ocluida fue 1 Airy y el tamaño de pixel resultante fue 0,154 µm. Se excitó EGFP con la línea de láser de 488 nm del láser Argón y se detectó y se amplificó a través de un tubo fotomultiplicador (PMT) en el llamado canal mCFP de 495 a 550 nm (PMT1 610 High Voltage -HV-, offset 0). Para obtener una buena relación señal-ruido, se promediaron las imágenes de 4 adquisiciones consecutivas.

Figura 15. ALB408-423 bloquea la internalización de CXCR4 mediada por CXCL12. Se llevó un seguimiento de la endocitosis del receptor en células HEK que expresan EGFP-CXCR4 y se analizaron con un microscopio confocal inmediatamente (0 minutos, panel superior) tras la adición de CXCL12, ALB408-423 o ambos compuestos o 30 minutos más tarde (panel inferior). Al cabo de 30 minutos, las células tratadas con CXCL12 internalizaron CXCR4. En presencia de ALB408-423, se anula la internalización del receptor mediada por CXCL12.

Las imágenes confocales muestran que 30 minutos de tratamiento a 37 °C con 100 nM CXCL12 tuvo como resultado la internalización de EGFP-CXCR4 en la periferia de la célula y las estructuras vesiculares (Fig. 15). Según lo esperado, ALB408-423 en solitario no indujo la internalización del receptor, sino que bloqueó la internalización de CXCR4 mediada por CXCL12 (Fig. 15) ya que la mayor parte de la fluorescencia permaneció en la superficie de la célula. Este resultado proporciona una prueba más de que ALB408-423 actúa como antagonista en el receptor CXCR4.

Ejemplo 13 (Ejemplo de referencia)

ALB408-423 bloquea el desplazamiento de linfocitos T Jurkat mediado por CXCL-12

La señalización CXCL12-CXCR4 desempeña un papel crucial en varias enfermedades como VIH/SIDA, cáncer, leucemia y artritis. Los órganos, tejidos o células que expresan CXCL12 pueden atraer células de tumor que expresan CXCR4 y dar cabida a la metástasis. Para investigar si ALB408-423 es capaz de inhibir el desplazamiento de células de tumor mediado por CXCL12, se llevaron a cabo ensayos de desplazamiento utilizando linfocitos T de Jurkat que expresan CXCR4 como sistema de modelo (Princen y col., 2004, J.Virol. 78: 12996-13006). Se suspendieron linfocitos T Jurkat, $0,4 \times 10^6$ (200 µl) en un medio que contenía 10 % FBS, a continuación se añadió la suspensión de células (200 µl) al compartimento superior de dispositivos de filtro de poro de 5 µm (Transwell, cultivo de células en 24 pocillos, Costar). A continuación, se añadieron 600 µl de medio de cultivo con o sin CXCL12 (100 ng/ml) al compartimento inferior permitiendo la atracción de células desde el compartimento superior. Para estudiar los efectos de inhibición sobre el desplazamiento linfocitos T Jurkat inducido por CXCL12, se mezcló CXCL12 en el compartimento inferior con varias concentraciones de ALB 408-423. Se incubaron las placas de cultivo celular durante 2 horas en una incubadora de cultivo celular a 37 °C. Tras la incubación, se separaron las placas y o bien se hizo el recuento directamente utilizando una cámara de recuento o bien se analizaron utilizando un ensayo de proliferación CellTiter-Glo® Reagent, Promega) según las instrucciones del fabricante de 100 µl de células que se desplazaron al compartimento inferior. El ensayo de proliferación mide los niveles ATP intracelular que son directamente proporcionales al número de células (no se muestran los datos). Los datos que se muestran en la Fig. 16 demuestran que ALB408-423 inhibe dependiendo de la dosis el desplazamiento de linfocitos T Jurkat mediado por CXCL12. A altas concentraciones (360 µg/ml) ALB408-423 bloqueó el desplazamiento de células inducido por CXCL12 casi completamente, se observaron índices comparables en ausencia de cualquier péptido (sin CXCL12, sin ALB408-423). Estos datos demuestran que el antagonista de CXCR4, ALB408-423, puede inhibir la atracción de células de tumor mediada por CXCL12.

Figura 16. ALB408-423 bloquea dependiendo de la dosis el desplazamiento de linfocitos T Jurkat mediado por CXCL-12. Se añadieron linfocitos T Jurkat al compartimento superior de dispositivos de pocillos transversales con filtros de poro de 5 µm. A continuación, se añadieron PBS, agonista de CXCR4 CXCL12 (100 nM) o diluciones en serie de ALB408-423 al compartimento inferior de la placa de cultivo de células. Al cabo de 2 horas de incubación a 37 °C, se detectó el número de células desplazadas en el compartimento inferior midiendo los niveles de ATP intracelular utilizando el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega). Todos los valores representan el número medio de células desplazadas en relación con las células tratadas con CXCL12 solamente (100% desplazamiento) de un experimento por triplicado $\pm$ 6 desviación típica.

Ejemplo 14 (Ejemplo de referencia)

La unión de ALB408-423 a CXCR4 depende de la integridad de aminoácido N-terminal

Para identificar regiones en ALB408-423 que median la unión a CXCR4 y por tanto que bloquean la infección VIH-1 trópico X4 y la unión de CXCL12, se analizó el efecto de varios derivados de ALB408-423 (véase la Tabla 1) sobre la movilización de Ca^{2+} inducida por CXCL12 y la unión de CXCL12-Tr. Para los detalles del experimento, consultar los ejemplos x e y. Tal como se muestra en la Figura 17A y B, ALB409-423 que carece de Leucina N terminal no inhibió las respuestas de Ca^{2+} mediadas por CXCL12 o la unión de CXCL12-Tr al receptor CXCR4. Cabe destacar que ALB409-423 también es inactivo en el ensayo de inhibición de VIH-1 lo que indica que la incapacidad de ALB409-

423 de unirse a CXCR4 también supone la pérdida de actividad antiviral. En contraposición, todos los derivados ALB con truncamiento C terminal siguieron siendo capaces de interactuar con el receptor CXCR4 (Fig. 17A) y bloquearon la respuestas Ca^{2+} mediada por CXCL12 (Fig. 17B) y presentaron una constante de disociación cercana a la del péptido de tipo silvestre (30 μM), excepto para el más pequeño, 408-413, que tiene una menor afinidad para el receptor (> 200 μM) y es también ineficaz en gran medida para bloquear la infección VIH-1 trópico X4 (Fig. 6 y Tabla 1). En conjunto, estos datos demuestran que varios derivados ALB truncados C terminales son antagonistas de CXCR4 que son capaces de unirse a CXCR4 impidiendo así la unión y señalización de CXCL12 y o la infección VIH-1 trópico X4.

Figura 17. Actividades antagonistas de CXCR4 de derivados de ALB. A) fragmentos ALB inhiben la movilización de Ca^{2+} evocada por CXCL12 pero no CCL5. Se trataron células HEK293 que expresan CXCR4 o CCR5 con agonista de CXCR4 CXCL12 (10 nM) o agonista de CCR5 CCL5 (20 nM), respectivamente, en ausencia (sin ALB) o presencia de los derivados ALB indicados (50 μM). Se registraron las respuestas de calcio según se ha descrito. Los datos mostrados son los valores medios $\pm$ la desviación típica derivados de duplicados en relación con la respuesta de calcio máxima tras el tratamiento con agonistas solamente (100 %). B) Derivados de ALB anulan la unión de CXCL12 a CXCR4. Se trataron células HEK293 que expresan CXCR4 con CXCL12 marcado con rojo de Texas (CXCL12-Tr) en presencia o ausencia de péptidos ALB. Se llevó a cabo el seguimiento de fluorescencia en tiempo real de las interacciones ligando-receptor tal como se ha descrito. Se muestran los niveles de CXCL12-Tr en presencia de péptidos de ALB en relación con células tratadas solamente con CXCL12-Tr (100 % unidas). Los valores se derivaron de un experimento por duplicado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pharis Biotec GmbH

<120> Polipéptido antagonista de receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4)

<130> 081303WO

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
1 5 10

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 4

 Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 1 5 10

 10
 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 5

 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 1 5 10

 20
 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 6

 Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 1 5 10

 30
 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 1 5 10 15
 35
 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 8

 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 1 5 10 15
 45
 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 9

 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr
 1 5 10 15

ES 2 655 289 T3

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 10

 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro
 1 5 10

 10
 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 11

 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr
 1 5 10

 20
 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 12

 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
 1 5 10

 30
 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
 1 5 10

 35
 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 14

 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
 1 5 10

 45
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 15

ES 2 655 289 T3

		Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
		1 5
5	<210> 16 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 16	
10		Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
		1 5
15	<210> 17 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 17	
20		Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
		1 5
25	<210> 18 <211> 6 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 18	
30		Leu Val Arg Tyr Thr Lys
		1 5
35	<210> 19 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 19	
40		Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
		1 5
45	<210> 20 <211> 13 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 20	
		Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
		1 5 10
50	<210> 21 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	

<400> 21

Ile Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
1 5 10

5

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 22

Phe Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
1 5 10

15

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 23

Ala Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
1 5 10

25

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

30

Gly Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
1 5 10

35

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

40

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
1 5

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 26

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Ala
1 5

50

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

ES 2 655 289 T3

		Leu Val Arg Tyr Thr Lys Ala Val
		1 5
5	<210> 28	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 28	
10		Leu Val Arg Tyr Thr Ala Lys Val
		1 5
15	<210> 29	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 29	
20		Leu Val Arg Tyr Ala Lys Lys Val
		1 5
25	<210> 30	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 30	
30		Leu Val Arg Ala Thr Lys Lys Val
		1 5
35	<210> 31	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 31	
40		Leu Val Ala Tyr Thr Lys Lys Val
		1 5
45	<210> 32	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 32	
		Leu Ala Arg Tyr Thr Lys Lys Val
		1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos SEQ. ID. No 21
IVRYTKKVPQVS
y sus derivados amidados, acetilados, sulfatados, fosforilados y/o glicosilados.
- 5 2. Polinucleótidos que codifican el péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en particular polinucleótidos que están constituidos por ADN, ARN, ADN genómico o APN.
3. Un vector que contiene los polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Una célula hospedadora modificada por ingeniería genética que contiene el vector de acuerdo con la reivindicación 3.
- 10 5. Anticuerpos dirigidos contra el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
6. Una formulación galénica que consiste en el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo compatible.
7. Un proceso de preparación del péptido de acuerdo con la reivindicación 1 por síntesis en fase sólida en términos de síntesis de Merrifield o síntesis en fase líquida mediante procedimientos conocidos entre las personas especializadas empleando aminoácidos protegidos y su purificación, o mediante procedimientos de expresión heteróloga conocidos entre las personas especializadas empleando vectores biotecnológicos comunes.
- 15 8. Un agente de diagnóstico que contiene anticuerpos poli- o monoclonales de acuerdo con la reivindicación 5 o que contiene ácido nucleico o ARNm que codifica el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o que contiene el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2 para sistemas de ensayo para determinar los niveles en el tejido, plasma, orina y fluido cefalorraquídeo de dicha sustancia.
- 20 9. Un agente de diagnóstico que contiene el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 como marcadores para enfermedades víricas, infecciones bacterianas y fúngicas, procesos inflamatorios y neoplásicos y como marcadores en procesos inflamatorios, reacciones de inflamación alteradas, enfermedades tumorales, trastornos del crecimiento, enfermedades del sistema inmune y marcadores en enfermedades óseas.
- 25 10. Un medicamento que contiene el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 como principio activo de formas galénicas para administración oral, intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intratecal, y como aerosol para administración transpulmonar.
11. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y de los polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2 y de los anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 5 y de una formulación galénica de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de enfermedades víricas, especialmente VIH-1, VIH-2, citomegalovirus, virus herpes simplex (tipos 1 y 2), virus de la varicela zóster, virus de la hepatitis A y la hepatitis B, virus influenza, poliovirus, rinovirus, virus de la rubeola, virus del sarampión, virus de la rabia, virus de sarcoma de Rous, virus Epstein Barr y para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas, procesos inflamatorios, reacciones de inflamación alterada, enfermedades tumorales, trastornos del crecimiento, enfermedades neuronales, enfermedades de la coagulación de la sangre y hematopoyesis, enfermedades vasculares, enfermedades del sistema inmune y para la cicatrización de heridas y huesos.
- 30
- 35

Fig.1A

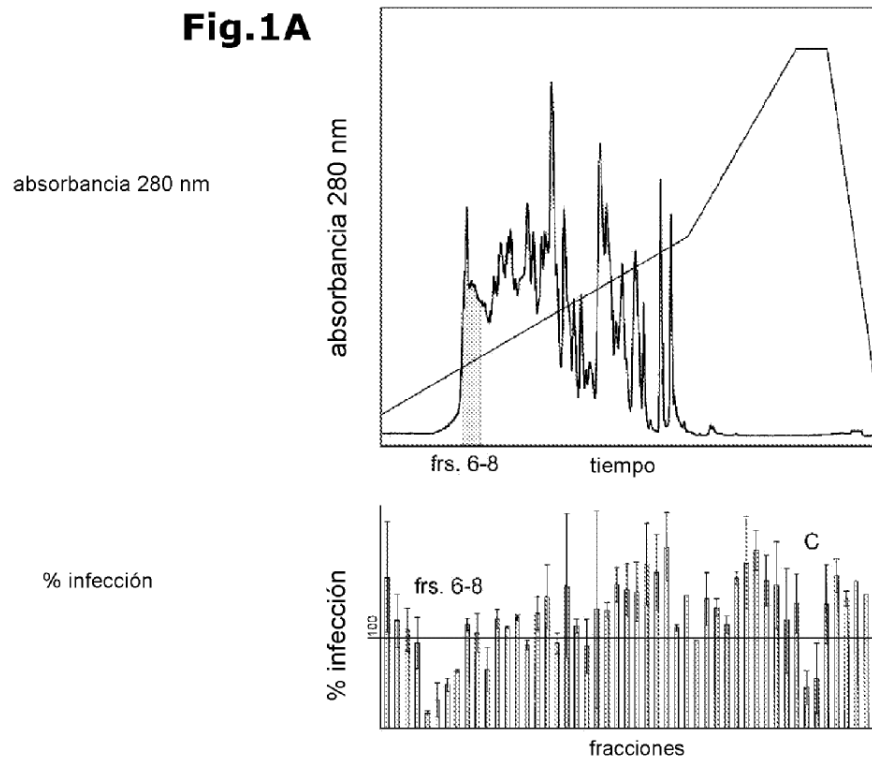


Fig.1B

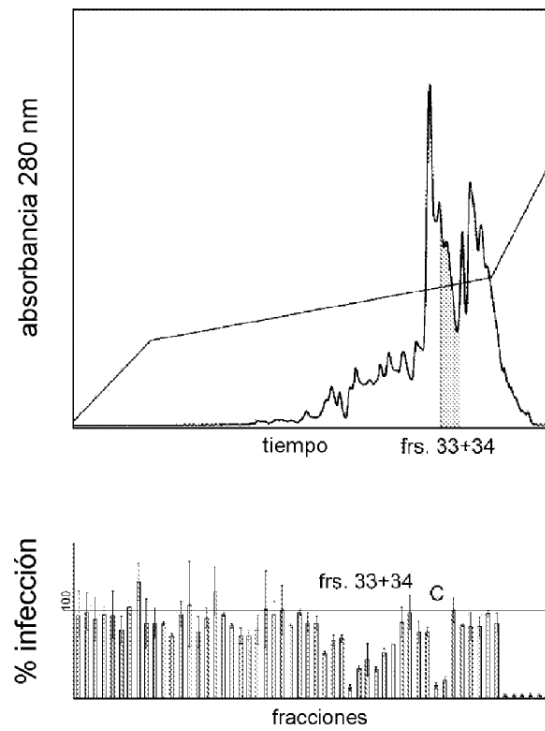


Fig.1C

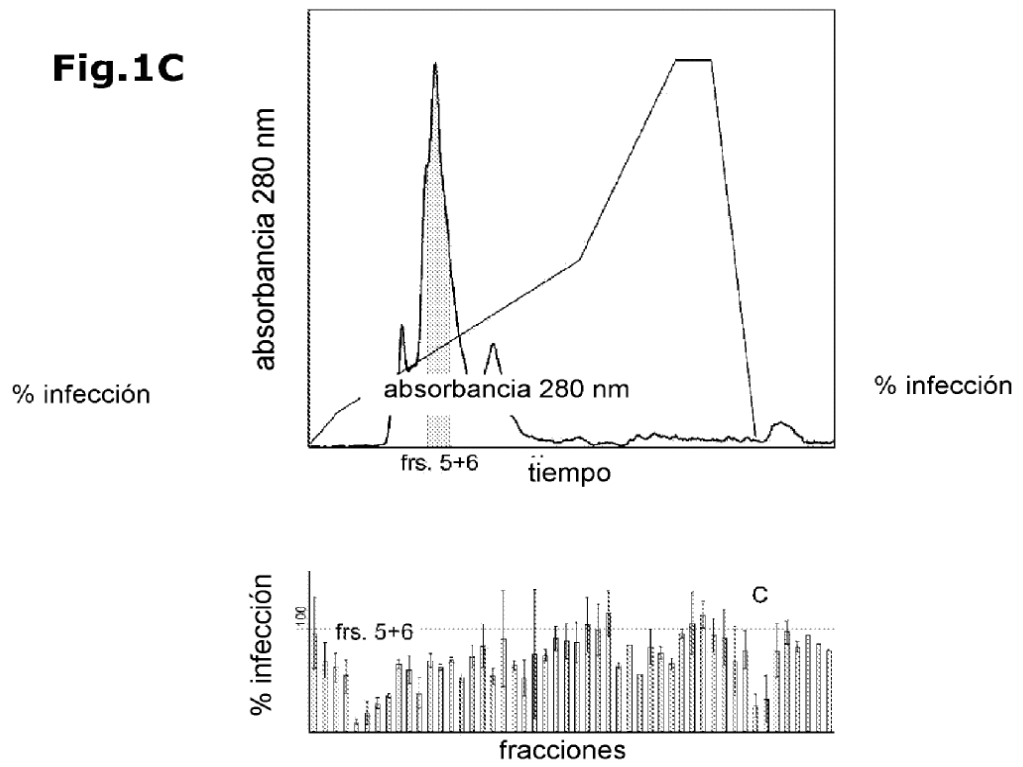


Fig.1D

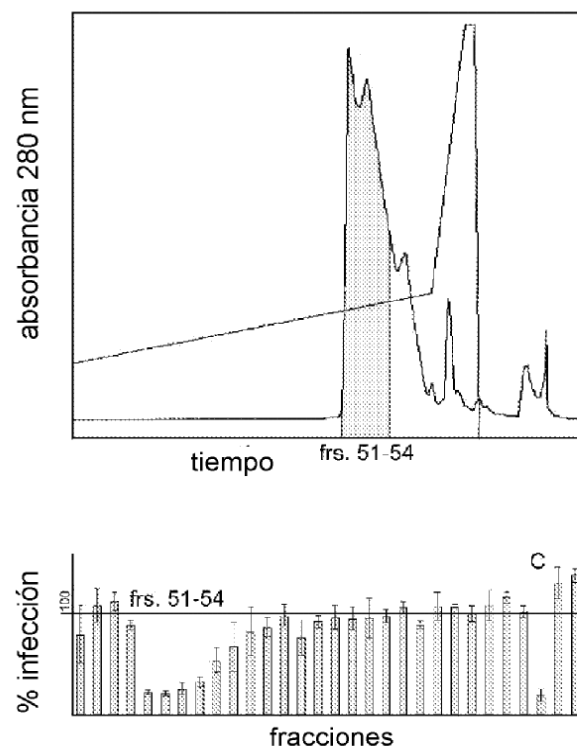


Fig.1E

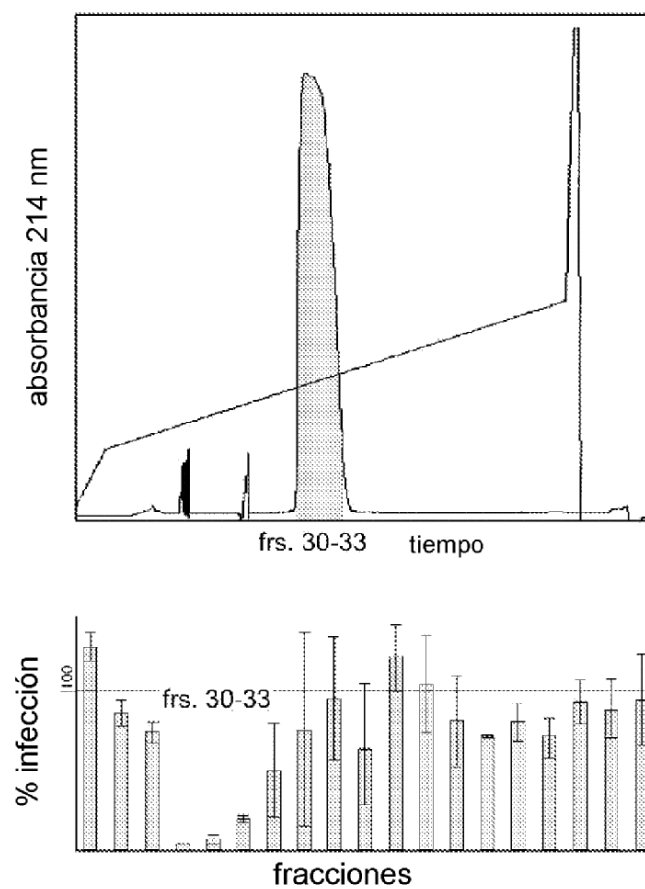
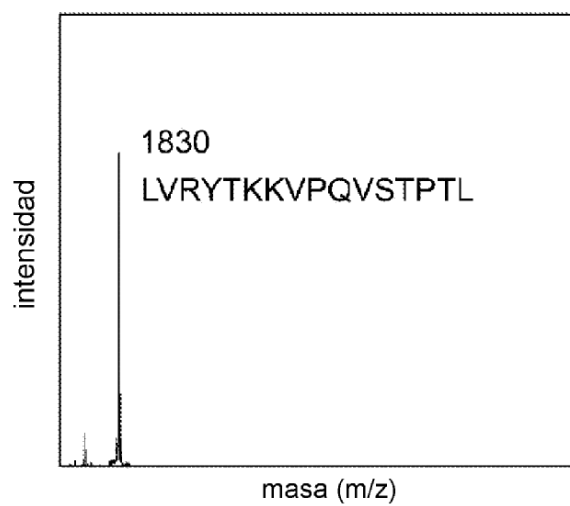


Fig.1F



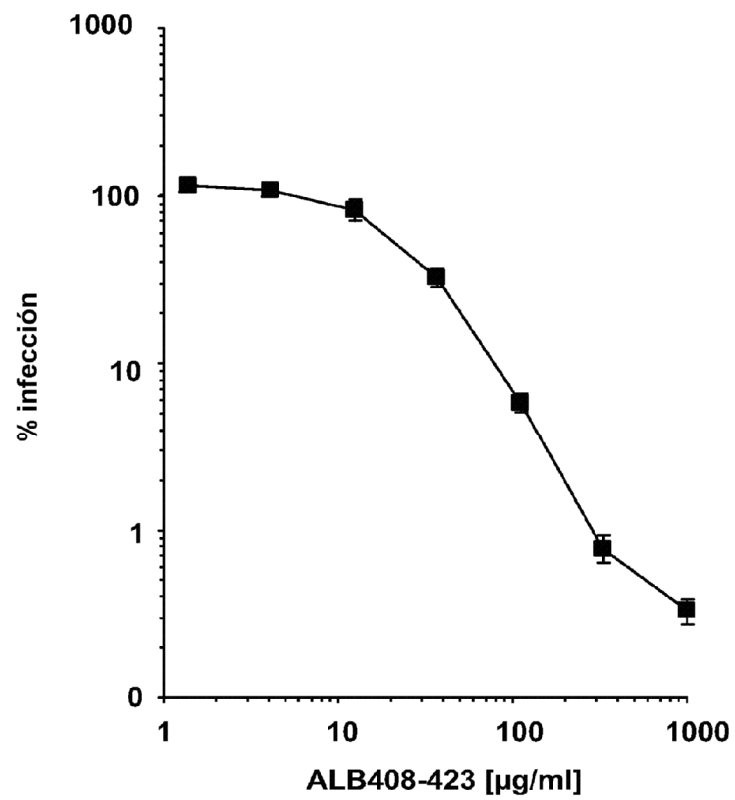


Fig.2

Fig.3B

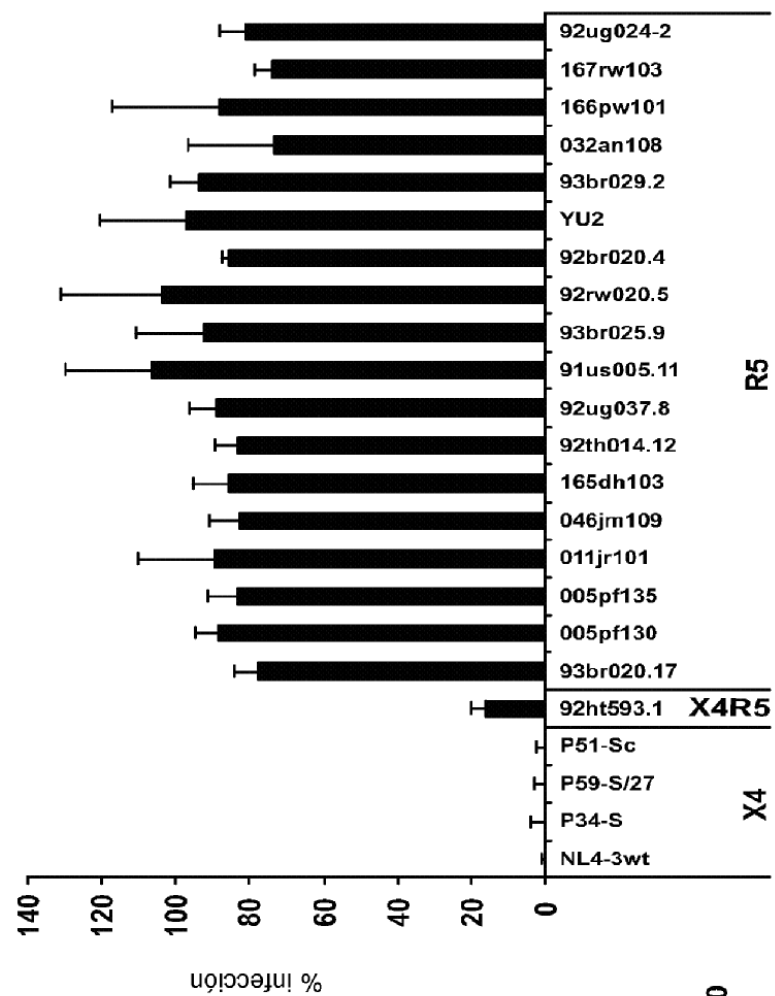


Fig.3A

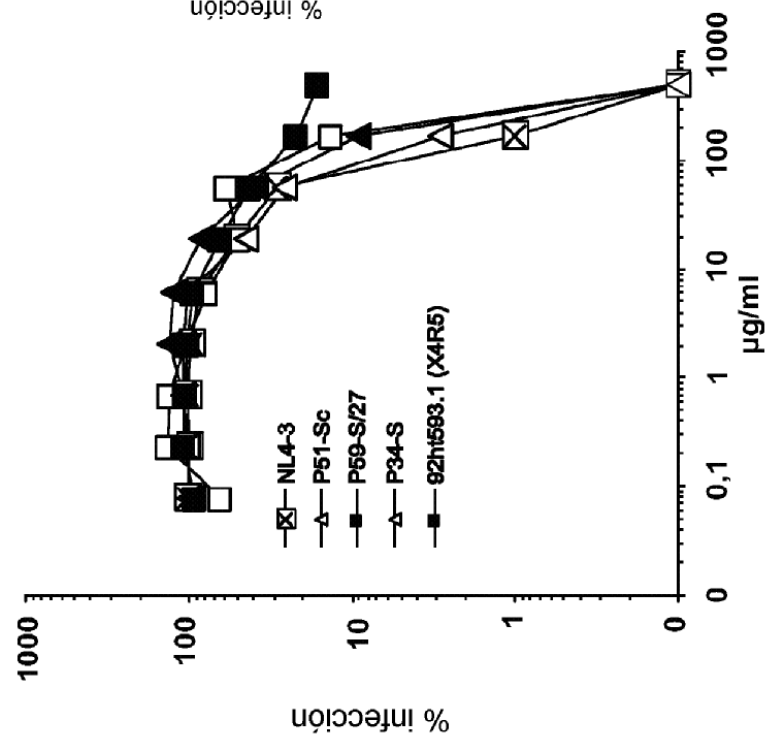


Fig.4

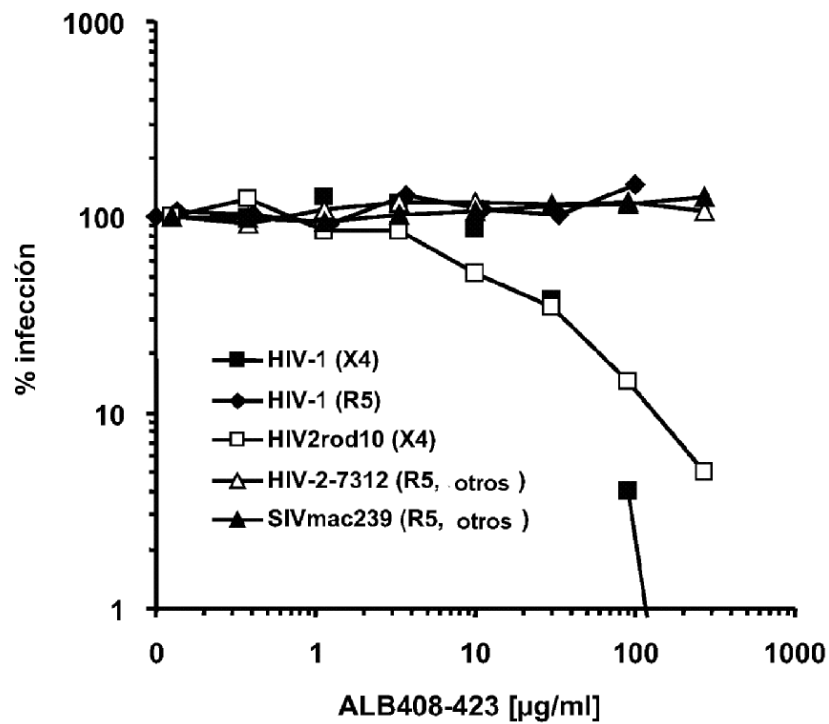


Fig.5

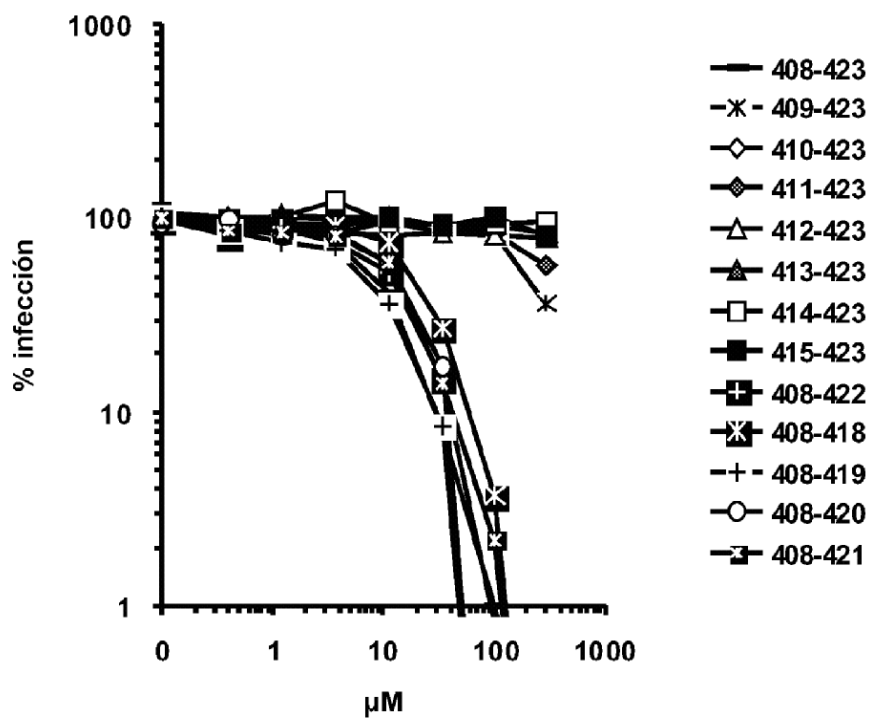


Fig.6

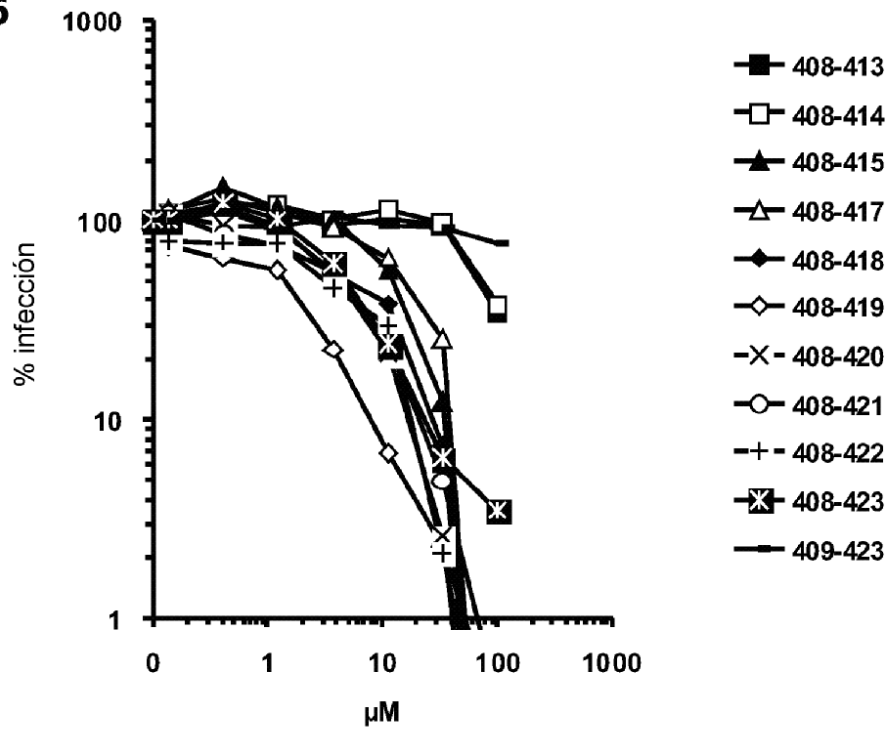


Fig.7

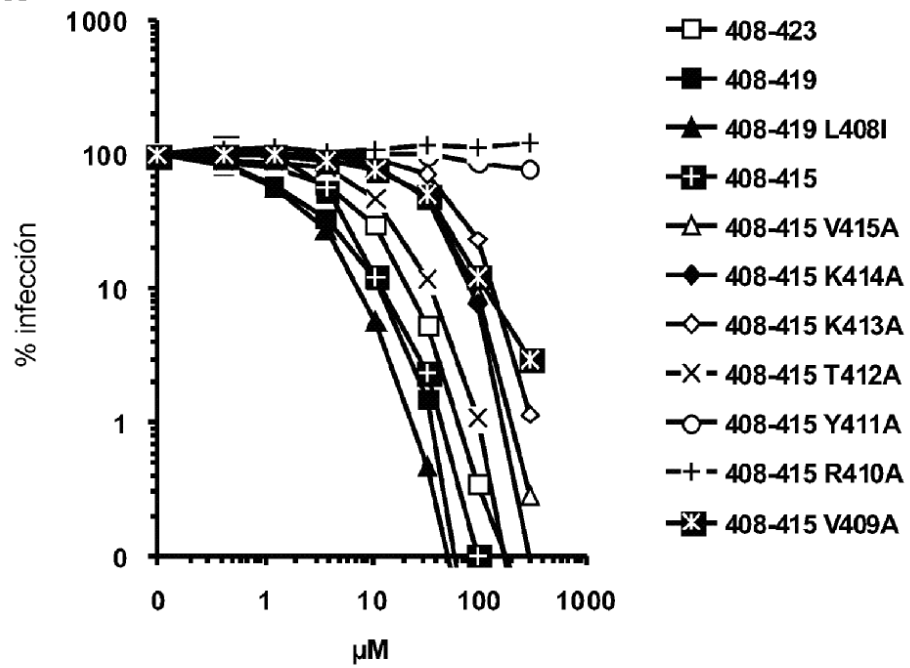
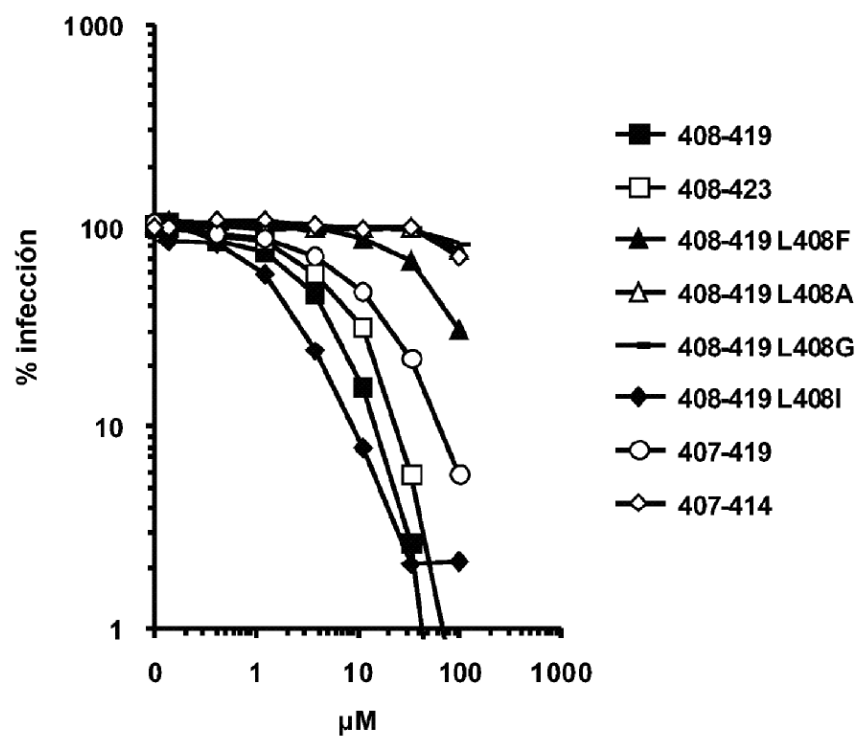
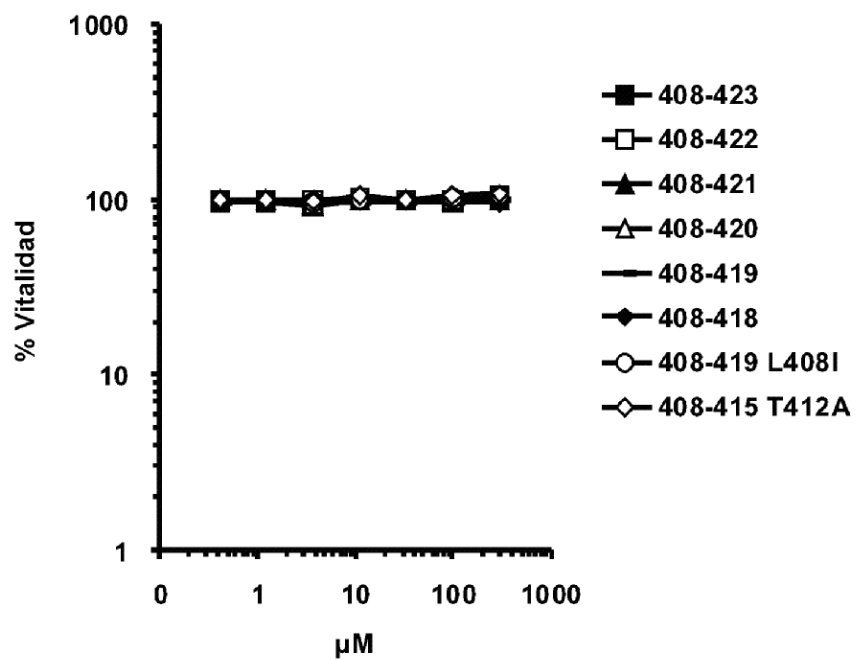


Fig.8**Fig.9**

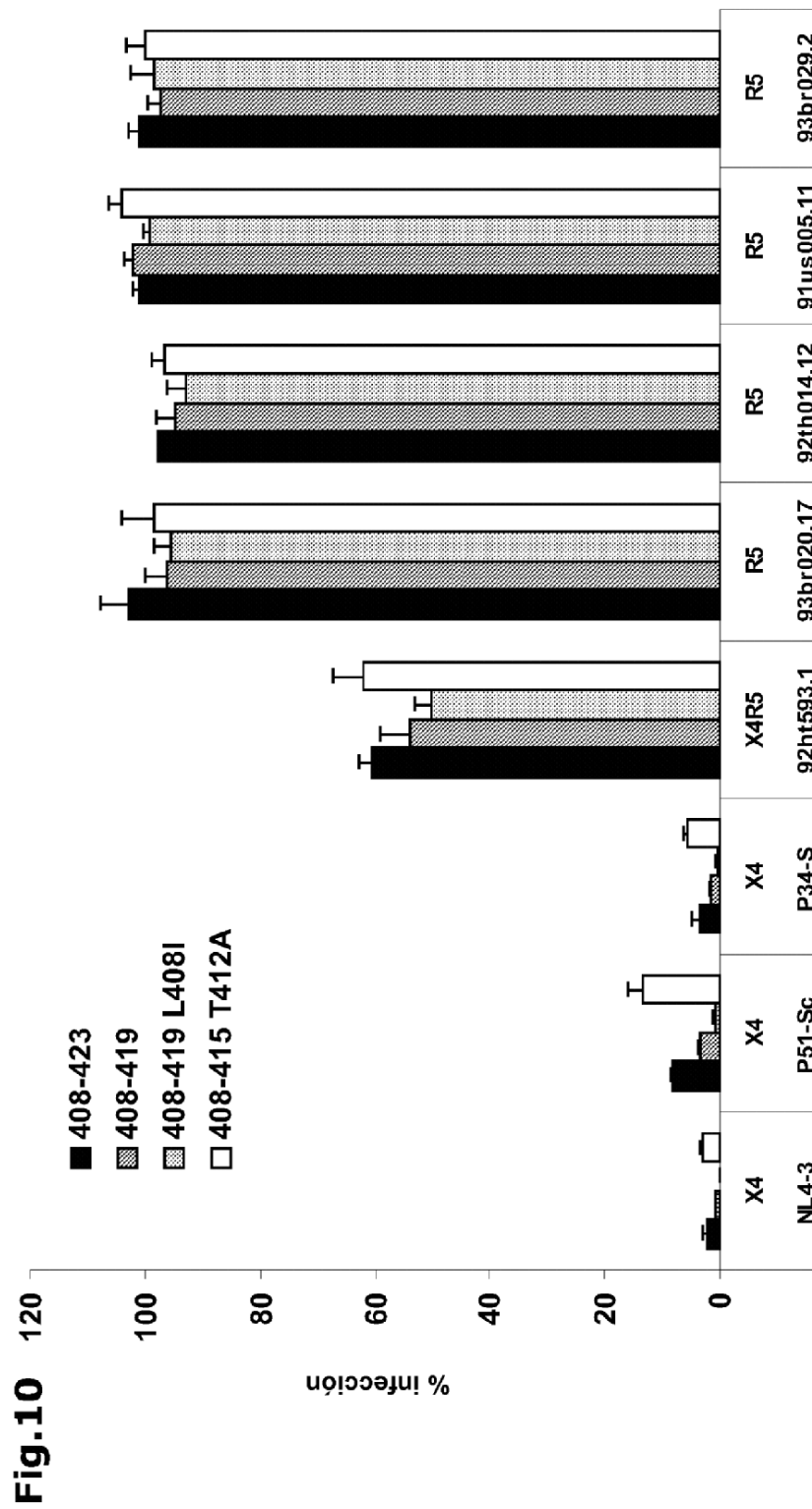


Fig.11

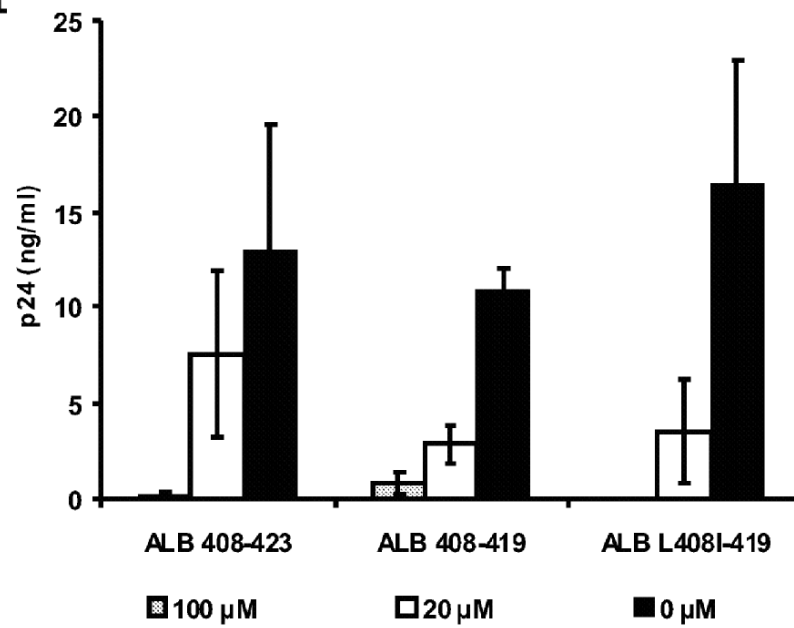
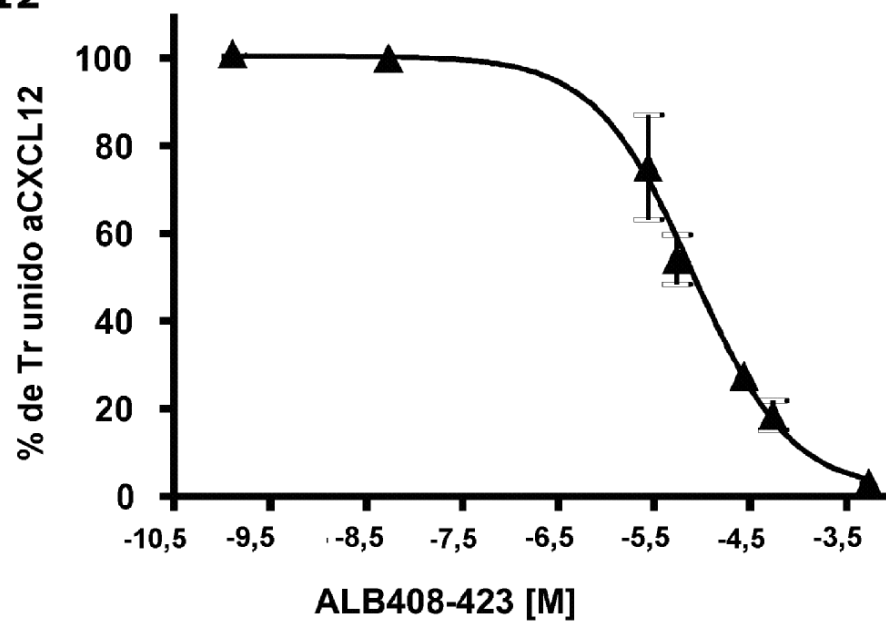


Fig.12



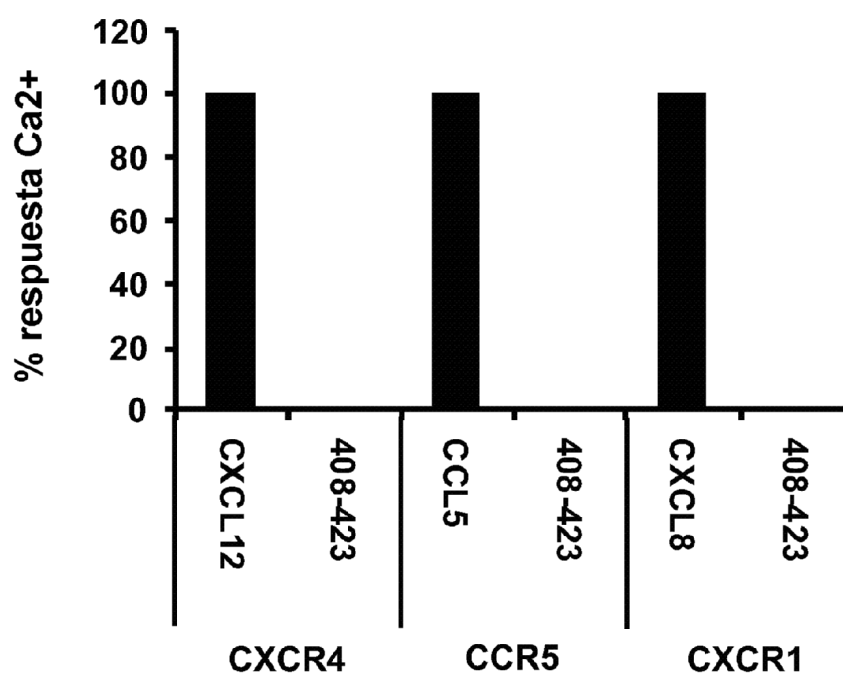


Fig.13

Fig.14A

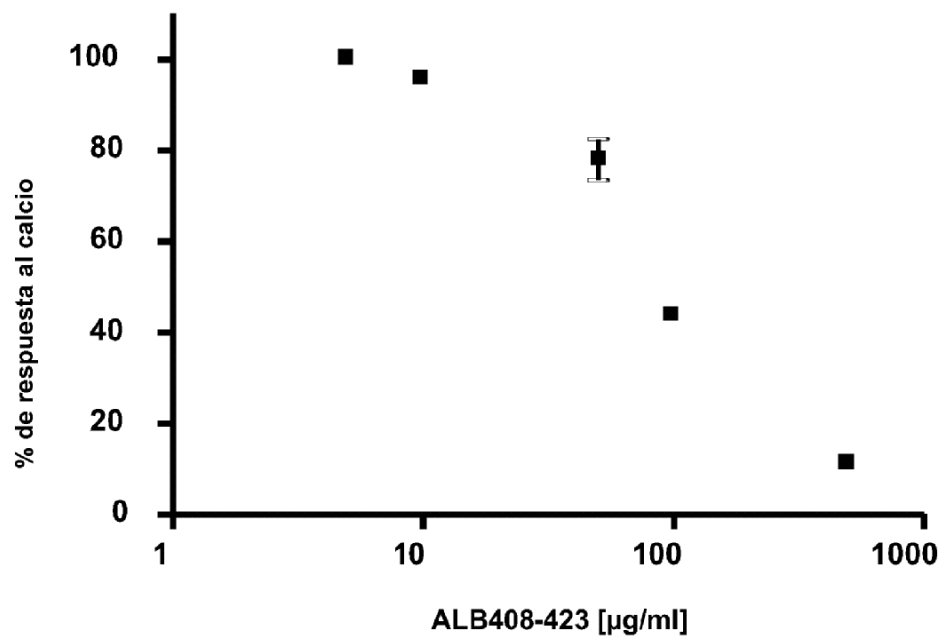


Fig.14B

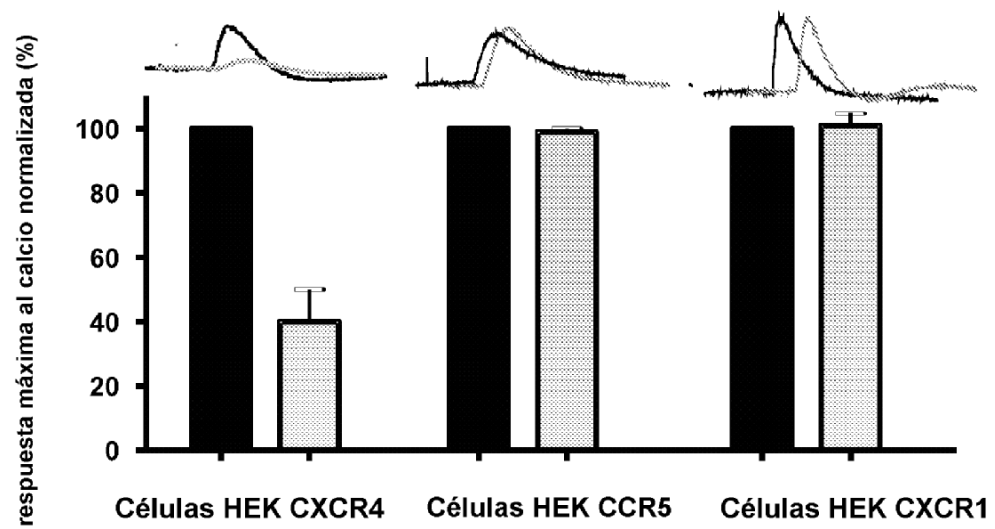


Fig.15

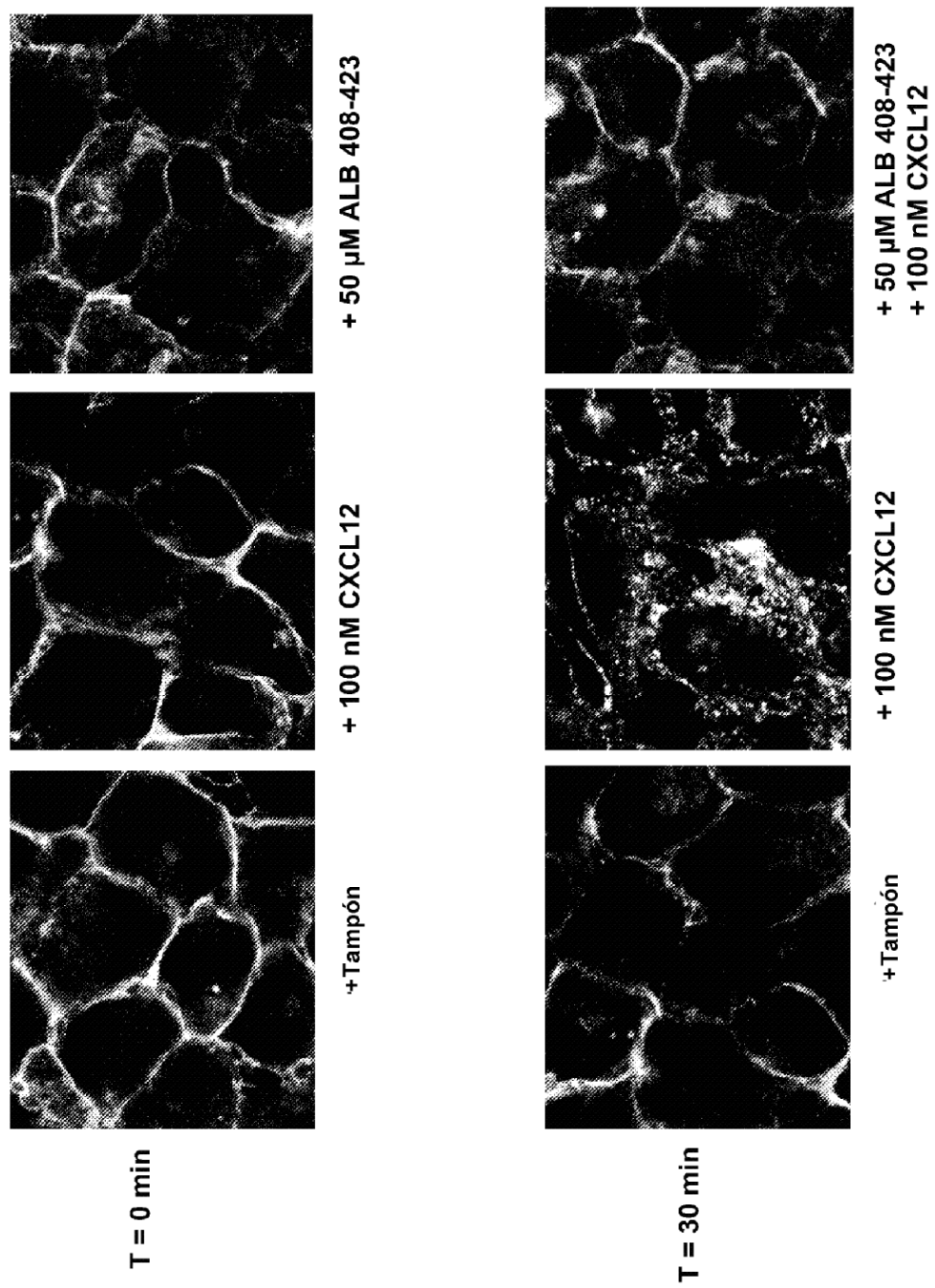


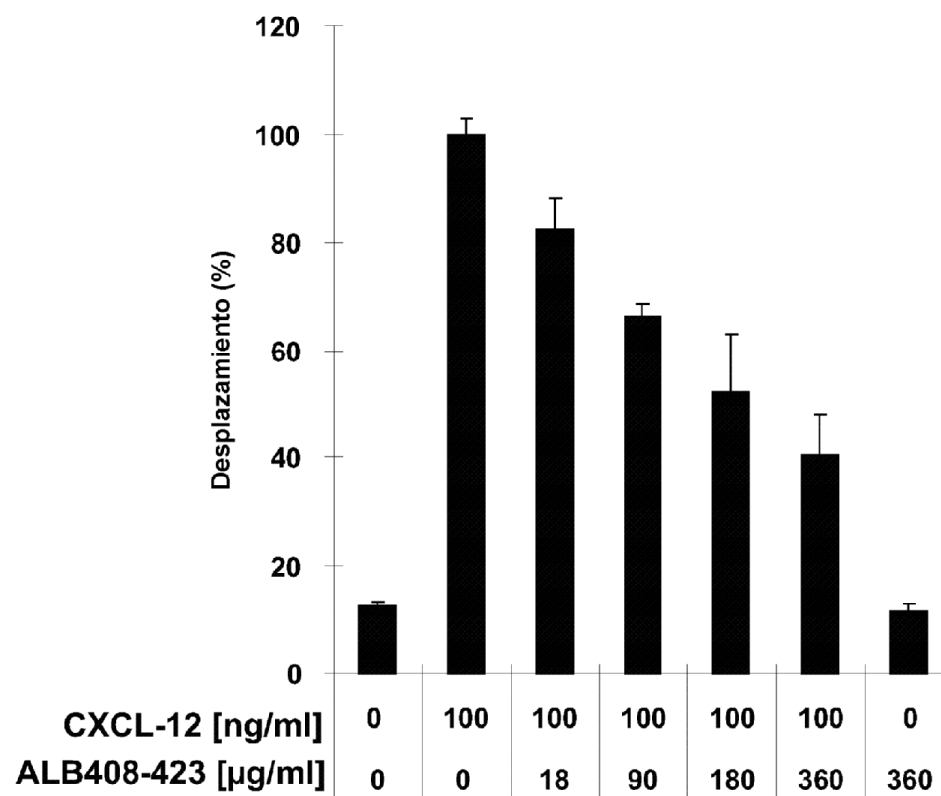
Fig.16

Fig.17A

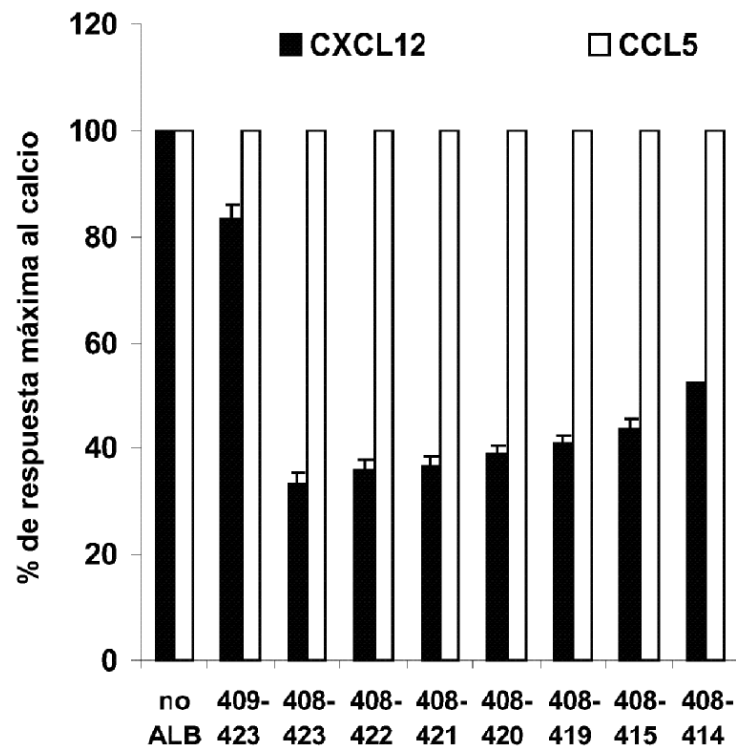


Fig.17B

