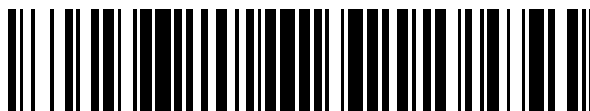


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 576**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61K 38/38** (2006.01)

**C07K 14/76** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2014 PCT/EP2014/062252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14198834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2014 E 14729370 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3007717**

54 Título: **Péptidos con actividades antagonistas contra CXCR4 natural**

30 Prioridad:

**12.06.2013 EP 13171718**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.02.2019**

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 2 699 576 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).



**IVRWSKKVPCVS, 4081-419 WSC02**

**IVRWSKKVCQVS, 4081-419 WSC03**

**IVRYTCKVCQVS, 4081-419 WSC03**

**IVRYTKKVPQCS, 4081-419 V418C.**

5 Los péptidos particularmente útiles de la presente invención son péptidos diméricos que consisten en dos péptidos monoméricos idénticos de acuerdo con la invención, cuyos péptidos comprenden el aminoácido cisteína, en el que los péptidos diméricos están ligados entre sí mediante un puente cisteína que está formado entre los péptidos monoméricos. El péptido dímico de la invención está seleccionado entre el grupo de péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos siguiente:

**IVRYTKCVPQVS, 4081-419 K414C**

**IVRYSKKVPQC, 4081-418 SC**

**IVRWTKKVPQVC, 4081-419 WC01**

10 La Patente WO 2009/004054 A2 divulga un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos: Z1-LVRYTKKVPQVSTPTL-Z2 (ALB-408) y sus fragmentos y/o variantes y/o derivados biológicamente activos, especialmente derivados amidados, acetilados, sulfatados, fosforilados y/o glucosilados, y péptidos obtenibles mediante síntesis múltiple, que tienen la actividad biológica de ALB408-423; en la que Z representa un número de desde 0 hasta 10 residuos de aminoácidos.

15 La Patente WO 2013/030320 A1 divulga proteínas cápsidas de tipo Circovirus con propiedades mejoradas. Estas proteínas, o los ácidos nucleicos de codificación, son útiles, por ejemplo, para generar anticuerpos, composiciones inmunógenas, o vacunas. La Patente WO 2013/030320 A1 se refiere igualmente a procedimientos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas con PCV2 en mamíferos que usan dichas proteínas, ácidos nucleicos o composiciones, e igualmente se refiere a composiciones y procedimientos para la detección de PCV2 en una muestra, usando las proteínas, ácidos nucleicos o anticuerpos divulgados.

20 La Patente WO 2012/112188 A1 divulga composiciones de albúmina de suero humano (HSA) con propiedades mejoradas sobre HSA nativas.

25 J. Kuil, y otros, informan en Mol. Pharmaceutics, vol. 8, (nº 6), págs. 2444-2453, (2011) sobre dendrímeros péptidos híbridos para la obtención de imágenes de la expresión del receptor quimiocino 4 (CXCR4). El receptor quimiocino 4 (CXCR4), el cual está sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, es una diana emergente en el campo de la obtención de imágenes moleculares y terapéuticas. El CXCR4 de unión a varios péptidos, incluyendo el Ac-TZ14011 cíclico, ha sido ya validado. Se prepararon dendrímeros conteniendo Ac-TZ14011 mono-, di- y tetrámeros y se funcionalizaron con un marcador multimodal (híbrido), que consiste en un fluoróforo del tipo Cy5.5 y un quelato DTPA. La microscopía confocal reveló que todos los tres dendrímeros formaron membrana unida a 4°C, correspondiente a CXCR4 de unión *in vitro*. El dímero y el tetrámero no marcados tenían una afinidad algo más baja por el CXCR4 que el monómero no marcado. Sin embargo, cuando se marcaron con el marcador multimodal el CXCR4, la afinidad del dímero y el tetrámero fue considerablemente mayor en comparación con la del monómero marcado. Los estudios de biodistribución revelaron que los péptidos adicionales en el dímero y tetrámero redujeron la fijación de músculo no específico. La multimerización del péptido Ac-TZ19411 cíclico reduce la influencia negativa del marcador multimodal sobre la afinidad del receptor y la biodistribución.

35 MacDonald y otros, informan en Synlett, (nº 13), págs. 1951-1954, (2010) sobre la síntesis en fase sólida de péptidos fosfonilados, usando aminoácidos Fmoc-protectados. Los péptidos corresponden a regiones que contienen Ser195 fosfonilado en el sitio activo de butilcolinesterasa y Tyr411 de albúmina de suero humano. Los aminoácidos Fmoc-protectados fosfonilados se usaron en la síntesis de péptidos en fase sólida para preparar los péptidos. La Fmoc-serina y Fmoc-tirosina con protección bencil éster se trataron con monoclorhidratos alquil metilfosfónicos para forfornilar los grupos hidroxilo de la cadena lateral. Los péptidos fosfonilados se diseñaron para imitar la región de proteína después de exposición de las proteínas a agentes organofosforosos.

**IVRWTKKVPQVS, 4081-419 WC02**

**IVRWCKKVPQVS, 4081-419 WC03**

**IVRWSKKVPQCS, 4081-419 WSC01**

**IVRWSKKVPCVS, 4081-419 WSC02**

**IVRWSKKVCQVS, 4081-419 WSC03**

**IVRYTKKVPQCS, 4081-419 V418C.**

Objeto de la invención son igualmente péptidos de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades neurológicas, en particular apoplejía, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple; en el campo de la inmunología en particular para el tratamiento del síndrome WHIM y artritis reumatoide; en el campo de la oncología en particular para el tratamiento de cánceres, en particular cánceres que muestran el receptor CRCX tal como cáncer del hígado, páncreas, próstata o cáncer de mama; para el tratamiento de la falta de movilización, proliferación y migración de células madre, activación de célula T así como soporte de inmunoblastos tales como CTL/PD-1; en el tratamiento de heridas causadas por quemaduras; para el tratamiento de antifibrosis; tratamiento o prevención de cicatrices; para el tratamiento de trastornos cardiológicos, en particular insuficiencia cardíaca; para el tratamiento de trastornos metabólicos, en particular diabetes;

en el que el péptido es eficaz en el bloqueo de la infección con VIH-1 NL4-3 X4-trópico con un valor  $IC_{50}$  menor de 50  $\mu$ M.

Objeto de la invención son igualmente péptidos de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades neurológicas, en particular apoplejía, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple; en el campo de la inmunología en particular para el tratamiento del síndrome WHIM y artritis reumatoide; en el campo de la oncología en particular para el tratamiento de cánceres, en particular cánceres que muestran el receptor CRCX tal como cáncer del hígado, páncreas, próstata o cáncer de mama; para el tratamiento de trastornos de hematopoyesis, en particular para soporte de la movilización, proliferación y migración de células madre, activación de célula T así como soporte de inmunoblastos tales como CTL/PD-1; para el tratamiento de antifibrosis; tratamiento o prevención de cicatrices; para el tratamiento de trastornos cardiológicos, en particular insuficiencia cardíaca; para el tratamiento de trastornos metabólicos, en particular diabetes; para el tratamiento de enfermedades víricas, en particular infecciones con VIH-1, VIH-2, *Cytomegalo virus*, *Herpes simplex virus* (tipo 1 y 2), *Varicella zoster virus*, *Hepatitis A* y *Hepatitis B virus*, *Influenza virus*, *Polio virus*, *Rhino virus*, *Rubella virus*, *Measles virus*, *Rabies virus*, *Rous sarcoma virus*, *Epstein-Barr virus*; y para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias y hongos, en particular *Pseudomonas*, *Candida*, *S. aureus*; para el tratamiento de procesos infecciosos, procesos infecciosos anormales; tratamiento de trastornos del crecimiento, tratamiento de enfermedades neuronales, trastornos de la cascada de coagulación de la sangre y hematopoyesis, enfermedades vasculares, enfermedades del sistema inmune, y para mejorar la cicatrización de heridas y huesos.

Un objeto adicional de la presente invención es un procedimiento para la fabricación de al menos uno de los péptidos de la invención mediante síntesis en fase sólida.

Además, el objeto de la presente invención es igualmente un procedimiento para la fabricación de al menos uno de los péptidos de la invención, en el que los péptidos monoméricos se proporcionan y acoplan bajo condiciones de reacción oxidantes que son capaces de oxidar los enlaces SH para proporcionar enlaces -S-S-.

#### **Descripción detallada de la invención**

La invención se describe adicionalmente con mayor detalle mediante el uso del péptido de SEC ID NO 16 como un representante típico del péptido de la invención. Además de la divulgación de la presente invención, se le refiere en la Patente WO 2009/004054 A2.

El péptido de la invención es eficaz en el bloqueo de la infección con VIH-1 NL4-3 X4-trópico con un valor  $IC_{50}$  menor de 50  $\mu$ M. Dichos péptidos se consideran que tienen el efecto inhibitorio suficiente como para suprimir o inhibir las respuestas fisiológicas mediadas por el CXCR4 activo. Los péptidos de la invención comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en

**IVRFTKKVPQVS, 4081-419 Y411F**

**IVRWTKKVPQVS, 4081-419 Y411W**

Otra realización aún de la invención comprende el péptido de la invención que tiene al menos una de las secuencias de aminoácidos siguientes:

**IVRYTKCVPQVS, 4081-419 K414C**

**IVRYSKKVPQC, 4081-418 SC**

**IVRWTKKVPQVC, 4081-419 WC01**  
**IVRWTKKVPQVS, 4081-419 WC02**  
**IVRWCKKVPQVS, 4081-419 WC03**  
**IVRWSKKVPQCS, 4081-419 WSC01**  
**IVRWSKKVPCVS, 4081-419 WSC02**  
**IVRWSKKVCQVS, 4081-419 WSC03**  
**IVRYTKKVPQCS, 4081-419 V418C.**

Estos aminoácidos se usaron para la preparación de dímeros los cuales están ligados mediante sus cisteínas. Ambos homo- y heterodímeros pueden sintetizarse combinando dichos péptidos.

5 Los péptidos particularmente útiles de la presente invención son péptidos diméricos que consisten en dos péptidos monoméricos idénticos de acuerdo con la invención, cuyos péptidos comprenden el aminoácido cisteína, en el que los péptidos diméricos están ligados entre sí mediante un puente cisteína que está formado entre los péptidos monómeros. En particular, el péptido dímero de la invención está seleccionado entre el grupo de péptidos que tiene la secuencia de aminoácidos siguiente:

**IVRYTKCVPQVS, 4081-419 K414C**  
**IVRYSKKVPQC, 4081-418 SC**  
**IVRWTKKVPQVC, 4081-419 WC01**  
**IVRWTKKVPQVS, 4081-419 WC02**  
**IVRWCKKVPQVS, 4081-419 WC03**  
**IVRWSKKVPQCS, 4081-419 WSC01**  
**IVRWSKKVPCVS, 4081-419 WSC02**  
**IVRWSKKVCQVS, 4081-419 WSC03**  
**IVRYTKKVPQCS, 4081-419 V418C.**

10 Igualmente, los péptidos retro-inversos de los péptidos de la inversión entran dentro del alcance de la presente invención, así como otros derivados que estabilizan el enlace péptido frente a peptidasas.

15 El término derivado define todos los fragmentos de longitudes que incluyen truncamientos en la terminación N y C, el péptido de la invención que contiene sustituciones de restos de aminoácidos incluyendo restos D-aminoácidos y restos de aminoácidos modificados, así como péptidos que contienen enlaces disulfuro y extensiones en la terminación N y C.

Objeto de la presente invención son igualmente péptidos de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades neurológicas, en particular apoplejía, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple; en el campo de la inmunología en particular para el tratamiento del síndrome WHIM y artritis reumatoide; en el campo de la oncología en particular para el tratamiento de cánceres, en particular cánceres que muestran el receptor CRCX tal como cáncer del hígado, páncreas, próstata o cáncer de mama; para el tratamiento de trastornos de hematopoyesis, en particular para soporte de la movilización, proliferación y migración de células madre, activación de célula T así como soporte de inmunoblastos tales como CTL/PD-1; para el tratamiento de antifibrosis; tratamiento o prevención de cicatrices; para el tratamiento de trastornos cardiológicos, en particular insuficiencia cardíaca; para el tratamiento de trastornos metabólicos, en particular diabetes; para el tratamiento de enfermedades víricas, en particular infecciones con VIH-1, VIH-2, *Cytomegalo virus*, *Herpes simplex virus* (tipo 1 y 2), *Varicella zoster virus*, *Hepatitis A* y *Hepatitis B virus*, *Influenza virus*, *Polio virus*, *Rhino virus*, *Rubella virus*, *Measles virus*, *Rabies virus*, *Rous sarcoma virus*, *Epstein-Barr virus*; y para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias y hongos, en particular *Pseudomonas*, *Candida*, *S. aureus*; para el tratamiento de procesos infecciosos, procesos infecciosos anormales; tratamiento de trastornos del crecimiento, tratamiento de enfermedades neuronales, trastornos de la cascada de coagulación de la sangre y hematopoyesis, enfermedades vasculares, enfermedades del sistema inmune, y para mejorar la cicatrización de heridas y huesos.

El péptido de la invención puede formularse como medicamento con vehículos aceptables farmacéuticamente adecuados.

5 El péptido de acuerdo con la invención puede administrarse en un modo usual para péptidos en una vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, local-tópica, subcutánea o bucal. La cantidad de péptido a administrar es desde 1 µg hasta 1 g por dosis unitaria por día.

Un objeto adicional de la presente invención es un procedimiento para la fabricación de al menos uno de los péptidos de la invención mediante síntesis en fase sólida. La síntesis química del péptido de la invención puede llevarse a cabo por medios de síntesis en fase sólida convencionales, por ejemplo sobre un sintetizador de péptido 9050 (Applied Biosystems) usando la química Fmoc conocida.

10 Además, el objeto de la presente invención es igualmente un procedimiento para la fabricación de al menos uno de los péptidos de la invención, en el que los péptidos monoméricos se proporcionan y acoplan bajo condiciones de reacción oxidante que son capaces de oxidar los enlaces SH para proporcionar enlaces -S-S-.

15 El cribado antivírico se llevó a cabo usando el clon molecular VIH-1-NL4-3 X4. Para determinar si la actividad antivírica dependió del tropismo del co-receptor vírico y para excluir la posibilidad de que un agente contaminante fuera el responsable de los efectos observados, los autores de la presente invención ensayaron a continuación el efecto del péptido químicamente sintetizado de la SEC ID NO 16 sobre una variedad de cepas VIH-1. El péptido sintético inhibió de manera general la infección por cepas VIH-1 X4 con una concentración inhibitoria media del 50% (IC<sub>50</sub>) de 15,8 µg/ml (correspondiente a 8,6 µM). La replicación de VIH-1 NL4-3 de tipo salvaje (ts) en PBMCs se suprimió marcadamente a concentraciones  $\geq 4$  µg/ml. De manera notable, justamente ~1% del precursor HSA altamente abundante necesita convertirse al péptido de la SEC ID NO 16 para lograr ~10 µg/ml. El péptido del péptido de la SEC ID NO 16 no muestra efectos citotóxicos incluso a concentraciones excesivamente altas. Experimentos adicionales confirmaron que el péptido inhibe también la infección por cepas VIH-2 X4 y SIV, aunque los efectos fueron relativamente modestos ya que estos virus usan co-receptores múltiples. Los autores de la presente invención han encontrado que el pretratamiento con células diana víricas, pero no de viriones, dieron como resultado una reducción efectiva de infección por VIH, lo cual sugiere que el péptido de la SEC ID NO 16 tiene una diana celular. Además, la potencia de inhibición disminuyó gradualmente cuando el péptido de la SEC ID NO 16 se agregó después de exposición de las células a los viriones, y el precursor HSA no tuvo efecto antiretrovírico. Así, los datos demostraron que un fragmento de la proteína la más abundante en el plasma humano, es un inhibidor que se produce de manera natural y específico de cepas de VIH-1 X4 que identifica una etapa temprana del ciclo de vida vírico.

30 Se ha encontrado que el péptido de la SEC ID NO 16 compete con la unión de CXCL12 a CXCR4 de una manera que depende de la dosis. La constante de disociación (DC<sub>50</sub>) se igualó a  $8 \pm 3$  µM, lo que corresponde a un valor de K<sub>1</sub> de  $3 \pm 1$  µM. Así, el valor DC<sub>50</sub> del péptido de la SEC ID NO 16 es similar a los valores IC<sub>50</sub> obtenidos en ensayos de inhibición de VIH-1. No obstante, tal como se ha indicado anteriormente, estas concentraciones pueden lograrse fácilmente mediante la escisión proteolítica de una pequeña fracción del abundante precursor HSA.

35 Se examinó si el péptido de la SEC ID NO 16 afecta la migración celular mediada por CXCR4/CXCL12, que juega un papel clave en la homeostasis, respuestas inmunes y la metástasis de varios cánceres. Se ha encontrado que el péptido de la SEC ID NO 16 suprimió la migración inducida por CXCL12 de células T Jurkat, así como de células madre humanas CD34+. De manera similar, el péptido de la SEC ID NO 16 previno la invasión de células tumorales *in vitro*. Así, este péptido puede ejercer efectos anti-inflamatorios así como anti-invasivos y anti-metástasis.

40 El eje CXCL12-CXCR4 está implicado en la retención de médula ósea de células madre hematopoyéticas (HSCs), las cuales son comúnmente usadas para la reconstitución de la hematopoyesis en pacientes trasplantados (Mohty y otros, 2011). Las CXCR4 humanas y de ratón están altamente conservadas y los estudios piloto en ratones revelaron que una única administración i.p. del péptido de la SEC ID NO 16 dio como resultado una significativa movilización de células progenitoras y neutrófilos en la periferia. El trasplante de células obtenidas del péptido de la SEC ID NO 16 tratado con ratones dio como resultado unos índices de injertos incrementados, lo que confirma adicionalmente la exitosa movilización de células madre mediante este péptido que se produce de manera natural.

45 Una administración i.p. del péptido de la SEC ID NO 16 redujo de manera significativa la infiltración dependiente de CXCR4 de neutrófilos, linfocitos y eosinófilos dentro las vías respiratorias de ratones tras exposición a alérgenos con OVA. Este tratamiento redujo igualmente de manera marcada la infiltración de macrófagos. Por el contrario, el ALB409-423, el cual no interactúa con CXCR4, no tuvo efectos significantes. Así, el péptido de la SEC ID NO 16 es un antagonista eficaz de CXCR4 *in vivo* que moviliza las células madre y ejerce efectos anti-inflamatorios en modelos de ratones.

55 Se ha encontrado que el péptido de la SEC ID NO 16 inhibió la *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista gram-negativo, de una manera dependiente de la dosis y que fue eficaz al 80% en concentraciones de  $\geq 5$  µM. En comparación, únicamente se observaron efectos modestos contra el *Staphylococcus aureus*, un patógeno bacteriano gram-positivo, o contra *Candida albicans*, un hongo diploide y agente causal de infecciones oportunistas orales y genitales. Así, el péptido de la SEC ID NO 16 no solamente inhibe cepas de VIH-1 X4, sino que también ejerce efectos antibacterianos específicos.

## ES 2 699 576 T3

La interacción del péptido de la SEC ID NO 16 con CXCR4 es altamente específica ya que la actividad de un gran número de otros GPCRs no fue afectada y que este péptido interactúa con la segunda hélice extracelular de CXCR4. El proceso exacto de unión del péptido de la SEC ID NO 16 a CXCR4 permanece sin determinar. Se ha informado que el CXCL12 interactúa inicialmente con la N-terminación de CXCR4 para inducir cambios de conformación que posteriormente permiten la interacción del ligando con la segunda y tercera hélices extracelulares del GPCR (Brelot y otros, 2000; Zhou y otros, 2001; Huang y otros, 2003).

5

SEC ID NO	Derivada	SECuencia	IC50 ( $\mu$ M)
16	408-423	LVR YTKKVPQVSTPTL	8,63
17	408-422	LVR YTKKVPQVSTPT	13,4
18	408-421	LVR YTKKVPQVSTP	14,0
19	408-420	LVR YTKKVPQVST	15,3
20	408-419	LVR YTKKVPQVS	5,49
21	408-418	LVR YTKKVPQV	26,8
22	408-417	LVR YTKKVPQ	19,8
23	408-415	LVR YTKKV	25,7
24	407-419	LLVR YTKKVPQVS	11,1
25	4081-419	IVR YTKKVPQVS	2,48
26	408-415-T412A	LVR YAKKV	11,2
27	408-415-V409A	LAR YTKKV	32,9
28	408-416	LVR YTKKVP	n.d.
3	4081-419 R410H	IVH YTKKVPQVS	>100*
4	4081-419 R410K	IVK YTKKVPQVS	>10*
13**	4081-419 Y411F	IVR FTKKVPQVS	3,89
14	4081-419 Y411S	IVR STKKVPQVS	>100*
15**	4081-419 Y411W	IVR WTkkVPQVS	1,54
5	4081-419 T412S	IVR YSKKVPQVS	2,09
2**	4081-419 K414C	IVR YTKCVPQVS	5,87
6**	4081-419 V418C	IVR YTKKVPQCS	3,69
1**	4081-418 SC	IVR YSKKVPQC	2,94
7**	4081-419 WC01	IVR WTkkVPQVC	1,65
8**	4081-419 WC01	IVR WTCKVPQVS	2,10
9**	4081-419 WC03	IVR WCKKVPQVS	1,82
10**	4081-419 WSC01	IVR WSKKVPQCS	0,87
11**	4081-419 WSC02	IVR WSKKVPQVS	0,31
12**	4081-419 WSC03	IVR WSKKVCQVS	1,51
**	4081-419 K414C x2	(IVR YTKCVPQVS) <sub>2</sub>	1,05
**	4081-419 V418C x2	(IVR YTKKVPQCS) <sub>2</sub>	0,46

(Continuación)

SEC ID NO	Derivada	SECuencia	IC50 ( $\mu$ M)
**	4081-419 WC01 x2	(IVRWTKKVPQVC) <sub>2</sub>	0,40
**	4081-419 WC02 x2	(IVRWTKKVPQVS) <sub>2</sub>	0,32
**	4081-419 WC03 x2	(IVRWCKKVPQVS) <sub>2</sub>	0,60
**	4081-419 SC x2	(IVRYSKKVPQC) <sub>2</sub>	0,39
*	4081-419 WSC01 x2	(IVRWSKKVPQCS) <sub>2</sub>	0,18
**	4081-419 WSC02 x2	(IVRWSKKVPCVS) <sub>2</sub>	0,12
**	4081-419 WSC03 x2	(IVRWSKKVCQVS) <sub>2</sub>	n.d.
*debido a un IC50 de >50 $\mu$ M no a un péptido de la invención			
**péptido de la invención			

## Ejemplos

### Péptidos

- 5 El péptido de la SEC ID NO 16 y varios derivados del mismo se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida convencional sobre un sintetizador de péptidos 9050 (Applied Biosystems) usando química Fmoc. El péptido se purificó mediante cromatografía RP, y su identidad y pureza se establecieron mediante RP-HPLC analítica y MALDI-MS.

### Virus madre

- 10 Los clones moleculares de VIH-1, VIH-2 y SIV que difieren en el tropismo del co-receptor se generaron mediante transfección transitoria de células 293T con ADN pro-vírico mediante el procedimiento del fosfato cálcico (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Clontech). Después de incubación durante una noche, la mezcla de transfección se reemplazó mediante medio DMEM suplementado con FCS al 10%, y los virus madre se recolectaron 48 horas post-transfección. A continuación, el sobrenadante del cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm para separar los residuos de las células. Los virus madre resultantes se cuantificaron mediante ELISA con antígeno p24 (VIH) o p27 (SIV). Los virus madre o bien se usaron inmediatamente o bien se almacenaron en partes alícuotas a -80°C.

### Ensayo de infección de TZM-bl

- 20 Las células informadoras TZM-bl que contenían el gen informador LacZ bajo el control del promotor de HIV-1 se sembraron en placas de microvaloración de fondo en F de 96 pocillos (Greiner Bio-One). Al día siguiente, las células se pre-incubaron con varias diluciones del péptido de la SEC ID NO 16 o sus derivados durante 1 hora y, posteriormente, se infectaron con VIH-1, VIH-2 y SIV. Los índices de infección se determinaron después de 2 días usando el kit Tropix Gal-Screen de una etapa, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

### Ensayo de infección de PBMC

- 25 Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron a partir de capas leucocitarias obtenidas de DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hesse usando centrifugación de densidad Ficoll. Se estimularon  $1 \times 10^6$  PBMC por ml con 1  $\mu$ g/ml de fitohemaglutinina (PHA, Oxoid, #3085280) y 10 ng/ml de Interleucina 2 (IL-2, Strathmann, #9511192) durante tres días. Después de esto, las células se granularon y resuspendieron en medio conteniendo IL-2. Se sembraron  $2 \times 10^5$  PBMC en placas de microvaloración de fondo en F de 96 pocillos, se agregaron los péptidos y las células se infectaron con 10-100 pg de antígeno p24 de virus X4 o R5 trópico. Los sobrenadantes conteniendo la progenie de los virus se extrajeron cada 2-3 días post-infección. La producción de virus se midió mediante ELISA de antígeno p24 (programa de reactivo de SIDA NIH). Los valores medios de antígeno p24 se obtuvieron a partir de infecciones por triplicado  $\pm$  desviación estándar.

### Viabilidad de las células

- 35 Con el fin de comprobar los efectos citotóxicos se incubaron células TZM-bl o PBMCs pre-estimuladas con concentraciones crecientes de péptidos. La viabilidad de las células se determinó usando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo (PROMEGA, G7571) según recomendaciones del fabricante. Los valores se obtuvieron a partir de mediciones por triplicado. Los índices de vitalidad se calcularon con relación a índices de ATP en células que contenían PBS (no péptido) (100%). Los datos se registraron usando un luminómetro 10 minutos después de la adición del reactivo.



El péptido del péptido de SEC ID NO 16 bloquea una etapa temprana en la infección

Monitorización mediante fluorescencia en tiempo real de interacciones ligando-receptor

Se adquirieron anticuerpos monoclonales (mAbs) CXCR4 (clon 12G5, IgG2a) anti-humano o CXCR7 (clon 9C4) anti-humano de R&D Systems (Minneapolis, MN). La unión de mAbs anti-CXCR7 y anti-CXCR4 no-conjugados se reveló usando F(ab')<sub>2</sub> Ab anti-ratón de cabra PE-conjugado (Dako, Glostrup, Dinamarca) y se analizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) con el software CellQuest. Las quimiocinas humanas CXCL12 y CXCL12-TexasRed se sintetizaron tal como ha sido descrita (Valenzuela-Fernandez, y otros 2001). La quimiocina humana CXCL12 se adquirió de Clinisciences SAS (Francia).

Los experimentos se realizaron usando células que expresan de manera estable EGFP-CXCR4, suspendidas en tampón de albúmina de suero bovino-HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 137,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,25 mM, KCl 6 mM, glucosa 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v), pH 7,4) (típicamente a 10<sup>6</sup> células/ml). Los registros en función del tiempo de la fluorescencia emitida a 510 nm (excitación a 470 nm) se realizaron a 21°C usando un espectrofluorímetro y con tomas de muestras cada 0,3 segundos. Las mediciones de unión de fluorescencia se iniciaron mediante la adición a los 30 segundos de 100 nM de CXCL12-TR a la suspensión de 1 ml de célula. Para los experimentos de competencia, las células que expresan EGFP-CXCR4 se pre-incubaron durante 10 minutos en la ausencia o la presencia de varias concentraciones de fármacos no marcados. A continuación, se agregó el CXCL12-Tr (100 nM) y se registró la fluorescencia hasta que se alcanzó el equilibrio (300 segundos). Los datos se analizaron usando el software Kaleidagraph 3.08 (Synergy Software, Reading, PA, USA).

Internalización de EGFP-CXCR4 o EGFP-CXCR7

El ADNc de CXCR7 se clonó en fusión con ADNc de EGFP dentro de un vector pIRES Hyg 3 modificado (Clontech). Las células HEK 293T que expresan de manera estable EGFP-CXCR7 se generaron mediante el procedimiento de co-precipitación de fosfato cálcido-ADN y la unión del mAb 9C4 se confirmó en la ausencia o presencia de 100 nM de CXCL12. La internalización de receptores se registró tal como se describe en la referencia (Hachet-Haas y otros, 2008) usando el marcado de superficies de células de EGFP con un anti-GFP de ratón monoclonal (Roche Molecular Biochemicals; dilución 1/100) como anticuerpo primario y un fragmento AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> R-PE-conjugado de IgG anti-ratón de cabra (Immunotech; 1/100) como anticuerpo secundario. La tinción de CXCR4 o de CXCR7 se cuantificó mediante análisis citométrico de flujo (10.000 células por muestra) sobre un citómetro (FACSCalibur, Becton-Dickinson). La media de la intensidad de fluorescencia de CXCR4 o de CXCR7 se calculó usando el software CELLQuest (Becton-Dickinson).

Citometría de flujo

El sitio de unión del péptido de la SEC ID NO 16 sobre CXCR4 se comprobó mediante análisis de citometría de flujo (FACSCalibur; Becton-Dickinson) usando el mAb CXCR4 (BD Pharmingen, clon: 12G5; o 1D9) y mAb CCR5 (BD Pharmingen, clon: CD195) anti-humano comercial. Se incubaron 2x10<sup>5</sup> células T Jurkat con péptidos a 4°C durante 30 minutos en medio libre de suero. Después de la incubación, las células se lavaron con tampón FACS (PBS + FCS al 1%) mediante centrifugación y, a continuación, se tiñeron secuencialmente o bien con mAb CXCR4 o bien con mAb CCR5 anti-humano marcados con PE, a 4°C. Después de lavarlas, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón FACS durante 5 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se analizaron sobre un citómetro de flujo. Los datos se procesaron mediante el uso de CELLQUEST (Becton Dickson). Para analizar la preferencia del péptido de la SEC ID NO 16, las células fantasma (parenteral, X4, Hi) se recolectaron usando la solución de disociación de células (Non-enzymatic 1x; Sigma; C5914) y se prepararon para análisis FACS tal como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de unión de [<sup>35</sup>S]GTP[S]

Producción de baculovirus recombinantes. La producción de baculovirus que codifican CXCR4 humano, subunidad  $\alpha_{12}$  de proteína G de rata, y tanto la subunidad  $\beta_1$  de proteína G humana como la subunidad  $\gamma_3$  de proteína G bovina ha sido ya descrita (Moepps y otros, 1997). La [<sup>35</sup>S]GTP[S] se obtuvo de Perkin-Elmer (Waltham, USA). La CXCR4 se obtuvo de PepruTech (Rocky Hill, USA).

Cultivo de células de insecto y preparación de membrana: Se desarrollaron células Sf9 a 27°C en discos de cultivo de 59 cm<sup>2</sup> en medio TNM-FH (Sigma, T 1032) suplementado con suero bovino fetal al 10% y 0,5 mg/ml de gentamicina. Para la producción de receptores recombinantes y G<sub>12</sub> heterotrímeros, se desarrollaron células a una densidad de aproximadamente 60%, se incubaron durante 1 hora a 27°C en 2 ml por disco de medio conteniendo el baculovirus(es) recombinante(s). A continuación, las células se suplementaron con 9 ml por disco de medio recién preparado y se mantuvieron en este medio durante 48 horas a 27°C. Para la preparación de una fracción de membrana bruta, las células se granularon mediante centrifugación, y se resuspendieron en 600  $\mu$ l por disco de tampón de lisis enfriado en hielo conteniendo Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, GDP 3  $\mu$ M, 2  $\mu$ g/ml de inhibidor de tripsina de soja, pepstatina 1  $\mu$ M, leupeptina 1  $\mu$ M, PMSF 100  $\mu$ M, y 1  $\mu$ g/ml de aprotinina. Las células se homogeneizaron forzando a pasar la suspensión 6 veces a través de una aguja de 0,5 mm x 23 mm unida a una jeringuilla desechable. Después de 30 minutos en hielo, el lisado se centrifugó a 2.450 x g durante 45 segundos para separar las células y los núcleos sin romper. A partir del sobrenadante resultante se aisló una fracción de membrana bruta mediante centrifugación a

26.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El gránulo se lavó con 300 µl de tampón de lisis, se resuspendió en 300 µl de tampón de lisis recién preparado, se congeló por congelación instantánea en nitrógeno líquido, y se almacenó a -80°C.

5 La unión de [<sup>35</sup>S]GTP[S] a membranas de células de insectos infectadas con baculovirus se ensayó tal como se ha descrito (Mopps y otros, 1997). En resumen, se incubaron membranas (10 µg de proteína/muestra) durante 60 minutos a 30°C en una mezcla (100 µl) conteniendo trietanolamina/HCl 50 mM, pH 7,4, EDTA 1,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 5,0 mM, GDP 10 µM, y [<sup>35</sup>S]GTP[S] 1,05 nM (1250 Ci/mmol). La incubación se terminó mediante filtración rápida a través de membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro (Advanced Microdevices, Ambala Cantonment, India).  
10 Las membranas se lavaron, secaron, y la radioactividad retenida se determinó mediante recuento de centelleo líquido. La unión no específica se definió como la unión no competente para GTP[S] no marcado 100 µM.

Rastreo de antagonista GPCR del péptido de la SEC ID NO 16

Efecto del péptido de la SEC ID NO 16 y derivados sobre la migración de células

15 La migración de células Jurkat (ATCC) se analizó usando cámaras de 6,5 mm de diámetro con filtros de 5 µm de poro (Transwell, cultivo de células de 24 pocillos, Coster, Boston, MA). Se suspendieron 2 x 10<sup>5</sup> células Jurkat en 200 µl de Optimizer T-Cell Expansion SFM, y la suspensión de células se agregó a la cámara superior. A continuación, se agregaron a la cámara inferior CXCL12 10 nM (R&D System) y/o varias concentraciones del péptido de la SEC ID NO 16 o sus derivados en 600 µl de T-Cell Expansion SFM a la cámara inferior. Las cámaras de cultivo de células se incubaron durante 150 minutos en una incubadora de cultivo de células a 37°C. Después de la incubación,  
20 las cámaras se retiraron, se tomaron 100 µl de los sobrenadantes y las células que migraron dentro del compartimento inferior se contaron o bien directamente usando un hemocitómetro o bien se analizaron usando un ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo, tal como se ha descrito anteriormente. Todos los valores representan la media de los números de células que migraron con relación a células tratadas únicamente con CXCL12 procedentes de un experimento por triplicado ± SD.

25 Las células madre hematopoyéticas periféricas (PHS) aisladas mediante aféresis de individuos tratados con el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) se obtuvieron del Institute of Transfusion Medicine, University Hospital Ulm. Las células congeladas se descongelaron cuidadosamente en tampón ACD-A al 10% diluido 1/10 (suministrado por el Institute of Transfusión Medicine) en PBS. Se colocaron 1 x 10<sup>5</sup>/200 µl de células PHS dentro de la cámara superior de placas trans-pocillo. A continuación, en cada pocillo se colocaron CXCL12 10 nM y/p varias concentraciones del péptido de la SEC ID NO 16 o sus derivados en 600 µl de medio de cultivo. Después de 3 horas,  
30 se midió la quimiotaxis usando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo, tal como se ha descrito anteriormente. Todos los valores representan la media de números de células que migraron con relación a células tratadas únicamente con CXCL12 procedentes de un experimento por triplicado ± SD.

Ensayo de invasión de células de cáncer

35 La invasión de células de células de cáncer se ensayó usando una cámara de invasión Biocoat Matrigel (BD Bio-Coat™ Matrigel™ Invasion Chamber) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se suspendieron 5 x 10<sup>4</sup> células DU145 (ATCC) en 300 µl de RPMI libre de suero (Gibco) conteniendo BSA al 0,1% (KPL) y, a continuación, se agregaron a la cámara superior. A cada cámara inferior se agregaron 700 µl de medio libre de suero con o sin CXCL12 100 nM y varias concentraciones del péptido de la SEC ID NO 16. Las cámaras se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire. Las células no invasoras se separaron de la superficie superior de la membrana mediante restregado. Las células invadidas frente a las del fondo de la membrana se cuantificaron usando el kit de ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo®, tal como se ha descrito anteriormente.

Efecto de antagonistas de CXCL12 y CXCR4 sobre el citoesqueleto de actina

45 Se estimularon células Jurkat preincubadas o bien con medio, con derivados ALB o bien con AMD3100 (todos ellos 545 µM) con CXCL12 (10 µg/ml) a 37°C durante el tiempo indicado, se fijaron en formaldehído al 5% (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) y se permeabilizaron con saponina al 0,1% (Carl Roth). Se tiñó F-actina con faloidina conjugada con AlexaFluor568 (Molecular Probes, Eugene, OR) seguido de análisis citométrico de flujo de intensidad de tinte relativo.

Movilización de células progenitoras en ratones

50 Se alojaron ratones CS7Bl/6J (Janvier, Le Genest St. Isle, Francia) en el vivario convencional del Goethe-University Medical Centre, Frankfurt, con alimento y agua sin limitación. Los ratones recibieron inyecciones i.p. de 200 µl de agua o de solución salina normal conteniendo 10 mg/ml del péptido de la SEC ID NO 16. Se extrajo sangre a los tiempos indicados después de inyección de la bolsa del carrillo después de desinfección cuidadosa de la piel. Después de lisis hipotónica, los leucocitos se incubaron por duplicado en medio semi-sólido comercialmente disponible  
55 repleto con citocina (3434, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) bajo condiciones estándar. Las CFU-C se valoraron el día 7, tal como se ha descrito (Bönig y otros, 2006). Las CFU-C se normalizaron al volumen de de sangre

incubada. Todos los estudios de animales se realizaron con permiso de la IACUC local, de acuerdo con las directrices de la AAALAC.

#### Trasplante de células movilizadas

5 Se inyectaron animales C57BL/8 con el péptido de la SEC ID NO 16 (2 mg i.p. en solución salina) o con controles de solución salina. La sangre periférica se recolectó individualmente 1 hora post-inyección, se contó, combinó y trasplantó de manera competitiva (660  $\mu$ l de sangre equivalente) junto a  $4 \times 10^5$  células C57BL/6 CD45.1 BM dentro de receptores C57BL/6 Cd45.1.

#### Modelo de ratón con asma

10 Se sensibilizaron ratones mediante inyección intraperitoneal (i.p.) los días 0, 1 y 2 de 50  $\mu$ g de ovoalbúmina (OVA, Sigma-Aldrich, A5503) adsorbida sobre 2 mg de hidróxido de aluminio (Sigma-Aldrich, 23918-6) en solución salina. Los ratones se expusieron mediante instilación intranasal (i.n.) de 10  $\mu$ g de OVA en 25  $\mu$ l de solución salina (12,5  $\mu$ l/nare) o de solución salina solamente para el ratón de control los días 5, 6 y 7 bajo anestesia (50 mg/kg de ketamina y 3,3 mg/kg de xilacina, i.p.). Dos horas antes de cada exposición a OVA se administraron el péptido de la SEC ID NO 16 o ALB409-423 en solución salina i.p. (16  $\mu$ mol/kg). El lavado broncoalveolar (BAL) y el recuento de células diferenciales se llevó a cabo 24 horas después de la última exposición a OVA, tal como ha sido ya informado (Rebber y otros, 2012).

#### Espectroscopia de RMN

20 Para la captación de espectros de RMN, se preparó una solución 1 mM del péptido de la SEC ID NO 16 en fosfato sódico 10 mM en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 10:1, ajustado a un pH final de 7,0 con HCl. Los espectros RMN-<sup>1</sup>H TOCSY y NOESY se registraron a 800 MHz, 600 MHz y 500MHz sobre espectrómetros Bruker. Los espectros captados en el equipo a 800 MHz se usaron debido a su mejor calidad. Los espectros se referenciaron a TSP externo, y se registraron usando el procedimiento States-TPPI que incorpora la secuencia de pulsos 3-9-19 de compuerta para la supresión de agua (Jeener y otros, 1979). En general, se capturaron 256 valores  $t_1$  de evolución en el tiempo igualmente espaciados, promediándose 16 transitorios de 2048 puntos. Las matrices de datos de dominio en función del tiempo fueron 25 todas rellenas con ceros a 4K en ambas dimensiones, proporcionando, de esta forma, una resolución digital de 3,41 Hz/pt. Antes de la transformación de Fourier, se aplicó una ventana Lorentz-Gauss con diferentes parámetros tanto para las dimensiones  $t_1$  como  $t_2$  para todos los experimentos. Los espectros NOESY (Griesinger y otros, 1988) se obtuvieron con tiempos de mezclado (0,3 segundos) y los experimentos TOCSY (Braunschweiler y otros, 1983; Rucker y otros, 1989) se registraron usando pulsos de mezclado DIPS12 de 0,060 segundos (Bartles y otros, 1995). 30 Tanto los experimentos NOESY como TOCSY se realizaron a 298 K.

#### Asignación de picos de cruce NOESY y cálculo de estructura

35 La dispersión de desplazamiento químico de <sup>1</sup>H en espectros de RMN permitió una asignación no ambigua correcta de todas las resonancias NH- y CH-alfa, así como la vasta mayoría de protones de cadenas secundarias (97,7%), usando metodología estándar, combinando espectroscopía TOCSY y NOESY. Las conexiones de la cadena principal secuencial se establecieron siguiendo la NOEs CH<sub>i</sub>-NH<sub>i+1</sub> y la NH<sub>i</sub>-NH<sub>i+1</sub>.

40 La lista de picos para los espectros NOESY registrados con un tiempo de mezclado de 0,30 segundos se generaron mediante selección del pico interactivo usando el software XEASY (Schäfer, N, 1996). Los volúmenes de picos cruzados se determinaron mediante la rutina de integración de pico automatizada, *peakint* (Engh, 1991) implementada en XEASY. Para el cálculo de la estructura, se sometieron un conjunto de 407 picos cruzados NOESY a cálculos CYANA (Herrmann y otros, 2002; Guntert y otros, 2003; Guntert y otros, 2004). De este conjunto de señales, 400 (98,2%) fueron asignaron como no ambiguas por el programa CYANA. Las 20 seleccionadas como mejor conformadas mostraron bajos valores de función diana CYANA (con función diana media: 0,056). La estructura tridimensional del péptido de la SEC ID NO 16 se determinó usando el protocolo estándar de asignación combinada de NOE automática y el cálculo de estructura del programa CYANA (versión 2.1) (Herrmann y otros, 2002; Guntert y otros, 2003; 45 Guntert y otros, 2004). Se siguieron siete ciclos de asignación combinada de NOESY automática y cálculos de estructura para un cálculo de la estructura final. El cálculo de la estructura comenzó en cada ciclo a partir de 100 conformadores aleatorios y se usó el programa de reasociación simulada estándar. Los 20 conformadores con los valores de función diana CYANA final más bajos se retuvieron para análisis y pasaron al ciclo siguiente. Se aplicó la combinación restringida en el primero de los dos ciclos a todas las restricciones de distancia NOE, abarcando al menos tres restos, con el fin de minimizar la distorsión estructural por restricciones de distancia erróneas. Se usaron 50 los parámetros covalentes de Engh y Huber. Las restricciones que implicaron grupos degenerados de protones (es decir, metilos), accidentalmente degenerados a metilenos, y protones de anillos aromáticos equivalentes, se expandieron dentro de restricciones de distancia ambiguas entre todos los pares correspondientes de átomos de hidrógeno. Los pares diastereotópicos no degenerados se permutaron periódicamente por valores de funciones diana 55 mínimos durante la reasociación simulada en los ciclos 1-7. Se aplicaron temporalmente escasas restricciones sobre pares de ángulos de torsión y sobre ángulos de torsión de cadenas secundarias entre átomos de carbono tetrahédricos durante las fases de alta temperatura y enfriamiento del programa de reasociación simulado con el fin de favorecer las regiones permitidas de la gráfica de Ramachandram y las posiciones rotámeras aleatoriamente distribuidas,

respectivamente. La lista de enlaces de distancia superior para el cálculo estructural final está exclusivamente formada por enlaces de distancia superior asignadas de manera no ambigua y no requiere la posible permutación de pares diastereotópicos.

#### Estabilidad al suero del péptido de la SEC ID NO16

- 5 Se inoculó suero humano con 1mM del péptido de la SEC ID NO 16 o derivados mejorados y se incubó a 37°C. Se tomaron muestras cada dos horas e inmediatamente se almacenaron a -20°C. Para comprobar la actividad antivírica del péptido incubado en suero, se agregaron 10 µl de las muestras a 5 x 10<sup>4</sup> /100 µl de células TZM-bl. A continuación, las células se infectaron con 90 µl VIH-1 NL4-3, lo que dio como resultado una dilución de 20 veces de las mezclas de péptido y suero. La infectividad se midió a los 2 días después de la infección usando el kit Tropix Gal-Screen de una etapa. Para comprobar el efecto de los inhibidores de proteasa sobre la degradación del péptido de la SEC ID NO 16, el suero se suplementó primeramente con un cóctel de inhibidor de proteasa (1X Complete mini (Roche) y 1 mM de PMSF (Roche)) antes de agregar 1 mM del péptido de SEC ID NO 16.

#### ELISA indirecto para la detección y cuantificación del péptido de la SEC ID NO 16

- 15 Se generó un antisuero policlonal contra el péptido de la SEC ID NO 16 mediante inmunización de gallinas con el péptido de la SEC ID NO 16 (Davids Technologie GmbH, Regensburg), y se generó un anticuerpo monoclonal mediante inmunización de ratones (ViroPharmaceuticals GmbH & CoKG, Hannover) tal como se ha descrito en otra parte (Referencias). Para caracterizar la reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales y monoclonales, 100 µl del péptido de la SEC ID NO 16, de derivados del mismo (20 µM), o de HSA (Sigma) diluidos seriadamente se recubrieron sobre placas ELISA (Corning costar) durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron 20 veces con 200 µl de tampón de lavado ELISA (KPL) y se trataron con 150 µl de albúmina de suero bovino al 1% (BSA) en PBS para bloquear las superficies no recubiertas. Después de lavados adicionales, se agregaron 100 µl de anticuerpos mono- o policlonales diluidos de seriadamente y se incubaron durante 1 hora. A continuación, las placas se lavaron y se agregaron 100 µl de Abs (anti-pollo o anti-ratón) secundarios conjugados con peroxidase de rábano picante (HRP) durante otra 1 hora. Después de esto, las placas se lavaron 5 veces y se agregaron 100 µl de Sure-Blue TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate (KPL). El revelado del color se interrumpió mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N a cada pocillo y las densidades ópticas se registraron usando un lector de placas de microvaloración (Molecular Devices; VMax Kinetic Microplate Reader) a 450 nm, con 650 nm como una referencia.

#### Referencias

- 30 Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M., y Berger, E.A. CC-CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP1beta receptor as a fusión cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, vol. 272, págs. 1955-1958, (1996).
- Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., y Springer, T.A., The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, vol. 382, págs. 829-833, (1996).
- 35 Brelot, A., Heveker, N., Montes, M., y Alizon, M. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J. Biol. Chem.*, vol. 275, págs. 23736-23744, (2000).
- Campbell, D.J., Kim, C.H., y Butcher, E.C. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol. Rev.*, vol. 195, págs. 58-71, (2003).
- 40 Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Mamon, S., Sulton, R.E., Hill, C.M., y otros. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, vol. 381, págs. 661-666, (1996).
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., y otros. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, vol. 381, págs. 667-673, (1996).
- 45 Engh, R.A., y Huber, R. Accurate Bond and Angle Parameters for X-Ray Protein-Structure Refinement. *Acta Crystallogr.*, vol. A 47, págs. 392-400, (1991).
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., y Berger, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, vol. 272, págs. 872-877, (1996).
- Furze, R.C., y Rankin, S.M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, vol. 125, págs. 281-288, (2008).
- 50 Guntert, P. Automated NMR protein structure calculation. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 43, págs. 105-125, (2003).
- Guntert, P. Automated NMR protein structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.*, vol. 278, págs. 353-378, (2004).

- Hachet-Haas, M., Belabianian, K., Rohmer, F., Pons, F., Franchet, C., Lecat, S., Chow, KY., Dagher, R., Gizzi, P., Didier, B., Lagane, B., Kellenberger, E., Bonnet, D., Baleux, F., Haiech, J., Parmentier, M., Frossard, N., Arenzana-Seisdedos, F., Hibert, M., Galzi, JL. Small neutralizing molecules to inhibit actions of the chemokine CXCL12. *J. Biol. Chem.*, vol. 283, (nº34), págs. 23189-99, (22 Ag. 2008). Doi: 10.1074/jbc.M830947200. Epub 2008 Jun 13.
- 5 Herrman, T., Guntert, P. y Wuthrich, K. Protein NMR structure determination with automated NEO assignment using the new software CANDID and the torsión angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.*, vol. 319, págs. 209-227, (2002).
- Huang, X., Shen, J., Cui, M., Shen, L., Luo, X., Ling, K., Pei, G., Jiang, H., y Chen, K. Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor. *Biophys. J.*, vol. 84, págs. 171-184, (2003).
- 10 Margolis, L., y Shattock, R. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the "gatekeeper" problema resolved?. *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 4, págs. 312-317, (2006).
- Möhle, R., y Drost, A.C. G protein-coupled receptor crosstalk and signaling in hematopoietic stem and progenitor cells. *Ann. N Y Acad. Sci.*, vol. 1266, págs. 63-67, (2012).
- 15 Mopps, B., Frodl, R., Rodewald, HR., Baggiolini, M., Gierschik, P. Two murine homologues of the human chemokine receptor CXCR4 mediating stromal cell-derived factor 1alpha activation of Gi2 are differentially expressed in vivo. *Eur. J. Immunol.*, vol. 27, (nº8), págs. 2102-12, (Ag. 1997).
- Mothy, M., y Ho, A.D. In and out of niche: perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.*, vol. 39, págs. 723-729, (2011).
- 20 Moon, K.A., Kim, S.Y., Kim, T.B., Yun, E.S., Park, C.S., Cho, Y.S., Moon, H.B., y Lee, K.Y. Allergen-induced CD11b+ CD11c(int) CCR3+ macrophages in the lung promote eosinophilic airway inflammation in a mouse asthma model. *Int. Immunol.*, vol. 19, págs. 1371-1381, (2007).
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., y Kishimoto, T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, vol. 382, págs. 635-638, (1996).
- 25 Ratajczak, M.Z., y Kim, C. The use of chemokine receptor agonists in stem cell mobilization. *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 12, págs. 287-297, (2012).
- Schäfer, N. Thesis, ETH Zürich, (1966).
- Schroeder, M.A., y DiPersio, J.F., Mobilization of hematopoietic stem and leukemia cells. *J. Leukoc. Biol.*, vol. 91, págs. 47-57, (2012).
- 30 Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., y otros. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, vol. 383, págs. 591-594, (1998).
- 35 Valenzuela-Fernández, A., Palanche, T., Amara, A., Magerus, A., Altmeyer, R., Delaunay, T., Virelizier, JL., Baleux, F., Galzi, JL., Arenzana-Seisdedos, F. Optimal inhibition of X4 HIV isolates by the CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha requires interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, vol. 276, (nº28), págs. 26550-8, (13 Jul 2001). Epub 2001 14 May.
- Zhou, N., Luo, Z., Luo, J., Liu, D., Hall, Y.W., Pomerantz, R.J., y Huang, Z. Structural and functional characterization of human CXCR4 as a chemokine receptor and HIV-1 co-receptor by mutagenesis and molecular modeling studies. *J. Biol. Chem.*, vol. 276, págs. 42826-42833, (2001).
- 40 Zou, Y.R., Kottman, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I, y Littman, D.R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, vol. 393, págs. 595-599, (1998).

## LISTADO DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; Pharis Biotec GmbH

45 &lt;120&gt; Péptidos con actividades antagonistas contra CXCR4 natural

&lt;130&gt; 141275wo

<150> EP13171718.3

<151> 2013-06-12

<160> 28

5

<170> PatentIn versión 3,3

<210> 1

<211> 11

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

15

<400> 1

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

<210> 2

<211> 12

20

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

25

<400> 2

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

<210> 3

<211> 12

30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

35

<400> 3

ES 2 699 576 T3

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

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

10 <400> 4

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

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

20 <400> 5

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

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

30 <400> 6

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

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

35 <213> artificial

ES 2 699 576 T3

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

5 <400> 7

Ile	Val	Arg	Trp	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Cys
1				5					10		

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

15 <400> 8

Ile	Val	Arg	Trp	Thr	Cys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser
1				5					10		

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

20 <213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

25 <400> 9

Ile	Val	Arg	Trp	Cys	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser
1				5					10		

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

30 <213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

35 <400> 10



ES 2 699 576 T3

Ile Val Arg Trp Ser Lys Lys Val Pro Gln Cys Ser  
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

10 <400> 11

Ile Val Arg Trp Ser Lys Lys Val Pro Cys Val Ser  
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> péptido obtenido de la secuencia de albúmina humana

20 <400> 12

Ile Val Arg Trp Ser Lys Lys Val Cys Gln Val Ser  
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

30 <400> 13

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

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

35 <213> artificial

ES 2 699 576 T3

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

5 <400> 14

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

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

15 <400> 15

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

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

20 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

25 <400> 16

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

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

30 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

35 <400> 17

ES 2 699 576 T3

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

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

10 <400> 18

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

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

20 <400> 19

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

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

30 <400> 20

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

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

35 <213> artificial

ES 2 699 576 T3

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

5 <400> 21

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

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

15 <400> 22

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

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

20 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

25 <400> 23

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val  
1 5

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

30 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

35 <400> 24

ES 2 699 576 T3

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

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

10 <400> 25

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

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

20 <400> 26

Leu Val Arg Tyr Ala Lys Lys Val  
1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

30 <400> 27

Leu Ala Arg Tyr Thr Lys Lys Val  
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

35 <213> artificial

<220>

<223> péptidos obtenidos de la secuencia de albúmina humana

5 <400> 28

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido eficaz en el bloqueo de la infección del VIH-1 NL4-3 X4-trópico, con un valor IC<sub>50</sub> menor de 50 µM que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en

IVRFTKKVPQVS, 4081-419 Y411F  
 IVRWTKKVPQVS, 4081-419 Y411W  
 IVRYTKCVPQVS, 4081-419 K414C  
 IVRYSKKVPQC, 4081-418 SC  
 IVRWTKKVPQVC, 4081-419 WC01  
 IVRWTKKVPQVS, 4081-419 WC02  
 IVRWCKKVPQVS, 4081-419 WC03  
 IVRWSKKVPQCS, 4081-419 WSC01  
 IVRWSKKVPCVS, 4081-419 WSC02  
 IVRWSKKVCQVS, 4081-419 WSC03  
 IVRYTCKVCQVS, 4081-419 WSC03  
 IVRYTKKVPQCS, 4081-419 V418C.

- 5 2. Un péptido dímero que consiste en dos péptidos monoméricos idénticos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los péptidos diméricos están ligados entre sí mediante un puente cisteína que está formado entre los péptidos monoméricos.
- 10 3. Un péptido de la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento de enfermedades neurológicas, en particular apoplejía, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, el tratamiento del síndrome WHIM y artritis reumatoide; para el tratamiento de cánceres, en particular cánceres que muestran el receptor CRCX tal como cáncer del hígado, páncreas, próstata o cáncer de mama; para el tratamiento de la falta de movilización, proliferación y migración de células madre, activación de la célula T así como soporte de inmunoblastos tal como CTL/PD-1; para el tratamiento de antifibrosis; tratamiento o prevención de cicatrices; para el tratamiento de trastornos cardiológicos, en particular insuficiencia cardíaca; para el tratamiento de trastornos metabólicos, en particular diabetes.
- 15 4. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento de trastornos de hematopoyesis, en particular para soporte de la movilización, proliferación y migración de células madre; en el tratamiento de heridas, en particular heridas causadas por quemaduras; para el tratamiento de enfermedades víricas, en particular infecciones con VIH-1, VIH-2, *Cytomegalo virus*, *Herpes simplex virus* (tipo 1 y 2), *Varicella zoster virus*, *Hepatitis A* y *Hepatitis B virus*, *Influenza virus*, *Polio virus*, *Rhino virus*, *Rubella virus*, *Measles virus*, *Rabies virus*, *Rous sarcoma virus*, *Epstein-Barr virus*; y para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias y hongos, en particular *Pseudomonas*, *Candida*, *S. aureus*; para el tratamiento de procesos infecciosos, procesos infecciosos anormales, tratamiento de trastornos del crecimiento, tratamiento de enfermedades neuronales, trastornos de la cascada de coagulación de la sangre y hematopoyesis, enfermedades vasculares, enfermedades del sistema inmune, y para mejorar la cicatrización de heridas y huesos.
- 20 5. Un procedimiento para la fabricación de al menos uno de los péptidos de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 mediante síntesis de fase sólida.
- 25 6. Un procedimiento de fabricación de al menos uno de los péptidos de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que los péptidos monoméricos se proporcionan y acoplan bajo condiciones de reacción oxidantes, las cuales son capaces de oxidar los enlaces SH para proporcionar enlaces -S-S-.
- 30