

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 361**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2008** E 17192177 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** EP 3275894

54 Título: **Un polipéptido antagonista del receptor 4 de quimiocina CXCR4**

30 Prioridad:

**03.07.2007 DE 102007030904**

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

**01.07.2020**

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:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 770 361 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**

Un polipéptido antagonista del receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4)

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un polipéptido (proteína) antagonista del receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) que inhibe la infección de virus dependientes de CXCR4 como el VIH-1 y bloquea la migración de células tumorales mediada por la unión de CXCL12 a CXCR4: fragmento de albúmina antiviral circulante humana (ALB408-423) y su uso terapéutico y diagnóstico. La invención se refiere a la forma de origen natural de ALB408-423 y fragmentos derivados de esta y/o análogos o derivados, y finalmente a un medicamento que contiene dichos péptidos naturales, recombinantes y sintéticos para su uso en indicaciones medicinales y para su uso como agente de diagnóstico. La  
10 invención incluye formas modificadas y derivados de ALB408-423 que tienen una efectividad terapéutica particularmente favorable. Además, se refiere a 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, con fines de diagnóstico o terapéuticos, especialmente en enfermedades virales para el tratamiento de infecciones por VIH-1 y VIH-2, así como para el tratamiento de enfermedades neoplásicas para  
15 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 quimiocinas se expresan en la superficie de ciertas células, que interactúan con las citoquinas llamadas quimiocinas. El receptor 4 de quimiocinas CXC (CXCR4) es un receptor acoplado a la proteína G que  
20 transduce señales de su ligando endógeno, la quimiocina CXCL12 (factor 1 derivado de células estromales, SDF-1). Después de la interacción de CXCR4/CXCL12, los flujos de iones de calcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) se activan. Esto provoca respuestas celulares, incluida la quimiotaxis que permite que las células viajen dentro del organismo. CXCR4 se expresa en células mieloides, linfocitos T, linfocitos B, células epiteliales, células endoteliales y células dendríticas. La quimiocina CXCL12 es el único ligando agonista conocido de CXCR4. La interacción entre CXCL12 y  
25 CXCR4 juega un papel crucial en la migración de células progenitoras durante el desarrollo embrológico de los sistemas cardiovascular, hemopoyético o nervioso central. También se sabe que esta interacción está involucrada en varias enfermedades, como infección por VIH/SIDA, metástasis de células cancerosas, progresión de células leucémicas, fibrosis pulmonar y artritis reumatoide. Se supone que esta interacción puede ser un objetivo terapéutico crítico en todas estas enfermedades. Se supone que las sustancias que interfieren con la señalización de  
30 CXCR4/CXCL12 tienen potencial farmacológico, por ejemplo, en la terapia contra el VIH/SIDA, o para prevenir procesos de migración celular involucrados en metástasis de cáncer, leucemia y enfermedades inflamatorias tales como fibrosis pulmonar, artritis reumatoide o asma (revisado en Tsutsumi et al., 2007, Peptide Science 88: 279-289). A diferencia de los agonistas de receptores como CXCL12 que inducen respuestas celulares, los antagonistas de receptores son ligandos o fármacos que no inducen una respuesta biológica, es decir, migración celular o  
35 señalización de  $Ca^{2+}$ , al unirse a su receptor. Los antagonistas de los receptores son fármacos útiles que ya están en uso clínico (por ejemplo, antagonistas de angiotensina, antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, antagonistas serotoninérgicos o antagonistas CCR5) que pueden bloquear la infección por VIH-1 (antagonista CCR5) o disminuir las respuestas celulares mediadas por agonistas. La interacción de los antagonistas del receptor con el receptor inhibe la función de un agonista. La mayoría de los antagonistas de fármacos alcanzan su potencia al competir con ligandos o  
40 sustratos endógenos en sitios de unión sobre los receptores estructuralmente definidos.

Ya se ha demostrado in vitro e in vivo que los antagonistas de CXCR4 bloquean la migración de células cancerosas y, por lo tanto, la metástasis. CXCR4 se expresa sobre la superficie de una variedad de células (células mieloides, linfocitos T, linfocitos B, células epiteliales, células endoteliales y células dendríticas), así como en 23 tipos  
45 diferentes de células cancerosas. La interacción CXCL12-CXCR4 está involucrada en metástasis de varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, riñón, próstata, pulmón y páncreas, y melanoma, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de ovario y tumores cerebrales malignos (revisado en Tsutsumi et al., 2007, Peptide Science 88: 279-289). Se ha demostrado que los antagonistas de CXCR4 como el análogo de T140 suprimen la migración e invasión de células pancreáticas o la migración de células de carcinoma de mama in vitro e in vivo inducidas por CXCL12 (revisado en Tsutsumi et al., 2007, Peptide Science 88: 279-289). También se ha  
50 demostrado que los antagonistas de CXCR4 suprimen eficazmente la invasión y adhesión del cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) in vitro (revisado en Tsutsumi et al., 2007, Peptide Science 88: 279-289), confirmando la participación de la interacción de CXCL12-CXCR4 en la metástasis de SCLC. La interacción de CXCR4/CXCL12 también está involucrada en el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) precursora-B (pre-B) y la leucemia linfocítica crónica (CLL). Los antagonistas de CXCR4 también atenúan la migración de las células ALL pre-B  
55 (revisado en Tsutsumi et al., 2007, Peptide Science 88: 279-289). Además, se ha demostrado que la artritis reumatoide es causada por CXCR4 que expresa la acumulación de células T CD4+ con memoria en la membrana sinovial inflamada. La concentración de CXCL12 en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide es altamente elevada atrayendo por lo tanto células T con memoria. Las moléculas antagonistas de CXCR4 bloquean la migración a la membrana sinovial de las células T con memoria (revisado en Tsutsumi et al., 2007, Peptide  
60 Science 88: 279-289).

Los antagonistas de CXCR4 no solo inhiben la unión del agonista CXCL12 a CXCR4 sino que también evitan la interacción de la glucoproteína gp120 del VIH con CXCR4, inhibiendo así la infección por el virus. Los virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2) usan CD4 expresado en la superficie celular como receptor primario y los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4 como correceptores para la entrada celular. Los virus que infectan las células a través de CD4 y CXCR4 se denominan trópico CXCR4 (X4), variantes de VIH-1 que usan CD4 y CCR5 como trópico R5, y aquellos que pueden usar ambos correceptores como trópico dual. Las variantes de VIH-1 trópico X4 solo se pueden encontrar en aproximadamente el 50 % de todos los pacientes con SIDA, mientras que las variantes de VIH trópico R5 predominan en etapas más tempranas y en la fase asintomática de la infección por VIH-1. Se ha demostrado que la infección por VIH-1 trópico X4 puede bloquearse in vitro y en humanos infectados por VIH-1 mediante el tratamiento de células o pacientes con antagonistas de CXCR4 como AMD3100. Curiosamente, Maraviroc, un antagonista de CCR5, es el primer fármaco clínico aprobado en la terapia del SIDA que bloquea la infección de las variantes del VIH-1 trópico R5 (revisado por Tsibris and Kuritzkes, 2007, Annual Review of Medicine 58: 445-459).

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

Gerlach, L. O. et. al. reporta en J Biol Chem. 2001 Apr 27;276(17):14153-60 sobre las interacciones moleculares de los antagonistas no peptídicos de ciclam y biciclam con el receptor de quimiocinas CXCR4. El antagonista del receptor CXCR4 no peptídico AMD3100, que es un potente bloqueador de la entrada de células del virus de inmunodeficiencia humana, es un biciclam simétrico compuesto por dos fracciones idénticas de 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (ciclam) conectados por un conector de fenilenobismetileno relativamente rígido. En base a la fuerte propensión conocida de la fracción ciclam para unir a los grupos de ácido carboxílico, la mutagénesis del receptor identificó a Asp(171) y Asp(262), ubicadas en el dominio transmembrana (TM) IV y TM-VI, respectivamente, en cada extremo de la grieta principal de unión al ligando del receptor CXCR4, como esencial para la capacidad de AMD3100 de bloquear la unión del factor derivado de células del estroma del ligando de quimiocina (SDF)-1-alfa, así como la unión del anticuerpo del receptor 12G5. La fracción de ciclam libre no tuvo efecto sobre la unión de 12G5, pero bloqueó la unión de SDF-1-alfa con una afinidad de 3 micras a través de la interacción con Asp(171). Se encontró que el efecto sobre la unión de SDF-1-alfa de una serie de análogos de biciclam con enlazadores químicos variables dependía solo de Asp(171), es decir, los biciclams actuaban como el ciclam aislado, o en Asp(171) y Asp(262), es decir, actuaron como AMD3100, dependiendo de la longitud y la naturaleza química del conector entre las dos fracciones de ciclam. Se encontró una correlación positiva entre la dependencia de estos compuestos de Asp (262) para la unión y su potencia como agentes contra el virus de inmunodeficiencia humana. Se concluye que AMD3100 actúa sobre el receptor CXCR4 mediante la unión a Asp(171) en TM-IV y Asp(262) en TM-VI con cada una de sus fracciones ciclam, y se sugiere que parte de su función está asociada con una restricción conformacional impuesta sobre el receptor por el conector de fenilenobismetileno de conexión.

Kazmierski Wieslaw M et. al. informan en Chemical Biology and Drug Design, vol. 67, No. 1, Jan. 2006, pp. 13-26 sobre "Peptide, peptidomimetic and small-molecule drug discovery targeting HIV-1 host-cell attachment and entry through gp120, gp41, CCR5 and CXCR4". Esta revisión destaca ejemplos seleccionados de péptidos, peptidomiméticos y descubrimiento de fármacos de molécula pequeña direccionado al VIH-1 para avanzar en nuevos fármacos contra el VIH que inhiben las etapas iniciales del ciclo viral; específicamente acoplamiento y entrada. Algunos de estos enfoques han culminado en el desarrollo de fármacos basados en péptidos, mientras que otros han explotado los péptidos como herramientas que permiten la identificación de compuestos candidatos de molécula pequeña. Ambos enfoques conceptualmente diferentes han facilitado la optimización principal de moléculas con propiedades farmacológicas contra el VIH complementarias y a menudo sorprendentes, respaldando su papel en el desarrollo farmacéutico. Además, tales moléculas permitieron la elucidación mecánica de la conexión y entrada viral y proporcionaron información adicional para lograr el perfil de fármaco deseado.

### Sumario de la invención

La invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las Seq ID NO 9 a 15, Seq ID NO 20, Seq ID NO 26, 27, Seq ID NO 29 y Seq ID NO 32 y sus derivados amidados, acetilados, sulfatados, fosforilados y/o glicosilados.

Otros péptidos descritos en la presente memoria también se refieren a los péptidos de la invención en los que se han intercambiado, eliminado o agregado en la secuencia uno o varios residuos de aminoácidos, o se han introducido modificaciones químicas en aminoácidos individuales de los péptidos de la invención que tienen similares o la misma actividad biológica o farmacológica de los péptidos de la invención. En particular, esos péptidos se refieren a que pueden obtenerse fácilmente intercambiando aminoácidos de la secuencia de una manera conservadora, lo que significa intercambiar aminoácidos hidrófobos contra hidrófobos o aromáticos contra otros aminoácidos aromáticos o aminoácidos básicos contra otros aminoácidos básicos y similares. Esto es bien conocido por la persona experimentada.

La presente invención también divulga péptidos retro-inversos de los péptidos de la invención, así como otros derivados que estabilizan la unión peptídica contra las peptidasas.

5 El término derivado significa todas las longitudes de fragmentos que incluyen truncamientos en el terminal N y C, ALB408-423 que contiene sustituciones de residuos de aminoácidos que incluyen residuos de aminoácidos D y residuos de aminoácidos modificados, así como péptidos que contienen uniones disulfuro y extensión en el terminal N y C.

10 Otro tema de la presente invención son los polinucleótidos que codifican los péptidos 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 usarán para la expresión de péptidos recombinantes en células pro o eucariotas, estudios de mutagénesis, clonación en vectores de interés, en particular aquellos que pueden usarse para enfoques de transferencia génica.

15 Un tema adicional 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 los péptidos de la invención se usarán para la expresión de péptidos recombinantes en células pro o eucariotas, estudios de mutagénesis y transferencia de genes particulares en células eucariotas.

20 Otro tema de la presente invención es una célula huésped manipulada genéticamente que contiene el vector de acuerdo con la invención. Un ALB408-423 manipulado genéticamente o un derivado relacionado que expresa células transgénicas puede usarse para enfoques de terapia génica que permitan la expresión y secreción de ALB408-423 y derivados relacionados en individuos que necesitan antagonistas de CXCR4, en particular pacientes con cáncer y SIDA.

Se divulga además un anticuerpo dirigido contra los polipéptidos de acuerdo con la invención. Esos anticuerpos son útiles para detectar ALB408-423 y péptidos relacionados en muestras corporales como sangre, suero, plasma en ELISA, RIA o fluorescencia inmune para fines de diagnóstico.

25 Los péptidos de la invención pueden usarse en el tratamiento de pacientes que necesitan los péptidos de la invención.

30 Además, se divulga el tratamiento de pacientes que necesitan inhibición de ALB408-423 mediante la administración de cantidades terapéuticas de un antagonista/inhibidor de los péptidos de la invención. ALB408-423 y sus derivados son antagonistas de CXCR4 que permiten tratar varias enfermedades como la infección por VIH/SIDA, metástasis de células cancerosas, progresión de células leucémicas, fibrosis pulmonar y artritis reumatoide y otras enfermedades cancerosas e inflamatorias.

Una formulación galénica que consiste en polipéptidos de la invención también es tema de la invención.

También se divulga en la presente memoria el tratamiento de pacientes en el que se logra un efecto terapéutico del polipéptido administrando ADN que codifica los péptidos de la invención y su expresión in vivo en el paciente.

35 El péptido de la invención puede proporcionarse mediante un procedimiento que comprende una extracción de hemofiltrado mediante extracción de intercambio catiónico seguido de elución de sustancias adsorbidas, cromatografía renovada de intercambio catiónico del extracto que contiene los péptidos y cromatografía fraccional de fase inversa.

40 Como alternativa, el procedimiento de fabricación de los péptidos de acuerdo con la invención se puede realizar mediante síntesis en fase sólida en términos de una síntesis de Merrifield o síntesis en fase líquida mediante procedimientos conocidos per se para la persona experimentada, utilizando aminoácidos protegidos, y su purificación.

Un procedimiento adicional de fabricación de los péptidos de acuerdo con la invención emplea procedimientos de expresión heteróloga conocidos por la persona experimentada, utilizando vectores biotecnológicos comunes.

45 También un sujeto de la presente invención es un agente de diagnóstico que contiene el ácido nucleico o ARNm que codifica los péptidos de la invención. El agente de diagnóstico de la invención contiene los péptidos o polinucleótidos de la invención para su uso en sistemas de prueba para ensayar los niveles de esta sustancia en muestras como tejido, plasma, orina y líquido cefalorraquídeo.

50 Se divulga que los agentes de diagnóstico y los sistemas de prueba que detectan los péptidos de la invención se usan para analizar tejidos, plasma, orina y de esta sustancia mediante procedimientos de espectrometría de masas, tales como MALDI-MS o ESI-MS, en relación con la preparación de la muestra por RP-HPLC, precipitación de proteínas y/o extracción en fase sólida.

El sujeto de la invención es también un agente de diagnóstico que contiene los péptidos de la invención como marcadores para enfermedades virales, infecciones bacterianas y fúngicas, procesos inflamatorios y neoplásicos, y

como marcadores en procesos inflamatorios, reacciones inflamatorias alteradas, enfermedades tumorales, trastornos de crecimiento, enfermedades del sistema inmune y como marcadores en enfermedades óseas.

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

10 Los péptidos, los polinucleótidos y la formulación galénica de acuerdo con la invención pueden usarse para el tratamiento de enfermedades virales, especialmente debido al VIH-1, VIH-2, citomegalovirus, virus del herpes simple (tipos 1 y 2), virus de varicela zoster, virus de hepatitis A y hepatitis B, virus de la influenza, virus del polio, rinovirus, virus de la rubéola, virus del sarampión, virus de la rabia, virus del sarcoma de Rous o virus de Epstein-Barr, y para el tratamiento de enfermedades tumorales, enfermedades neuronales y enfermedades vasculares.

La divulgación se describe con más detalle utilizando ALB408-423 como ejemplo específico. Se entiende fácilmente que de la misma manera los péptidos de la invención pueden reemplazar ALB408-423 en las siguientes descripciones.

### Descripción detallada de la invención

- 15 Las Figuras 1 A-F muestran detalles del aislamiento de ALB408-423 del hemofiltrado humano.  
La Figura 2 muestra que la fracción 31 que contiene ALB408-423 bloquea la infección por VIH-1 NL4-3.  
La Figura 3 muestra que ALB408-423 sintetizado químicamente bloquea específicamente la infección por VIH-1 trópico X4.  
La Figura 4 muestra que ALB408-423 bloquea la infección lentiviral trópico X4.
- 20 La Figura 5 representa actividades antivirales de derivados de ALB.  
La Figura 6 muestra actividades antivirales de derivados de ALB.  
La Figura 7 muestra actividades antivirales de derivados de ALB.  
La Figura 8 muestra actividades antivirales de derivados de ALB.  
La Figura 9 muestra el ensayo de citotoxicidad de derivados de ALB.
- 25 La Figura 10 muestra ALB408-423 y derivados de ALB truncados que bloquean específicamente la infección por VIH-1 trópico X4.  
La Figura 11 muestra ALB408-423 y sus derivados que inhiben la infección por VIH-1 trópico X4 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).  
La Figura 12 muestra que ALB408-423 inhibe la unión de CXCL12 a CXCR4.
- 30 La Figura 13 muestra que ALB408-423 no es un agonista de CXCR4, CCR5 o CXCR1.  
La Figura 14 muestra que ALB408-423 inhibe específicamente la movilización de Ca<sup>2+</sup> provocada por CXCL12 en células que expresan CXCR4.  
La Figura 15 muestra que ALB408-423 bloquea la internalización de CXCR4 mediada por CXCL12.
- 35 La Figura 16 muestra que la dosis ALB408-423 bloquea de forma dependiente la migración mediada por CXCL-12 de células T Jurkat.  
La Figura 17 muestra actividades antagonistas de CXCR4 de derivados de ALB.

ALB408-423 podría sorprendentemente aislarse del hemofiltrado humano mediante procedimientos cromatográficos y un ensayo biológico. La caracterización bioquímica de dicho péptido se realizó mediante espectrometría de masas que incluye un análisis completo de la secuencia de los aminoácidos.

40 El péptido tiene la siguiente secuencia de aminoácidos Seq ID NO 8:

**LVRYTKKVPQVSTPTL**

El peso molecular del péptido ALB408-423 es: 1830,2 Da

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

Sorprendentemente, el péptido es un fragmento que comprende 16 aminoácidos de la conocida albúmina sérica de proteínas plasmáticas humanas (número de acceso NP000468), que consta de 585 aminoácidos en su forma procesada. La albúmina humana es una proteína sérica monomérica soluble que tiene un peso molecular de aproximadamente 65.000 que representa más de la mitad de la proteína plasmática total (concentración: 3,5 a 5 g/dl). La función de la albúmina humana se describe predominantemente como una molécula portadora para todo tipo de sustancias hidrófobas e hidrófilas, por ejemplo, hormonas esteroides y peptídicas, ácidos grasos, vitaminas, productos farmacéuticos y cationes. Debido a su concentración sérica muy alta, contribuye sustancialmente a la estabilización del pH de la sangre, el volumen de líquido extracelular y el mantenimiento de la presión osmótica coloidal. La albúmina tiene una estructura globular estabilizada por una alta cantidad de puentes disulfuro y generalmente no está glicosilada, pero las alteraciones debidas a la acetilación, la glicosilación enzimática y la glicosilación no enzimática ocurren con frecuencia en el transcurso del envejecimiento molecular o por cambios fisiopatológicos. Es sintetizado por el hígado como pre proalbúmina que tiene 609 aminoácidos; el péptido señal con terminal N que comprende 18 aminoácidos se escinde intracelularmente al entrar en el retículo endoplásmico; otros 6 aminoácidos se eliminan en el aparato de Golgi antes de que las células hepáticas secreten la albúmina madura que comprende 585 aminoácidos. La eliminación de albúmina se realiza a través del riñón, el tracto gastrointestinal y en las células de tejido del hígado.

La secuencia peptídica de ALB408-423 comienza con el aminoácido 408 y, por lo tanto, comprende los aminoácidos 408 a 423 de la forma circulante de albúmina. Evidentemente, se produce mediante el procesamiento natural del precursor de albúmina por las proteasas correspondientes.

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

El péptido se puede obtener mediante purificación cromatográfica a partir de hemofiltrado humano (HF). El HF se obtiene en grandes cantidades durante la ultrafiltración de la sangre de pacientes renales (ejemplo 1). El HF contiene todos los péptidos y proteínas que circulan en la sangre humana con un peso molecular inferior a 30 kDa. Los péptidos y proteínas en HF se extrajeron mediante cromatografía de intercambio catiónico. Los péptidos y proteínas unidos a la columna se eluyeron con sistemas tampones de diversos valores de pH y los eluatos se sometieron a cromatografía de fase inversa (ejemplo 1). Para identificar las fracciones que bloquean la infección por VIH-1, las fracciones de péptidos se disolvieron en PBS y se agregaron a las células indicadoras permisivas de VIH. Luego, las células se infectaron con VIH-1 trópico CXCR4 y las tasas de infección se determinaron tres días después de la infección (dpi) (ejemplo 1). Una fracción mostró una potente actividad anti VIH y se sometió a rondas adicionales de purificación cromatográfica y ensayos de inhibición del VIH destinados a identificar el péptido biológicamente activo (ejemplo 1). Después de cuatro rondas de purificación, la espectroscopía de masas de la fracción activa 31 reveló un péptido único con un peso molecular de 1830 Da (ejemplo 2). Los análisis de secuencia dieron como resultado la identificación de LVRYTKKVPQVSTPTL y la comparación de secuencias mostró una homología del 100 % con la proteína sérica altamente abundante "Albúmina de suero humano; (ALB)" que abarca los residuos de aminoácidos 408-423 (ALB408-423) (ejemplo 2). La prueba de actividad se demostró ya que el péptido sintetizado químicamente (ejemplo 3) bloquea de forma dependiente de la dosis la infección por VIH-1 trópico X4 (ejemplo 4). ALB408-423 bloquea específicamente las variantes de VIH-1 trópico X4, pero no tiene ningún efecto sobre la infección por VIH-1 trópico R5 (ejemplos 4 y 5) en las células indicadoras. ALB408-423 también suprimió la infección de VIH-2 trópico X4 (ejemplo 5). Los datos obtenidos de un estudio de relación de actividad de estructura (SAR) destinado a identificar residuos cruciales para la actividad antiviral se resumen en el ejemplo 6 y muestran que la integridad del terminal N de ALB408-423 es importante para su actividad antiviral. Por el contrario, los truncamientos en el terminal C de hasta 6 residuos de aminoácidos no anulaban la actividad antiviral. El estudio SAR también permitió identificar derivados de ALB408-423 como ALB408-419 o ALB L408I-419 que muestran una mayor actividad antiviral en comparación con ALB408-423 de tipo salvaje (ejemplo 6). Ninguno de los derivados de ALB es citotóxico (ejemplo 7). ALB408-423, ALB408-419 y ALB L408I-419 bloquearon la infección de forma dependiente de la dosis, de una variedad de variantes de VIH-1 trópico X4 pero no trópico R5 en células indicadoras (ejemplo 8) o células mononucleares sanguíneas primarias (ejemplo 9). Todos estos datos indican una interacción específica de ALB408-423 o sus derivados con el correceptor del VIH CXCR4.

Utilizando técnicas basadas en fluorescencia se pudo demostrar que ALB408-423 se une e interactúa directamente con CXCR4 evitando así la unión de CXCL12, el agonista natural de CXCR4 (ejemplos 10-12). ALB408-423 o sus derivados por sí solos no inducen la movilización de  $Ca^{2+}$  a través de CXCR4 u otro receptor de quimiocinas 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, la migración celular mediada por CXCL12 (ejemplo 13) y la internalización del receptor CXCR4 también podría bloquearse proporcionando evidencia adicional de que ALB408-423 es un antagonista de CXCR4 (ejemplo 12). Tomados en conjunto, ALB408-423, se identificó un fragmento de albúmina de suero humano mediante el cribado de una biblioteca de péptidos derivados de HF usando un ensayo de inhibición de infección por VIH-1. El péptido sintetizado químicamente y los derivados de este bloquean de forma dependiente la infección por VIH-1 y VIH-2 trópico X4 mediante una interacción directa con el receptor CXCR4. ALB408-423 y sus derivados actúan de forma antagónica ya que no median las respuestas celulares y suprimen la actividad de CXCL12, el agonista de CXCR4 de origen natural. Estos datos son evidencia de que ALB408-423 es el primer

antagonista humano de CXCR4. ALB408-423 y sus derivados podrían ser útiles en el tratamiento de individuos infectados con el VIH-1 trópico X4, para prevenir metástasis de cáncer e interferir con enfermedades inflamatorias crónicas donde la señalización CXCR4/CXCL12 está involucrada y suprime la señalización mediada por CXCL12 a través de CXCR4.

5 El péptido y sus derivados de acuerdo con la reivindicación 1 y su ADNc y su gen pueden emplearse como medicamentos. Su actividad biológica corresponde a las de inhibidoras de virus, inhibidoras de la migración de células cancerosas y sustancias antagonistas de CXCR4. ALB408-423 se une específicamente a CXCR4 evitando así la infección de las variantes de VIH-1 trópico CXCR4 y la unión del agonista natural de CXCR4 CXCL12. El péptido de acuerdo con la invención puede administrarse de la manera habitual para péptidos en una ruta parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, tópica local, subcutánea o bucal. La cantidad de péptido a administrar es de 1 µg a 1 g por dosis unitaria por día. La actividad del péptido de acuerdo con la invención puede inhibirse administrando inhibidores/antagonistas apropiados.

15 Un agente de diagnóstico puede contener anticuerpos poli o monoclonales contra el péptido de acuerdo con la invención, opcionalmente en una forma marcada con fluorescencia o marcada radiactivamente, para emplearse en un ELISA o RIA conocido per se. El agente de diagnóstico de acuerdo con la invención contiene ADN, ARN y/o APN, opcionalmente en una forma modificada y/o etiquetada, para su uso en sistemas de prueba conocidos por la persona experimentada, tales como PCR o huellas digitales. Alternativamente, el agente de diagnóstico consiste en un procedimiento de espectrometría de masas (MALDI o ESI-MS) que detecta inequívocamente la sustancia cualitativa y cuantitativamente a partir de sus iones de carga sencilla o múltiple (iones parentales o iones de producto después de la fragmentación de MS-MS) después de una preparación y enriquecimiento de muestra correspondientes (separación de proteínas grandes por precipitación, enriquecimiento de ALB408-423 por cromatografía o medio RP, extracción en fase sólida).

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes Ejemplos.

#### Ejemplo 1

#### 25 **Aislamiento de ALB408-423 antiviralmente efectivo del hemofiltrado humano**

El hemofiltrado humano se diluye opcionalmente con agua y se acidifica. El valor de pH es preferiblemente de 1,5 a 3,5, especialmente de 2,5 a 3,0. Posteriormente, el hemofiltrado se pasa a través de un intercambiador catiónico, por ejemplo, un material de soporte modificado con grupos de ácido sulfónico (Fraktogel SP-650 (M), Merck, Darmstadt, Alemania). Los péptidos enlazados al intercambiador catiónico se eluyen con una concentración relativamente alta de una solución salina. La fuerza iónica del eluato es aproximadamente la de una solución de acetato de amonio 0,5 a 1 M.

El eluato recolectado se somete a otra cromatografía de intercambio catiónico. Esta cromatografía es preferiblemente una elución fraccionada con tampones que tienen valores de pH crecientes.

35 Las fracciones que contienen el péptido de acuerdo con la invención se purifican adicionalmente mediante cromatografía preparativa de fase inversa seguida de cromatografía semipreparativa de fase inversa, por ejemplo, en materiales de soporte modificados con C18. El grado de purificación se controla preferiblemente usando cromatografía analítica de fase inversa, por ejemplo, en materiales de soporte modificados con C18.

#### 1.ª etapa: extracción por lotes de hemofiltrado

40 Se ajustan de 800 a 1.000 litros de hemofiltrado a un valor de pH de 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 fuertes con un caudal de 3 l/min.

#### Condiciones cromatográficas:

Columna:	Vantage VA 250 (Amicon, Witten, Alemania)
Material de la 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
Tampón B:	Acetato de amonio 0,5 M
Equipo:	Sistema Cromatográfico Autopilot (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, Alemania)

Después de cargar el total de 1.000 litros de líquido durante la noche, el enjuague se efectúa con varios volúmenes de columna de HCl 5 mM. La elución de los péptidos enlazados se efectúa como una elución por lotes con acetato de amonio 0,5 M. Se consigue una elución completa de los péptidos a través de un valor de pH en aumento (6,8 a 7,2) y una conductividad en aumento (56 mS/cm) en aproximadamente 5 litros de eluato.

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

Los eluatos de acetato de amonio de la extracción por lotes se combinan en una cantidad de 10.000 litros de péptido de hemofiltrado. Después de ajustar el pH a 2,7, el extracto de péptido se carga en el intercambiador de cationes preparativo con la adición de agua completamente desalada que tiene una conductividad de 5,5 mS/cm.

Condiciones cromatográficas:

Columna:	Vantage 250 VA
Material de la 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
Equipo:	Sistema Cromatográfico Autopilot (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, Alemania)

10

Después de cargar el extracto crudo durante 240 minutos, la columna se enjuaga con HCl 0,01 M hasta que la conductividad es inferior a 1 mS/cm. La elución se realiza en varias etapas con los tampones indicados a continuación.

Tampón	valor de pH	Sustancias tampón	Conductividad (mS/cm)
Tampón de lavado	2,0	HCl 0,01 M	1
Tampón de elución 1	3,6	Monohidrato de ácido cítrico 0,1 M	2,9
Tampón de elución 2	4,5	ácido acético 0,1 M + acetato de sodio 0,1 M	4,0
Tampón de elución 3	5,0	ácido málico 0,1 M	6,2
Tampón de elución 4	5,6	ácido succínico 0,1 M	6,1
Tampón de elución 5	6,6	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M	4,9
Tampón de elución 6	7,4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M	6,7
Tampón de elución 7	9,0	Carbonato de amonio 0,1 M	6,7

15 Los eluatos 1-7 se designan como grupo de pH I-VII. Se recolectan por separado y finalmente se enjuagan con agua completamente desalada. La elución se efectúa hasta que se alcanza una nueva línea base, alcanzándose volúmenes de elución de 10 a 25 litros para los grupos de pH individuales I a VII.

3.ª etapa: Segunda separación preparativa:

20 Los grupos de pH individuales se separan por cromatografía de fase inversa para fraccionar y desalar simultáneamente.

Condiciones cromatográficas:

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

Después de cargar los grupos de pH individuales, la columna se lava con tampón A. Durante la elución, se recolectan fracciones de 200 ml. Las fracciones se secan por congelación y se almacenan a -20 ° C. Las alícuotas de las fracciones formadas se prueban en un ensayo de inhibición del VIH. Las fracciones 6-8 del grupo de pH II contenían el péptido de acuerdo con la invención.

Figuras 1 A-F: Aislamiento de ALB408-423 a partir de hemofiltrado humano. El hemofiltrado fraccionado por medio de la elución de etapa de pH se fraccionó adicionalmente por RP-HPLC, y las fracciones obtenidas se midieron en una prueba de inhibición del VIH. Control: control T20.

- A. 3.<sup>a</sup> etapa de aislamiento. El fraccionamiento RP del grupo de pH 2 mostró actividad inhibitoria en las fracciones 6-8.
- B-E. 4.<sup>a</sup> a 7.<sup>a</sup> etapas del aislamiento. La actividad inhibitoria se purificó hasta que se obtuvo una sustancia pura.
- F. Espectro de masa (MALDI-MS) y análisis de secuencia del ALB408-423 purificado.

La prueba de inhibición del VIH se realizó sembrando 4.000 células MAGI P4-R5 (P. Charneau et al., J. Mol. Biol. 241:651, 1994) en 100 µl de DMEM (FCS al 10 %, 100 U/ml de penicilina G, y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin). Las células P4-R5 se transfectan de manera estable con un casete LTR-lacZ y tras una infección exitosa por VIH-1 expresarán β-galactosidasa de una manera dependiente de Tat, que puede detectarse en una prueba de quimioluminiscencia. Al día siguiente, se agregaron alícuotas de las fracciones. Por lo tanto, las fracciones liofilizadas se resuspendieron en 80 µl de DMEM y se pipetearon 25 µl de cada una de ellas a células P4-R5, se incubaron a 37 ° C durante 1 hora y posteriormente se infectaron con VIH-1 NL4\_3 (1 ng de antígeno p24). Se obtuvieron reservas de virus por infección transitoria de células 293T con ADN proviral por el procedimiento del fosfato de calcio (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Clontech). Las soluciones madre virales se cosecharon 48 horas post transfección, se filtraron y se usaron para la infección. Tres días después de la infección, se detectó actividad de β-galactosidasa en células P4-R5 infectadas usando el ensayo GalScreen (Tropix) según lo recomendado por el fabricante. Brevemente, se eliminó el sobrenadante, se añadieron 40 µl de una dilución 1:1 de PBS/GalScreen+sustrato, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, 30 µl de los lisados se transfirieron a lumiplacas de 96 pocillos. Posteriormente, la luminiscencia se detectó como unidades de luz relativa por segundo en un luminómetro (Berthold, Orion). De todas las mediciones, se resta la actividad media de fondo de β-galactosidasa de las células de control no infectadas. Los valores de % de infección para cada infección se calcularon en relación con los controles que no contienen péptidos (100 %). Las actividades enzimáticas en las mediciones sin ALB408-423 se establecieron al 100 %, y todos los demás valores se establecieron en base a estas. La purificación final (séptima etapa) se examinó exactamente bajo las mismas condiciones en células TZM-bl (X. Wei et.al., Antimicrob. Agents Chemother. 46:1896, 2002).

4.<sup>a</sup> etapa: cromatografía semipreparativa de fase inversa C18:

Se separó a través de una columna semipreparativa de fase inversa un total de 200 mg (correspondientes a 1.087 litros de cantidad equivalente de hemofiltrado) de las fracciones 6-8 del grupo de pH II, que fueron bioactivas en el ensayo (Figura 1A). Las fracciones 33 + 34 contenían la sustancia de acuerdo con la invención (Figura 1B).

Condiciones cromatográficas:

Columna:	4,7 cm x 30 cm columna de acero
----------	---------------------------------

## ES 2 770 361 T3

Material de empaque:	Bakerbond RP-C18, 15-30 µm, 300 Å)
Tampón A:	agua al 100 %, HCl 10 mM
Tampón B:	Acetonitrilo al 80 %, agua al 20 %, HCl 10 mM
Gradiente:	0-30 % B en 2.000 ml
Caudal:	40 ml/min (presión: 40 bar)
Detección:	214 nm y 280 nm
Equipo cromatográfico:	BioCad 250, Perseptive Biosystems
Fracciones:	50 ml cada uno desde del inicio del gradiente (min 10,75)

### 5.ª etapa: Cromatografía semipreparativa de fase inversa C18:

- 5 Las fracciones 33 + 34 de la etapa cromatográfica anterior, que fueron bioactivas en el ensayo, se separaron a través de una columna semipreparativa de fase inversa similar usando diferentes fases móviles. Los ensayos posteriores de infección por VIH revelaron que las fracciones 5 + 6 contenían la sustancia de acuerdo con la invención (Figura 1C).

#### Condiciones cromatográficas:

Columna:	4,7 cm x 30 cm columna de acero
Material de empaque:	Bakerbond RP-C18, 15-30 µm, 300 Å)
Tampón A:	Metanol al 30 %, agua al 70 %, HCl 10 mM
Tampón B:	metanol al 100 %, HCl 10 mM
Gradiente:	0-15 % B en 40 ml 15-60% B en 1.900 ml
Caudal:	40 ml/min (presión: 30 bar)
Detección:	214 nm y 280 nm
Equipo cromatográfico:	BioCad 250, Perseptive Biosystems
Fracciones:	50 ml cada uno desde del inicio del gradiente (min 9,75)

### 6.ª etapa: cromatografía analítica de fase inversa C4:

- 10 Las fracciones bioactivas 5 + 6 de la cromatografía previa se separaron a través de una columna analítica de fase inversa. Las alícuotas se probaron en un bioensayo (ensayo de inhibición del VIH). Las fracciones 51 a 57 contenían la sustancia de acuerdo con la invención (Figura 1D).

#### Condiciones cromatográficas:

Columna:	2 cm x 25 cm columna de acero
Material de empaque:	RP-C4, 5 µm, 100 Å, Biotek Silica, Östringen, Alemania)
Tampón A:	agua, TFA al 0,1 %
Tampón B:	Acetonitrilo al 80 %, agua al 20 %, TFA al 0,1 %
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 cromatográfico:	Kontron
Fracciones:	1 minuto cada uno desde el minuto 1

- 15 7.ª etapa: cromatografía analítica de fase inversa C18:

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

Condiciones cromatográficas:

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

5

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

**Ejemplo 2**

**Determinaciones de masa**

10 Las determinaciones de masa del péptido aislado del hemofiltrado (de la fracción 31 de la 7.<sup>a</sup> etapa del Ejemplo 1) y del péptido sintetizado químicamente (Ejemplo 3) se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI (Voyager DE-Pro). Se determinó que las masas moleculares de los péptidos corresponden a las siguientes cifras de masa (MW):

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

Determinación de secuencia

15 El péptido nativo purificado se analizó mediante análisis de acoplamiento MS-MS (ESI-TRAP) suministrado por la compañía PROTEOMEFACTORY AG, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlín (Alemania), mediante una comparación de la base de datos de las masas MS-MS ESI establecidas por medio del motor de búsqueda Mascot, que resultó en la siguiente secuencia con la mayor probabilidad:

LVRYYTKKVPQVSTPTL (Figura 1F).

20 Comparación de base de datos

Una comparación adicional de la base de datos con la base de datos SwissProt muestra que la secuencia peptídica tiene una identidad del 100 % con los aminoácidos 408-423 de la albúmina proteína sérica humana (número de acceso NP000468), y la secuencia contiene los aminoácidos: LVRYYTKKVPQVSTPTL.

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

25 Se disolvieron 1,6 mg de la fracción 31 de la 7.<sup>a</sup> etapa del Ejemplo 1 en 160 µl de DMEM. Posteriormente, 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 VIH-1 NL4\_3 en un volumen total de 100 µl. Tres días después, las tasas de infección se determinaron en un ensayo GalScreen (ver Ejemplo 1). La fracción 31 bloqueó la infección por el VIH-1 trópico X4 NL4\_3 de una manera dependiente de la dosis. La dosis que bloqueó la infección a la mitad del valor máximo (IC<sub>50</sub>) fue de 21,45 µg/ml (Figura 2).

30

Figura 2: la fracción 31 que contiene ALB408-423 bloquea la infección por VIH-1 NL4-3. Las células TZM-bl se incubaron con diluciones en serie de la fracción 31 y luego se infectaron con VIH-1NL4-3 trópico X4. 3 días después, las tasas de infección se determinaron mediante el ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios ± desviación estándar de las infecciones por triplicado en relación con los controles tratados con PBS (100 %).

**Ejemplo 3**

**Síntesis química de ALB408-423**

La síntesis química de ALB408-423 se realizó mediante síntesis en fase sólida convencional en un sintetizador de péptidos 9050 (Applied Biosystems) usando la química Fmoc conocida. El péptido obtenido se purificó mediante cromatografía de fase inversa, y su identidad y pureza se establecieron mediante RP-HPLC analítico y mediante la determinación de la masa MALDI-MS como se describe bajo el Ejemplo 2.

**Ejemplo 4**

**El ALB408-423 sintético bloquea específicamente la infección de las variantes del VIH-1 trópico X4**

Se sembraron 5.000 células TZM-bl en 100 µl de DMEM (FCS al 10 %, 100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin). Se disolvió ALB408-423 en PBS (10 mg/ml). Un día después, se añadieron a las células 20 µl de diluciones en serie de ALB408-423 en PBS y las células se infectaron posteriormente con 0,5 ng de antígeno p24 VIH-1 en un volumen total de 200 µl. Se usaron y generaron clones moleculares de VIH-1 que difieren en el tropismo correceptor como fue descrito (Papkalla et al., J. Virol. 76: 8455-9, 2002).

Figura 3: ALB408-423 sintetizado químicamente bloquea específicamente la infección por VIH-1 trópico X4. Las células TZM-bl que contenían las diluciones indicadas de péptido se infectaron con variantes de VIH-1 que diferían en su tropismo correceptor. 3 días después, se usó el ensayo Gal Screen para medir las tasas de infección. A) Inhibición dependiente de la dosis de las variantes de VIH-1 trópico X4 NL4-3, P51-Sc, P59-S/27 y P34-S o 92ht593.1 trópico dual. B) Tasas de infección en presencia de 500 µg/ml de ALB408-423 que muestra que el péptido bloquea específicamente la infección por VIH-1 trópico X4 pero no R5. Los datos mostrados son valores medios ± desviación estándar derivados de infecciones triplicadas en relación con células que contienen PBS (100 % de infección).

Después de 3 días, se detectó infección usando el ensayo GalScreen (Tropix) (ejemplo 1). FALB408-423 bloqueó la infección de manera dependiente de la dosis por todas las variantes de VIH-1 trópico X4 analizadas (Figura 3A) (IC<sub>50</sub> media de 24,2 µg/ml). La variante trópico dual (usando CXCR4 y CCR5) 92ht593.1 se bloqueó de manera menos eficiente. Por el contrario, las variantes de VIH-1 trópico CCR5 no se inhibieron incluso en presencia de dosis muy altas de ALB408-423 (500 µg/ml) (Figura 3B). Debido a la inhibición específica de la infección causada por las variantes del VIH-1 trópico X4, se supone que ALB408-423 interactúa con el receptor de quimiocinas CXCR4.

Tanto el ALB408-423 purificado a partir de hemofiltrado (Ejemplo 2) como el ALB408-423 sintetizado químicamente (Ejemplo 4) exhibieron una inhibición dependiente de la dosis, de la replicación del VIH-1 en las células diana, lo que proporciona evidencia de que el ALB408-423 es una molécula inhibitoria natural de VIH-1 humano.

**Ejemplo 5**

**El ALB408-423 sintético bloquea la infección lentiviral trópico CXCR4 de manera dependiente de la dosis**

El VIH-1 NL4-3 trópico X4 y VIH-2ROD10 o VIH-1 NL4-3 92ht014 trópico CCR5, VIH-1-7312 y SIVmac239 se generaron por transfección transitoria de células 293T y se usaron para infectar células TZM-bl que contienen las concentraciones indicadas de ALB408-423. Dos días después, las tasas de infección se determinaron y calcularon como se describe. (ejemplo 4) Los resultados muestran que ALB408-423 bloqueó, de manera dependiente de la dosis, la infección por VIH-1 y VIH-2 trópico X4 (IC<sub>50</sub> ~ 10-20 µM) mientras que el péptido no tuvo efecto sobre la infección lentiviral trópico R5 lo que demuestra una inhibición específica de VIH-1 y VIH-2 trópico CXCR4 (Figura 4).

Figura 4. ALB408-423 bloquea la infección lentiviral trópico X4. Las soluciones madre de VIH-1, VIH-2 y SIV normalizados por infectividad, se utilizaron para infectar células TZM-bl que contenían ALB408-423. Después de tres días, se determinaron las tasas de infección usando el ensayo Gal Screen. Se muestran los valores medios ± desviación estándar derivados de mediciones por triplicado. Tasas de infección de células que no contienen péptidos = 100 %.

Tabla 1. Actividad antiviral de diversos fragmentos de ALB contra la infección VIH-1 NL4-3 trópico X4. Las células TZM-bl que contenían diluciones en serie de péptidos sintéticos se infectaron con VIH-1 NL4-3 y las tasas de infección se determinaron y calcularon como se describe en los ejemplos 1 y 2 a los dos días después de la infección. Los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron usando el paquete de software GraphPad Prism. Abreviaturas: Da, peso molecular; IC<sub>50</sub> µM, concentración inhibitoria semimáxima (50 %) obtenida de experimentos realizados por triplicado; SEM, error estándar de la media; exp, número de experimentos realizados;

50

Tabla 1

		Da	IC <sub>50</sub> ± SEM	exp	Seq ID No
ALB415-423	VPQVSTPTL	941	>100	3	1

## ES 2 770 361 T3

		Da	IC <sub>50</sub> ± SEM	exp	Seq ID No
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
<b>ALB408-423</b>	<b>LVRYTKKVPQVSTPTL</b>	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
<b>ALB408-415</b>	<b>LVRYTKKV</b>	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
<b>variantes ALB408-415</b>					
ALB-wt	LVRYTKKV	1006	17,4 ± 6,5	2	25
ALB-V415A	LVRYTKKA	978	33,0	1	26
ALB-K414A	LVRYTKAV	949	31,0	1	27
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

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

5 Se sintetizaron químicamente diversos derivados de ALB408-423 que contenían eliminaciones de terminal N o C o sustituciones de aminoácidos (Tabla 1) y los péptidos liofilizados se disolvieron en PBS. La actividad antiviral se analizó en células TZM-bl usando VIH-1 NL4-3 trópico X4 como se describe (ejemplo 4). Eliminaciones de terminal N de ALB408-423 (409-423, 410-423, 411-423, 412-423, 413-423, 414-423, 415-423) alteraron o anularon gravemente la actividad antiviral indicando que la leucina de terminal N (L408) es crucial para la inhibición mediada por ALB408-423 del VIH-1 trópico X4 (Figura 5 y Figura 6).

Figura 5. Actividades antivirales de derivados de ALB. Las células TZM-bl que contenían diluciones en serie de derivados de ALB se infectaron con VIH-1 NL4-3 trópico X4. Después de 2 días, las tasas de infección se determinaron mediante el ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios derivados de infecciones por triplicado en relación con las muestras que no contienen péptidos (tasa de infección = 100 %).

5 Figura 6. Actividades antivirales de derivados de ALB. Las diluciones en serie de derivados de ALB que contenían células TZM-bl se infectaron con VIH-1 NL4-3 trópico X4. Después de 2 días, las tasas de infección se determinaron mediante el ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios derivados de infecciones por triplicado en relación con las muestras que no contienen péptidos (tasa de infección = 100 %).

10 Derivados de ALB408-423 que contienen truncamientos de hasta 8 residuos de aminoácidos en el terminal 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 la infección por VIH-1 trópico X4 (Figuras 5 y 6, Tabla 1). Sin embargo, otras eliminaciones en el terminal C (408-414 y 408-413) dieron como resultado péptidos inactivos (valores de  $IC_{50} > 50 \mu M$ ) (Figura 6). Curiosamente, la variante ALB408-419 de eliminación del terminal C bloqueó la infección por VIH-1 trópico X4 de manera más eficiente que el tipo salvaje ALB408-423 ( $4,4 \pm 1,0$  versus  $7,6 \pm 1,2$ ; valores medios de  $IC_{50} (\mu M) \pm sem$ ) (Tabla 1; Figuras 5, 6, 7 y 8).

Figura 7. Actividades antivirales de derivados de ALB. Las diluciones en serie de derivados de ALB que contenían células TZM-bl se infectaron con VIH-1 NL4-3 trópico X4. Después de 2 días, las tasas de infección se determinaron mediante el ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios derivados de infecciones por triplicado en relación con las muestras que no contienen péptidos (tasa de infección = 100 %).

20 Figura 8. Actividades antivirales de derivados de ALB. Las diluciones en serie de derivados de ALB que contenían células TZM-bl se infectaron con VIH-1 NL4-3 trópico X4. Después de 2 días, las tasas de infección se determinaron mediante el ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios derivados de infecciones por triplicado en relación con las muestras que no contienen péptidos (tasa de infección = 100 %).

25 Como los únicos 8 residuos de aminoácidos que abarcaban el derivado ALB408-415 presentaban una potente actividad antiviral ( $17,4 \pm 6,5$ ), se realizó un escaneo de alanina sintetizando y probando derivados de ALB408-415 que contenían sustituciones de aminoácidos específicas (Tabla 1). Los datos que se muestran en la Figura 7 y la Tabla 1 demuestran que la mayoría de las sustituciones deterioraron la actividad antiviral de ALB408-415. En particular, la Arginina 410 (ALB-R410A,  $IC_{50} > 1.000 \mu M$  versus ALB408-415;  $17,4 \pm 6,5$  versus) juega un papel importante en la inhibición del VIH-1 (Figura 7, Tabla 1). La sustitución de treonina 412 por alanina (ALB-T412A) dio como resultado un péptido con actividad antiviral moderadamente aumentada ( $11,2 \pm 0,1$ ) (Figura 7 y Tabla 1).

30 Para aclarar aún más el papel de la leucina con terminal N (L408) para la actividad antiviral de ALB408-419, este residuo se reemplazó por fenilalanina (F), alanina (A), glicina (G) o isoleucina (I). Los ensayos de inhibición del VIH-1 revelaron que la mayoría de las sustituciones en el terminal N dieron como resultado péptidos inactivos (ALB408F-419, ALB408A-419 y ALB408G-419) (Figura 8). Sin embargo, el intercambio homólogo a isoleucina (ALB L408I-419) dio como resultado un péptido con actividad antiviral moderadamente aumentada ( $1,55 \pm 1,2$ ) (Figura 8). Una leucina adicional en el terminal N de ALB408-419 (407-419) redujo su actividad antiviral (Figura 8).

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

#### 40 **Ejemplo 7:**

##### **Ninguno de los derivados de ALB es citotóxico**

45 Para evaluar los posibles efectos citotóxicos de las variantes de ALB, se incubaron  $5 \times 10^3$  células TZM-bl con concentraciones crecientes de aquellos péptidos que ejercen la actividad antiviral más potente (Tabla 1 y Figura 9) durante 3 días. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, #G7571) según lo recomendado por el fabricante. Este ensayo basado en luminiscencia mide el número de células viables en función de la cantidad de ATP intracelular. Los datos se registraron usando un luminómetro 10 minutos después de agregar reactivo. Las actividades de luminiscencia derivadas de células incubadas solo con PBS se ajustaron al 100 %. Los resultados mostrados en la Figura 9 muestran claramente que ninguno de los derivados de ALB probados mostraron efectos citotóxicos a concentraciones de hasta  $300 \mu M$ .

50 Figura 9. Ensayo de citotoxicidad de derivados de ALB. Se añadieron diluciones en serie de derivados de ALB a células TZM-bl. Después de 2 días, se midieron los niveles de ATP celular usando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo. Los valores se derivaron de mediciones por triplicado. Las tasas de % de vitalidad se calcularon en relación con los niveles de ATP en células que contienen PBS (sin péptido) (100 %).

#### **Ejemplo 8:**

##### **55 Actividad antiviral de ALB408-423 y derivados más potentes**

Para investigar el efecto de la mayoría de los péptidos ALB activos en diversos clones de VIH-1, se generaron virus que difieren en el uso de correceptor mediante la transfección de células 293T con plásmidos provirales (Papkalla et al., J. Virol. 76: 8455-9, 2002). Los caldos de virus se titularon primero en células TZM-bl. Luego, las células TZM-bl que contenían 100  $\mu$ M de péptidos se infectaron con cantidades normalizadas de infectividad de X4, trópico dual (X4/R5) o VIH-1 trópico R5. Las tasas de infección se determinaron como se describe (ejemplo 4) mostrando que ALB408-423 de tipo salvaje, ALB408-419 truncadas en el terminal C y las variantes 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 por completo (Figura 10). Los péptidos no tuvieron ningún efecto sobre la infección por VIH-1 trópico R5 e inhibieron la infección de células TZM-bl por el clon VIH-1 trópico dual 92ht593.1 solo moderadamente. Estos datos demuestran que las variantes ALB con actividad antiviral aumentada (en comparación con ALB408-423) (Tabla 1) también son inhibidores de amplio espectro de las variantes del VIH-1 trópico X4.

Figura 10. ALB408-423 y derivados de ALB truncados bloquean específicamente la infección por VIH-1 trópico X4. Las células TZM-bl que contenían PBS o 100  $\mu$ M de péptidos indicados se infectaron con infectividades normalizadas de clones de VIH-1 trópico dual X4, o trópico R5. Las tasas de infección se midieron 2 días después de la infección usando el ensayo GalScreen. Se muestran los valores medios (% de control tratado con PBS)  $\pm$  desviaciones estándar derivadas de mediciones por triplicado.

#### Ejemplo 9:

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

Para analizar el efecto de ALB408-423 y sus derivados en células primarias relevantes, se aislaron células mononucleares de sangre periférica de la capa leuco-plaquetaria derivada de DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen usando centrifugación de densidad Ficoll. Se estimularon  $1 \times 10^6$  PBMC por ml con 1  $\mu$ g/ml de fitohemoaglutinina (PHA, Oxoid, #3085280) y 10 ng/ml de Interleucina 2 (IL-2, Strathmann, #9511192) durante tres días. Posteriormente, las células se sedimentaron y se resuspendieron en medio que contenía IL-2. Se sembraron  $1,5 \times 10^5$  PBMC (250  $\mu$ l) en placas de 96 pocillos, se añadieron péptidos y las células se infectaron con 50 pg/ml de antígeno p24 de VIH-1 NL4-3 trópico X4. Los sobrenadantes que contienen el virus de la progenie se tomaron los días 1, 3 y 6 después de la infección. La producción de virus se midió mediante ELISA de antígeno p24 (SAIC-Frederick, Inc [programa de virus de SIDA y Cáncer]). No se pudo detectar el antígeno p24 en los sobrenadantes derivados en el día 6 de las células que contienen ALB408-423 y ALB L408I-419 100  $\mu$ M y solo niveles marginales de p24 en los sobrenadantes que contienen ALB408-419 100  $\mu$ M (Figura 11). En presencia de péptidos 20  $\mu$ M, la replicación del virus se vio gravemente afectada. Estos datos demuestran que ALB408-423 y sus dos derivados probados bloquearon la infección y la replicación del VIH-1 trópico X4 en células diana de VIH naturales.

Figura 11. ALB408-423 y sus derivados inhiben la infección por VIH-1 trópico X4 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de ALB408-423 o variantes truncadas y se infectaron con VIH-1 trópico X4. Los sobrenadantes obtenidos después de 6 días se analizaron por p24 ELISA. Se muestran los valores medios de antígeno p24 (ng/ml) derivados de infecciones triplicadas  $\pm$  desviación estándar.

#### Ejemplo 10.

#### **El péptido ALB 408-423 inhibe la unión de CXCL12 a CXCR4.**

Para probar la capacidad de ALB 408-423 de inhibir la unión de la quimiocina CXCL12 a su receptor, CXCR4, se realizó un ensayo de unión fluorescente en células vivas enteras como se describió previamente (Valenzuela-Fernández, et al.; 2001, JBC 276:26550-26558). El receptor CXCR4 se transfecta de manera estable en las células del riñón embrionario humano (HEK) como una proteína de fusión con la proteína fluorescente EGFP fusionada con la parte amino terminal extracelular del receptor (EGFP-CXCR4). Las quimiocinas humanas CXCL12 y CXCL12-Texas Red se sintetizaron como se describe (Amara et al., 1999, JBC 274:23916-23925; Valenzuela-Fernandez, et al., 2001, JBC 276:26550-26558). La monitorización de fluorescencia en tiempo real de las interacciones ligando-receptor se realizó de la siguiente manera: las células HEK293 que expresan el receptor de fusión, EGFP-hCXCR4, se cosecharon en solución salina tamponada con fosfato suplementada con EDTA 5 mM, pH 7,4, se centrifugaron y se resuspendieron en suero bovino HEPES tampón de albúmina (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 1 % (p/v), pH 7,4) suplementado con inhibidores de la proteasa (40  $\mu$ g/ml de bestatina y bacitracina, 20  $\mu$ g/ml de fosforamidón, 50  $\mu$ g/ml de quimostatina y 1  $\mu$ g/ml de leupeptina). Los experimentos se realizaron en células suspendidas en tampón HEPES-BSA (usualmente a  $10^6$  células/ml). Los registros basados en el tiempo de la fluorescencia emitida a 510 nm (excitación a 470 nm) se realizaron a 21 ° C usando un espectrofluorímetro (fluorolog 2, Spex) y se tomaron muestras cada 0,3 segundos. Las medidas de unión fluorescente se iniciaron agregando a los 30 segundos 100 nM de CXCL12-TR a 1 ml de suspensión celular. Para los experimentos de competición, se preincubaron células que expresan EGFP-CXCR4 durante 10 minutos en ausencia o en presencia de diversas concentraciones del competidor. Luego, se añadió CXCL12-TR (100 nM) y se registró la fluorescencia hasta que se alcanzó el equilibrio (300 segundos). Los datos se analizaron con el software Kaleidagraph 3.08 (Synergy Software, Reading, PA,

Estados Unidos). La asociación con CXCL12 fluorescente se detecta como una disminución de la emisión de fluorescencia EGFP que resulta de la transferencia de energía al grupo Texas red (TR) de CXCL12.

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

5  
10 Nuestro análisis demuestra que ALB408-423 evita la interacción de manera dependiente de la dosis de CXCL12-Tr con su receptor CXCR4 (Figura 12). ALB408-423 exhibe una constante de disociación (EC50) igual a  $8 \pm 3$   $\mu$ M, correspondiente a un valor de KI igual a  $3 \pm 1$   $\mu$ M. El valor constante de disociación de EC50 es similar a los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en los ensayos de inhibición de VIH-1.

15  
20 Figura 12. ALB408-423 inhibe la unión de CXCL12 a CXCR4. La monitorización de fluorescencia en tiempo real de las interacciones ligando-receptor se realizó usando 293 células que expresan EGFP-hCXCR4. Las células se preincubaron durante 10 minutos en ausencia o presencia de diversas concentraciones de ALB408-423. Luego, se añadió CXCL12-TR (100 nM) y se registró la fluorescencia hasta que se alcanzó el equilibrio (300 segundos). Los datos se analizaron con el software Kaleidagraph 3.08 (Synergy Software, Reading, PA, Estados Unidos). Se muestran los valores medios  $\pm$  desviación estándar obtenidos de mediciones triplicadas en relación con las intensidades de fluorescencia solamente de las células tratadas con CXCL12-Tr (100 %).

#### Ejemplo 11.

#### El péptido ALB408-423 no induce la movilización de Ca<sup>2+</sup> a través de CXCR4, CCR5 y CXCR4 e inhibe las respuestas celulares de calcio provocadas por CXCL12

25  
30 Se investigó la capacidad de ALB408-423 para regular las respuestas celulares mediadas por CXCR4, CCR5 o CXCR1 en células HEK293 cargadas con indicador de calcio. La medición de la liberación intracelular de Ca<sup>2+</sup> se llevó a cabo como se describe (Palanche et al., 2001, JBC 276:34853-34861; Vollmer et al., 1999, JBC 274: 37915-37922) usando éster de acetoximetilo indo-1 como la sonda de calcio. Las respuestas celulares se registraron a 37 °C en una cubeta de 1 ml agitada con un conjunto de excitación a 355 nm y un conjunto de emisión a 405 nm y 475 nm usando un espectrofluorímetro. Las quimiocinas humanas CCL5 y CXCL8 se compraron de Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA). Los ensayos de movilización de Ca<sup>2+</sup> utilizando células que expresan CXCR4, CCR5 o CXCR1 demuestran que los respectivos agonistas de quimiocinas CXCL12 (CXCR4), CCL5 (CCR5) y CXCL8 (CXCR1) inducen la movilización de Ca<sup>2+</sup> (Figura 13) mientras que ALB408-423 por sí solo no induce ninguna respuesta de calcio y, por lo tanto, no presenta propiedades agonistas de CXCR4, CCR5 y CXCR1 (Figura 13).

35  
40 Figura 13. ALB408-423 no es un agonista de CXCR4, CCR5 o CXCR1. Las células HEK293 que expresan los receptores de quimiocinas indicados se trataron con quimiocinas respectivas [CXCL12 10 nM (CXCR4); CCL5 20 nM (CCR5) o CXCL8 50 nM (CXCR1)] o ALB408-423 50  $\mu$ M. Las respuestas intracelulares de Ca<sup>2+</sup> se midieron usando un espectrofluorímetro. Las intensidades de fluorescencia obtenidas después del tratamiento con ALB408-423 se muestran en relación con aquellas medidas para la quimiocina respectiva (100 %).

45  
50 Figura 14. ALB408-423 inhibe específicamente la movilización de Ca<sup>2+</sup> provocada por CXCL12 en células que expresan CXCR4. A) Inhibición de liberación intracelular de Ca<sup>2+</sup>, mediada por CXCL12, dependiente de la dosis de ALB408-423. B) ALB408-423 no tiene efecto sobre las respuestas de calcio evocadas por CCL5 en células HEK CCR5 o las respuestas evocadas por CXCL8 en células HEK EGFP-CXCR1. Barras negras: solo quimiocinas respectivas; barras grises: quimiocina respectiva y ALB408-423 50  $\mu$ M. Los valores mostrados son las respuestas pico medias de calcio de experimentos duplicados en relación con las células tratadas con quimiocina solamente (100 %).

55  
60 Para determinar si ALB408-423 tiene propiedades antagonistas de CXCR4, analizamos el efecto de ALB408-423 en la unión del agonista CXCL12 al receptor CXCR4. Por lo tanto, las células que expresan CXCR4 se incubaron con diversas concentraciones de ALB408-423 y luego se trataron con CXCL12. Se registraron las respuestas de Ca<sup>2+</sup>. Los datos mostrados en la Figura 14A demuestran que ALB408-423 inhibe las respuestas de calcio evocadas por CXCL12 de una manera dependiente de la dosis y con una constante inhibidora aparente de 85  $\mu$ g/ml. Con el fin de obtener información sobre la selectividad del compuesto, a continuación, caracterizamos el efecto del péptido sobre las respuestas de calcio de diversos pares de quimiocinas/receptores. De acuerdo con los datos de la Figura 14A, 50  $\mu$ M del péptido inhiben el 70 % de las respuestas de calcio evocadas por CXCL12 en células HEK EGFP-CXCR4 (Figura 14B). Por el contrario, no tiene ningún efecto sobre las respuestas de calcio evocadas por CCL5 en células HEK CCR5 o sobre las respuestas evocadas por CXCL8 en células HEK EGFP-CXCR1 (Figura 14B). Estos resultados apoyan la idea de que el péptido muestra selectividad para el receptor CXCR4 y es un antagonista de CXCR4.

#### Ejemplo 12

**ALB408-423 inhibe la internalización de CXCR4 evocada por CXCL12**

Tras la estimulación con la quimiocina apropiada, numerosos receptores acoplados a la proteína G se internalizan mediante fosas recubiertas de clatrina. Como un antagonista de las respuestas de CXCR4, ALB 408-423 también puede alterar la internalización del receptor de CXCR4 inducida por quimiocinas. Para analizar las propiedades antagonistas de ALB408-423 en la internalización de CXCR4 mediada por CXCL12, las células que expresan el receptor EGFP-CXCR4 se dividieron y crecieron durante 2 días en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm recubiertos con colágeno tipo I de rata. Luego, las células se incubaron durante períodos de 0 a 30 minutos en tampón HEPES-BSA suplementado con inhibidores de proteasa que contenían CXCL12 100 nM o 50  $\mu$ M de ALB408-423 o CXCL12 100 nM más 50  $\mu$ M de ALB408-423 a 37 ° C. La internalización se detuvo colocando células sobre hielo y lavándolas inmediatamente con tampón HEPES-BSA helado. Las células luego se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 minutos a 4 ° C y luego se incubaron durante 15 minutos en NH<sub>4</sub>Cl 50 mM. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de microscopio utilizando un agente antidesvanecimiento, M $\ddot{u}$ viol (Calbiochem), se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas y luego se almacenó a -20 ° C. Luego, las células se analizaron con un microscopio invertido (Leica) y un sistema de imagen confocal de escaneo láser (Leica AOBSP2 MP) usando un objetivo HCX PL APO lbd.BL 63X 1,40 ACEITE UV (n ° 506192). El zoom electrónico se ajustó a 3, el agujero estenopeico era de 1 Airy y el tamaño de píxel resultante fue de 0,154  $\mu$ m. Se excitó EGFP con la línea láser de 488 nm del láser Argon y se detectó y amplificó mediante un tubo fotomultiplicador (PMT) en el denominado canal mCFP de 495 a 550 nm (PMT1 610 alta tensión -HV-, compensación 0). Para obtener una buena proporción señal a ruido, las imágenes se promediaron a partir de 4 adquisiciones consecutivas.

Figura 15. ALB408-423 bloquea la internalización de CXCR4 mediada por CXCL12. La endocitosis del receptor se monitorizó en células HEK que expresaban EGFP-CXCR4 y se analizó por microscopía confocal inmediatamente (0 min, panel superior) después de la adición de CXCL12, ALB408-423 o ambos compuestos, o 30 minutos después (panel inferior). Después de 30 minutos, las células tratadas con CXCL12 internalizaron CXCR4. En presencia de ALB408-423, se abroga la internalización del receptor mediada por CXCL12.

Las imágenes confocales muestran que el tratamiento de 30 minutos a 37 ° C con CXCL12 100 nM dio como resultado la internalización de EGFP-CXCR4 en la periferia de la célula y en las estructuras vesiculares (Figura 15). Como se esperaba, ALB408-423 solo, no indujo la internalización del receptor, pero bloqueó la internalización de CXCR4 mediada por CXCL12 (Figura 15) ya que la mayoría de la fluorescencia permaneció en la superficie celular. Este resultado proporciona evidencia adicional de que ALB408-423 actúa de forma antagonista en el receptor CXCR4.

**Ejemplo 13****ALB408-423 bloquea la migración mediada por CXCL-12 de células T Jurkat**

La señalización de CXCL12-CXCR4 juega un papel crucial en varias enfermedades como el VIH/SIDA, cáncer, leucemia y artritis. Los órganos, tejidos o células que expresan CXCL12 pueden atraer células tumorales que expresan CXCR4 y permitir metástasis. Para investigar si ALB408-423 puede inhibir la migración de células tumorales mediada por CXCL12, se realizaron ensayos de migración usando células T Jurkat que expresan CXCR4 como sistema modelo (Princen et al., 2004, J.Virol. 78:12996-13006). Las células T Jurkat se suspendieron a 0,4 X 10<sup>6</sup> (200  $\mu$ l) en medio que contenía FBS al 10 %, luego se añadió la suspensión celular (200  $\mu$ l) al compartimento superior de dispositivos de filtro de poros de 5  $\mu$ m (Transwell, cultivo celular de 24 pocillos, Costar) Luego, se añadieron 600  $\mu$ l 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 inhibitorios sobre la migración de células T Jurkat inducida por CXCL12, se mezcló CXCL12 en el compartimento inferior con diversas concentraciones de ALB 408-423. Las placas de cultivo celular se incubaron durante 2 horas en una incubadora de cultivo celular a 37 ° C. Después de la incubación, se retiraron las placas y se contaron 100  $\mu$ l de células que migraron al compartimento inferior, directamente usando una cámara de recuento o se analizaron usando un ensayo de proliferación (reactivo CellTiter-Glo®, Promega) según lo recomendado por el fabricante. El ensayo de proliferación mide los niveles de ATP intracelular que son directamente proporcionales al número de células (datos no mostrados). Los datos mostrados en la Figura 16 demuestran que ALB408-423 inhibe de manera dependiente de la dosis, la migración de células T Jurkat mediada por CXCL12. A altas concentraciones (360  $\mu$ g/ml) ALB408-423 bloqueó la migración celular inducida por CXCL12 casi por completo, comparable a las tasas observadas en ausencia de cualquier péptido (sin CXCL12, sin ALB408-423). Estos datos muestran que el antagonista de CXCR4 ALB408-423 puede inhibir la atracción de células tumorales mediada por CXCL12.

Figura 16. ALB408-423 bloquea de manera dependiente de la dosis, la migración de células T Jurkat mediada por CXCL-12. Las células T Jurkat se añadieron al compartimento superior de dispositivos Transwell con filtros de poro de 5  $\mu$ m. Luego se añadieron PBS, agonista de CXCR4 CXCL12 (100 nM) o diluciones en serie de ALB408-423 al compartimento inferior de la placa de cultivo celular. Después de 2 horas de incubación a 37 ° C, se detectó el número de células migradas 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 números medios de células migradas en relación con células tratadas solo con CXCL12 (100 % de migración) de un experimento por triplicado  $\pm$  desviación estándar.

**Ejemplo 14****La unión de ALB408-423 a CXCR4 depende de la integridad del terminal N del aminoácido.**

Para identificar regiones en ALB408-423 que median la unión a CXCR4 y, por lo tanto, bloquean la infección por VIH-1 trópico X4 y la unión de CXCL12, analizamos el efecto de varios derivados de ALB408-423 (ver Tabla 1) sobre la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CXCL12 y la unión de CXCL12-Tr. Para detalles experimentales ver ejemplos x e y. Como se muestra en la Figura 17 A y B, ALB409-423 que carece de la leucina con terminal N no inhibió las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por CXCL12 ni la unión de CXCL12-Tr al receptor CXCR4. Curiosamente, ALB409-423 también está inactivo en el ensayo de inhibición del VIH-1, lo que indica que la incapacidad de ALB409-423 para unir a CXCR4 también explica la pérdida de actividad antiviral. Por el contrario, todos los derivados ALB truncados en el terminal C todavía podían interactuar con el receptor CXCR4 (Figura 17A) y bloquearon la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por CXCL12 (Figura 17B) y exhiben una constante de disociación cerrada al péptido de tipo salvaje (30  $\mu\text{M}$ ), excepto el más pequeño, 408-413, que tiene una menor afinidad por el receptor (> 200  $\mu\text{M}$ ) y también es en gran medida ineficaz para bloquear la infección por VIH-1 trópico X4 (Figura 6 y tabla 1). Tomados en conjunto, estos datos muestran que varios derivados de ALB truncados en el terminal C son antagonistas de CXCR4 que pueden unir a CXCR4, evitando así la unión y señalización de CXCL12 o la infección por VIH-1 trópico X4.

Figura 17. Actividades antagonistas de CXCR4 de derivados de ALB. A) los fragmentos ALB inhiben CXCL12 pero no la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  evocada por CCL5. Las células HEK293 que expresan CXCR4 o CCR5 se trataron con el agonista de CXCR4, CXCL12 (10 nM) o el agonista de CCR5, CCL5 (20 nM), respectivamente, en ausencia (sin ALB) o en presencia de derivados ALB indicados (50  $\mu\text{M}$ ). Las respuestas de calcio se registraron como se describe. Los datos mostrados son valores medios  $\pm$  desviación estándar derivados de duplicados en relación con las respuestas pico de calcio después del tratamiento con agonistas solamente (100 %). B) los derivados de ALB anulan la unión de CXCL12 a CXCR4. Las células HEK293 que expresan CXCR4 se trataron con CXCL12 marcado con Texas Red (CXCL12-Tr) en presencia o ausencia de péptidos ALB. La monitorización de fluorescencia en tiempo real de las interacciones ligando-receptor se llevaron a cabo como se describe. Se muestran los niveles de CXCL12-Tr unidos en presencia de péptidos ALB en relación con las células tratadas solo con CXCL12-Tr (unido 100 %). Los valores se derivaron de un experimento duplicado.

**Listado de secuencias**

<110> Pharis Biotec GmbH  
 <120> Un polipéptido antagonista del receptor 4 de la quimiocina CXC (CXCR4)  
 5 <130> 170365ep  
 <150> 08774691.3  
 <151> 2008-07-03  
 <160> 32  
 <170> versión 3.3 Patente In  
 10 <210> 1  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
**Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu**  
 15 **1 5**  
 <210> 2  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 2  
**Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu**  
**1 5 10**  
 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
**Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu**  
**1 5 10**  
 <210> 4  
 <211> 12  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
**Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu**  
**1 5 10**

ES 2 770 361 T3

<210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 5  
**Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu**  
**1 5 10**  
 <210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
**Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu**  
**1 5 10**  
 <210> 7  
 <211> 15  
 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**  
 <210> 8  
 20 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
**Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu**  
**1 5 10 15**  
 25 <210> 9  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
**Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr**  
 30 **1 5 10 15**  
 <210> 10  
 <211> 14

ES 2 770 361 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

5

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 12

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

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

<210> 14

<211> 10

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

<210> 15

30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15  
**Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro**  
 1 5

<210> 16  
 <211> 8  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16  
**Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val**  
 1 5

<210> 17  
 10 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 17  
**Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys**  
 1 5

<210> 18  
 15 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18  
**Leu Val Arg Tyr Thr Lys**  
 20 1 5

<210> 19  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 19  
**Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys**  
 1 5

<210> 20  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens  
 <400> 20  
**Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser**  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 21  
**Ile Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser**  
**1 5 10**  
 <210> 22  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 22  
**Phe Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser**  
**1 5 10**  
 <210> 23  
 <211> 12  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23  
**Ala Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser**  
**1 5 10**  
 <210> 24  
 20 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24  
**Gly Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser**  
**1 5 10**  
 25 <210> 25  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25  
**Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val**  
 30 **1 5**  
 <210> 26  
 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

**Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Ala**  
**1 5**

5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

**Leu Val Arg Tyr Thr Lys Ala Val**  
**1 5**

10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 28

**Leu Val Arg Tyr Thr Ala Lys Val**  
**1 5**

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 29

**Leu Val Arg Tyr Ala Lys Lys Val**  
**1 5**

<210> 30

<211> 8

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

**Leu Val Arg Ala Thr Lys Lys Val**  
**1 5**

<210> 31

30

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

**Leu Val Ala Tyr Thr Lys Lys Val**  
**1 5**

<210> 32

<211> 8

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

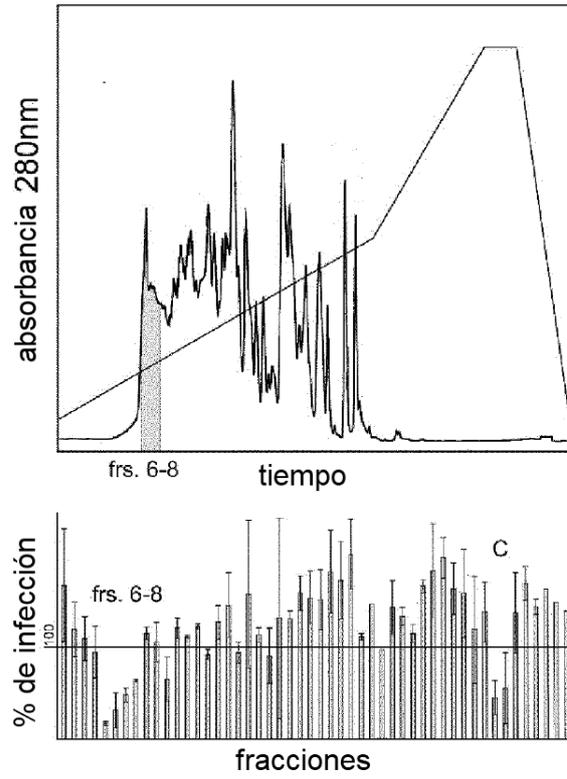
<400> 32

**Leu Ala Arg Tyr Thr Lys Lys Val**  
**1 5**

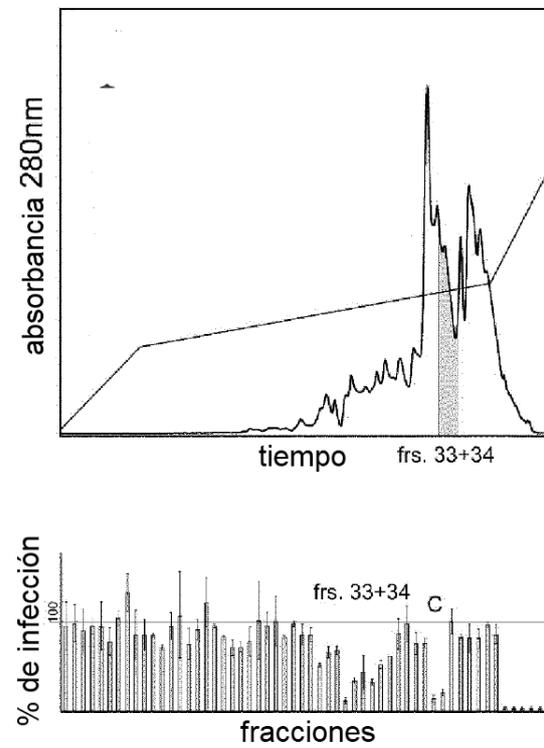
**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de Seq ID NO 9 a 15, Seq ID NO 20, Seq ID NO 26, Seq ID NO 27, Seq ID NO 29 y Seq ID NO 32 y sus derivados amidados, acetilados, sulfatados, fosforilados y/o glicosilados.
- 5 2. Polinucleótidos que codifican el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en particular los polinucleótidos constituidos por ADN, ARN, ADN genómico o APN.
3. Un vector que contiene los polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Una célula huésped genéticamente manipulada que contiene el vector de acuerdo con la reivindicación 3.
- 10 5. Una formulación galénica que consiste en un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo compatible.
6. Un procedimiento de preparación del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 por síntesis en fase sólida en términos de síntesis de Merrifield o síntesis en fase líquida usando aminoácidos protegidos, y su purificación, o por procedimientos de expresión heteróloga.
- 15 7. Un agente de diagnóstico que contiene el ácido nucleico o ARNm que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o que contiene el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2 para sistemas de prueba para analizar tejido, plasma, orina y niveles de fluido cefalorraquídeo de esta sustancia.
- 20 8. Un agente de diagnóstico que contiene el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 como marcadores para enfermedades virales, infecciones bacterianas y fúngicas, procesos inflamatorios y neoplásicos, y como marcadores en procesos inflamatorios, reacciones inflamatorias alteradas, enfermedades tumorales, trastornos del crecimiento, enfermedades del sistema inmunitario y como marcadores en enfermedades óseas.
9. Un medicamento que contiene el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 como un ingrediente activo de formas galénicas para administración oral, intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intratecal y como un aerosol para administración transpulmonar.
- 25 10. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, los polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2 o una formulación galénica de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de enfermedades virales, especialmente debidas al VIH-1, VIH-2, citomegalovirus, virus del herpes simple (tipos 1 y 2), virus de varicela zoster, virus de la hepatitis A y hepatitis B, virus de la influenza, virus de la polio, rinovirus, virus de la rubéola, virus del sarampión, virus de la rabia, virus del sarcoma de Rous o virus de Epstein-Barr, o para el tratamiento de
- 30 enfermedades tumorales, enfermedades neuronales y enfermedades vasculares.

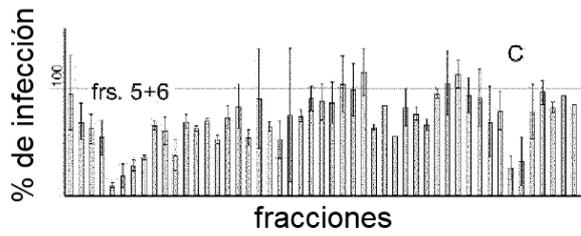
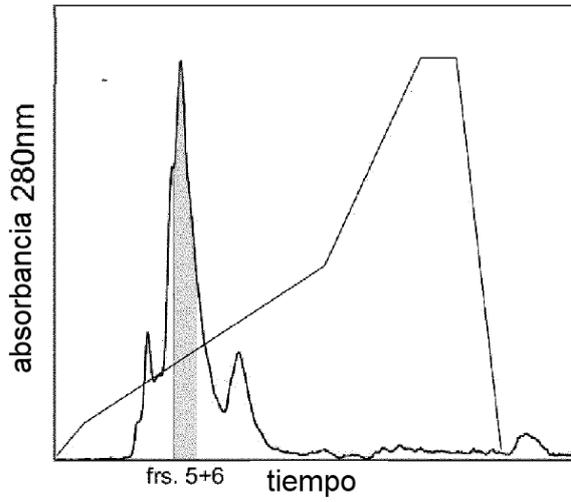
**Fig.1A**



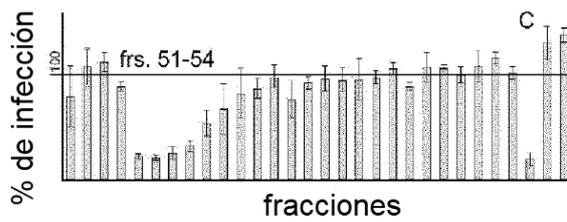
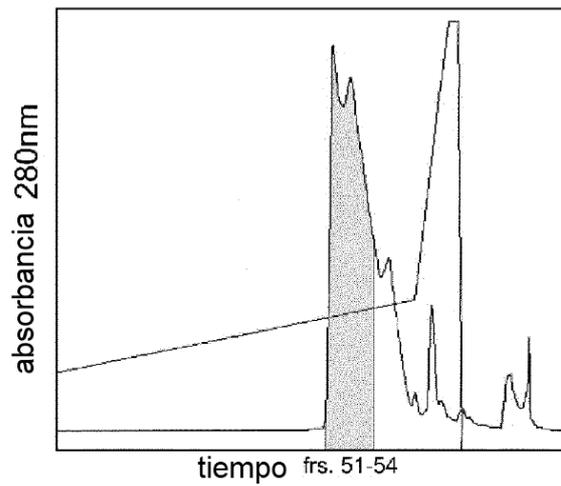
**Fig.1B**



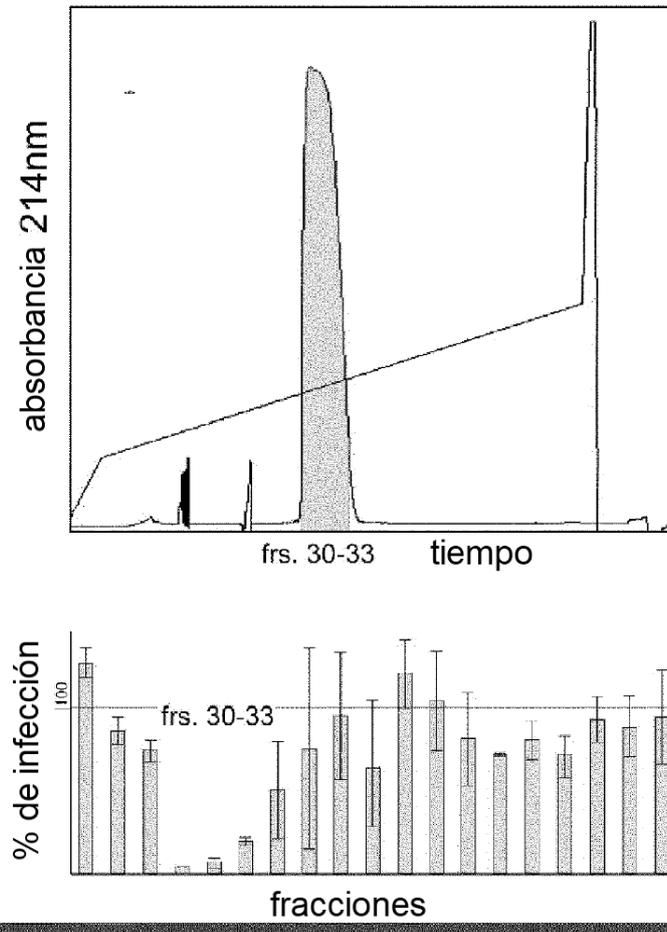
**Fig.1C**



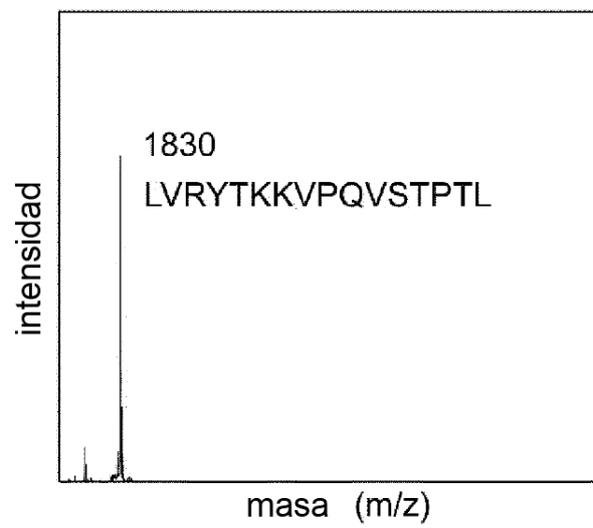
**Fig.1D**

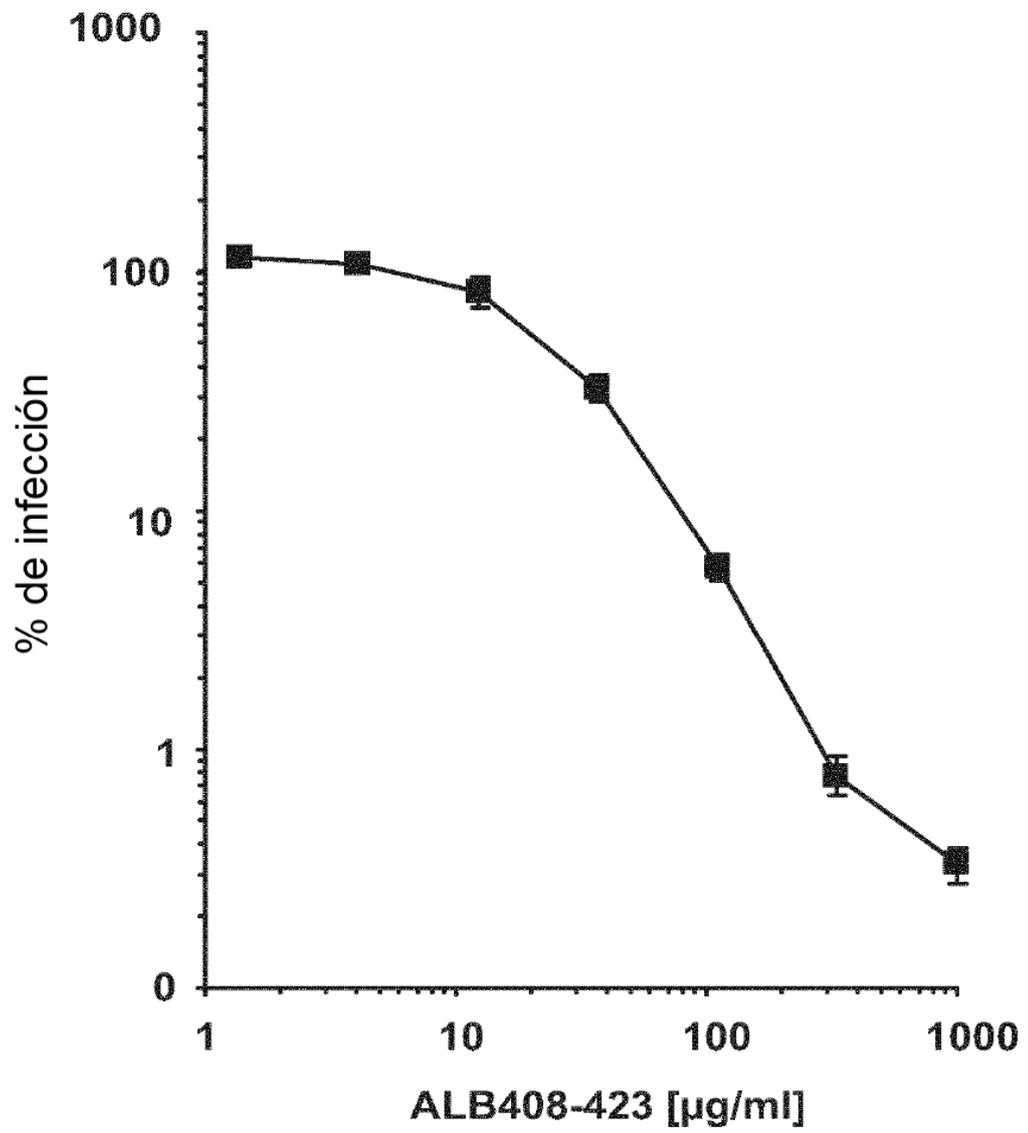


**Fig.1E**



**Fig.1F**





**Fig.2**

Fig.3A

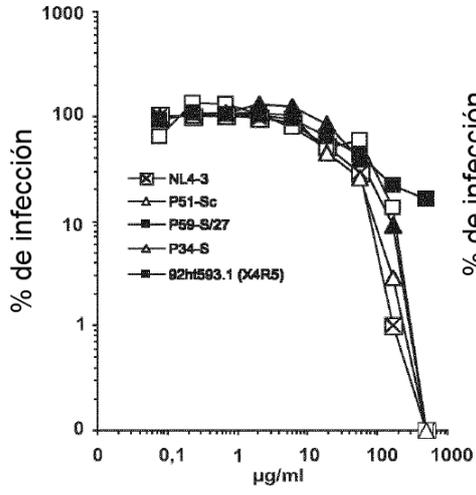
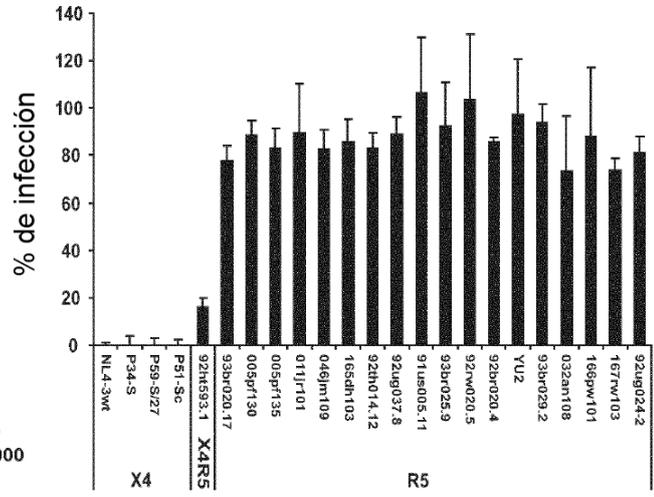
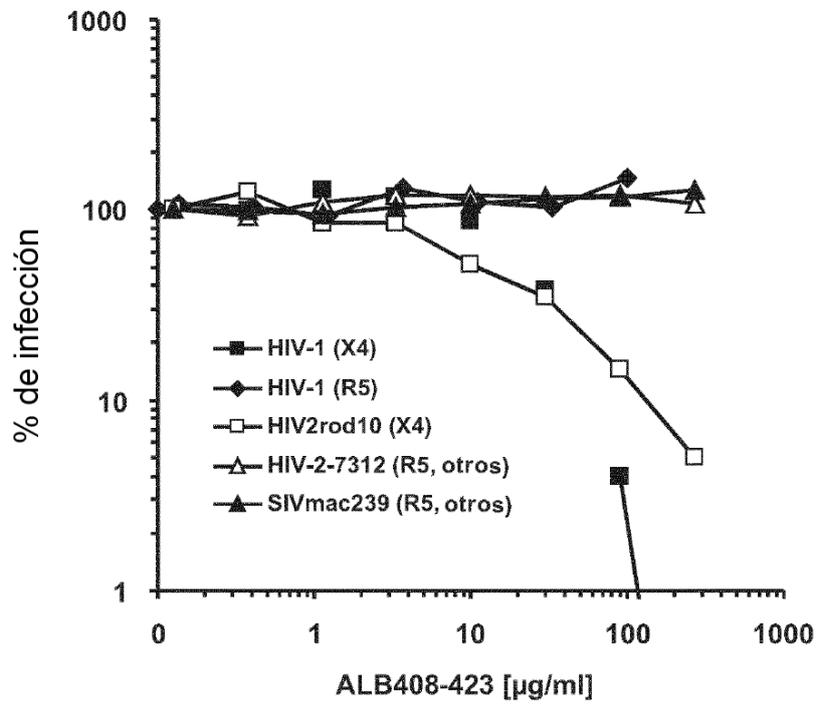


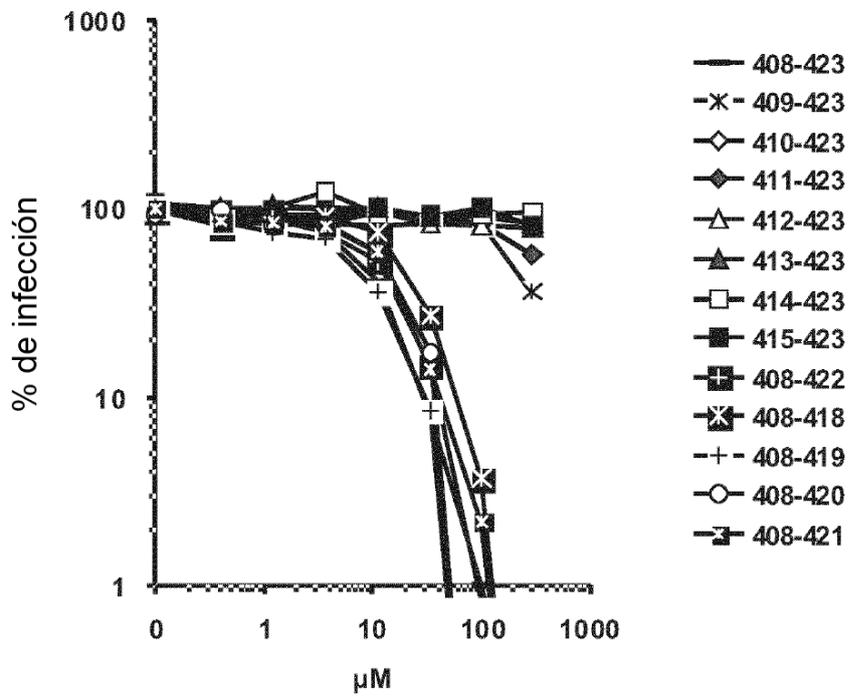
Fig.3B



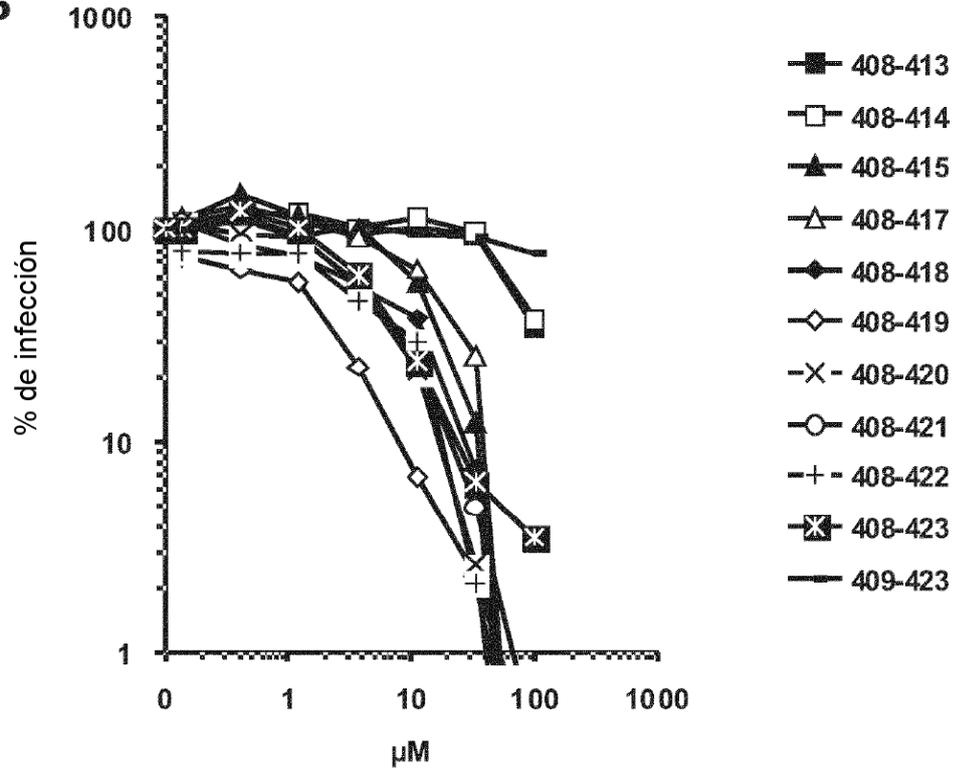
**Fig.4**



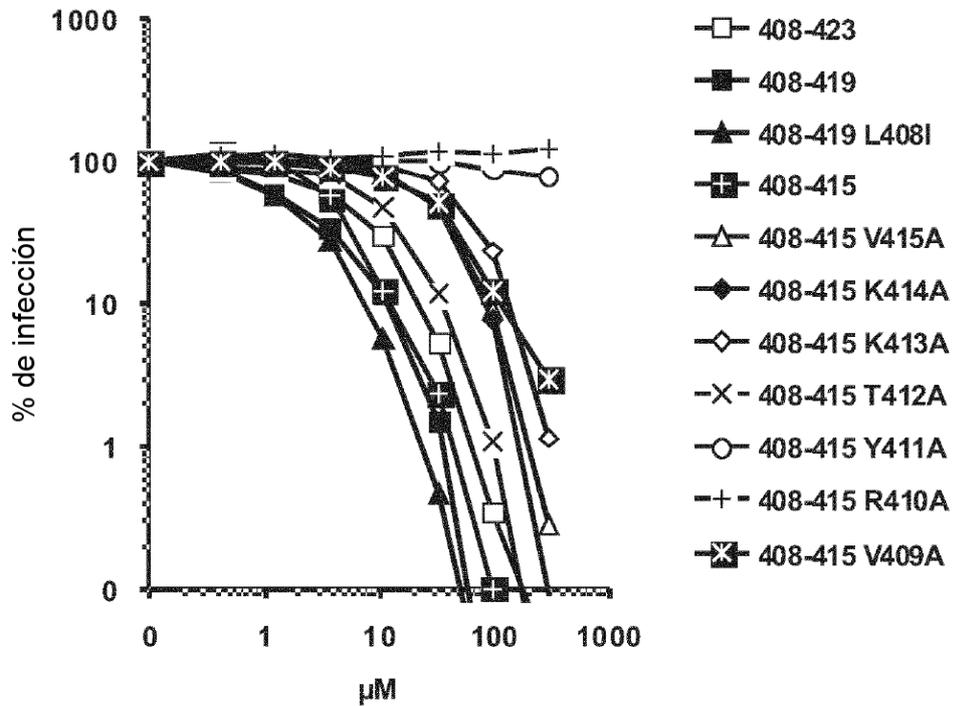
**Fig.5**



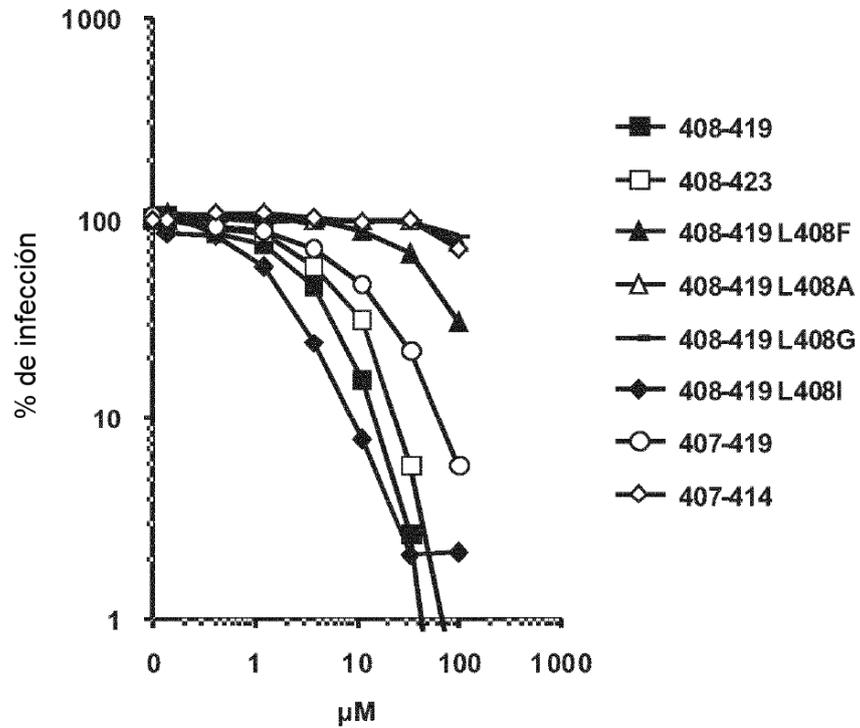
**Fig.6**



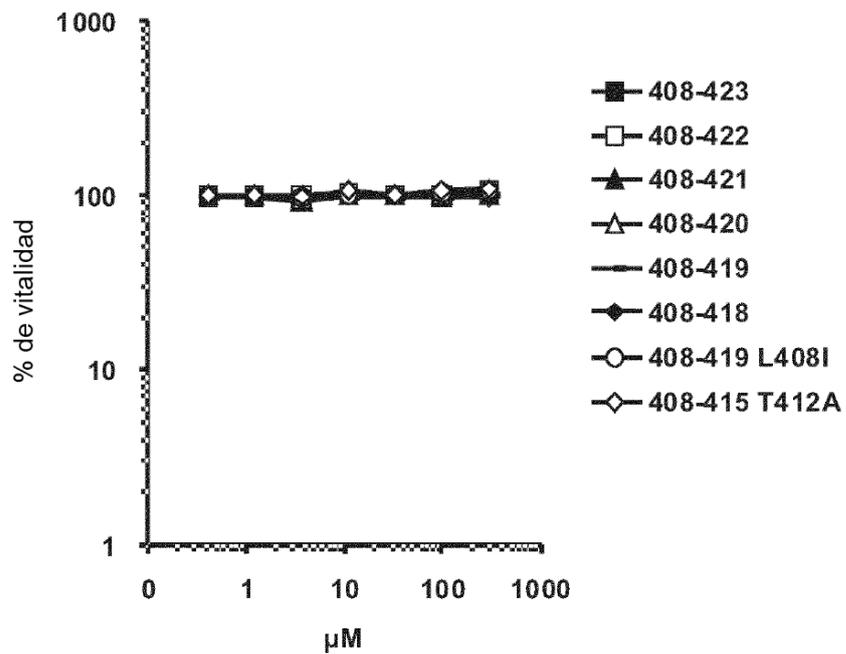
**Fig.7**

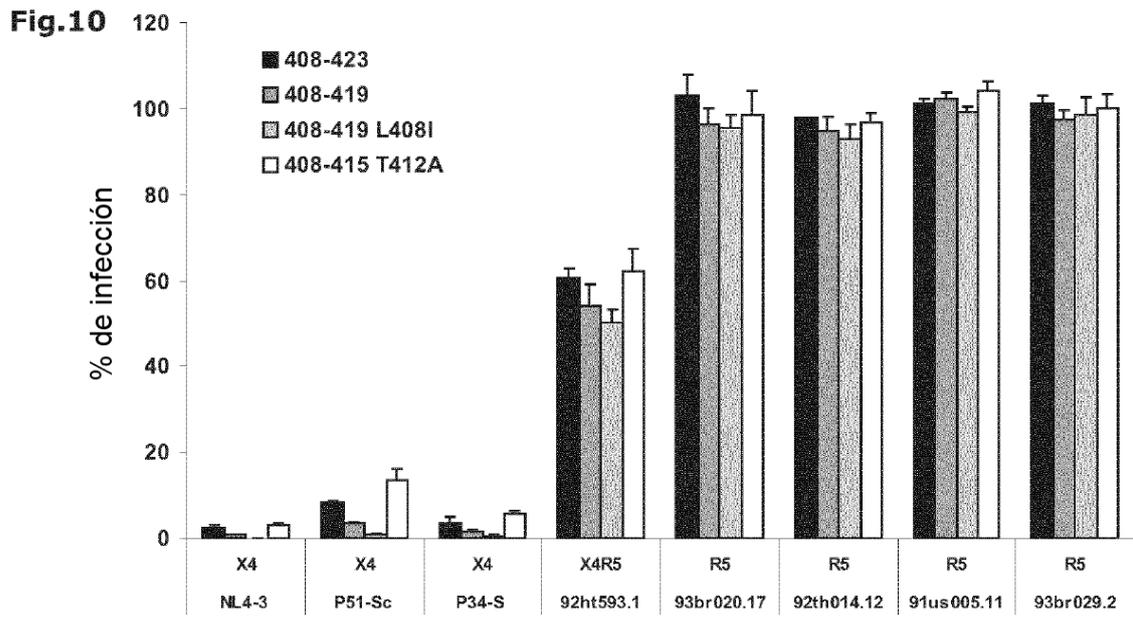


**Fig.8**

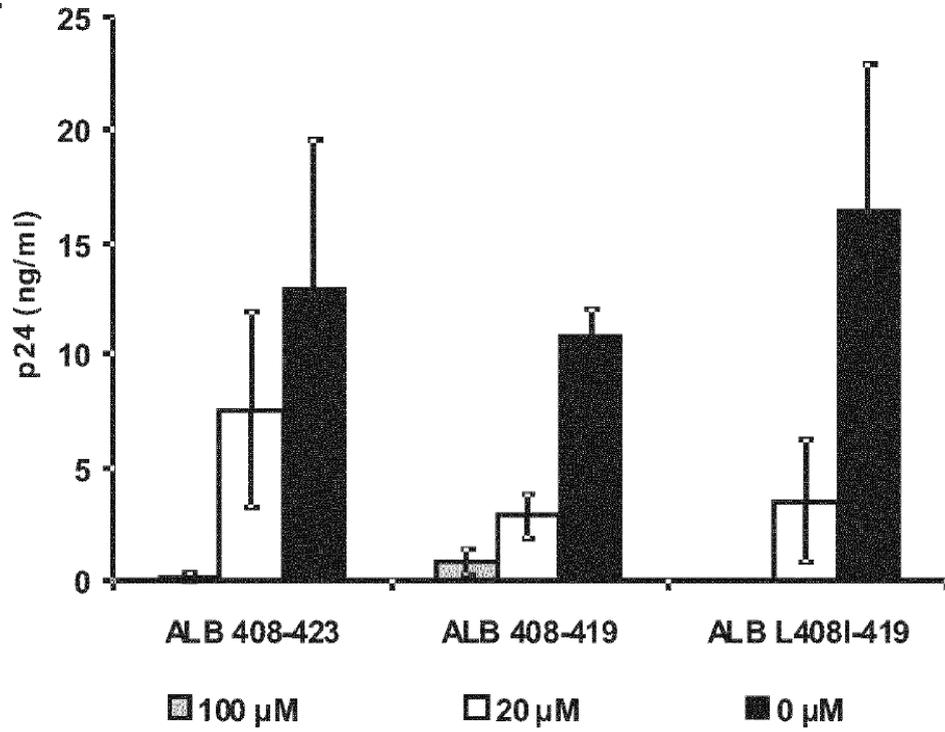


**Fig.9**

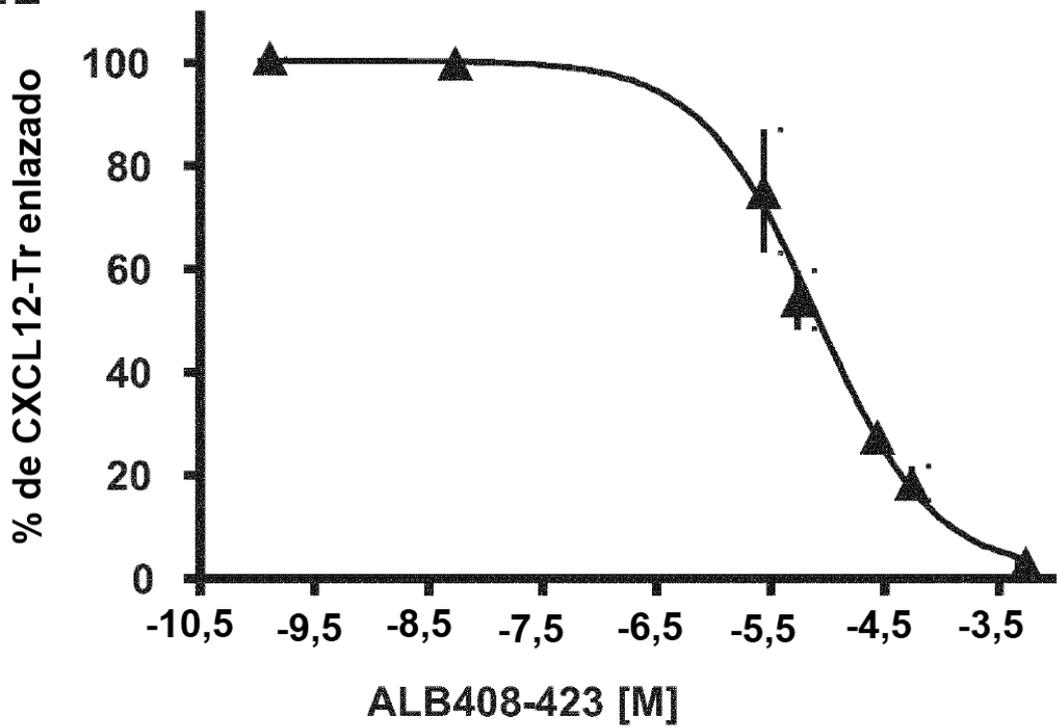


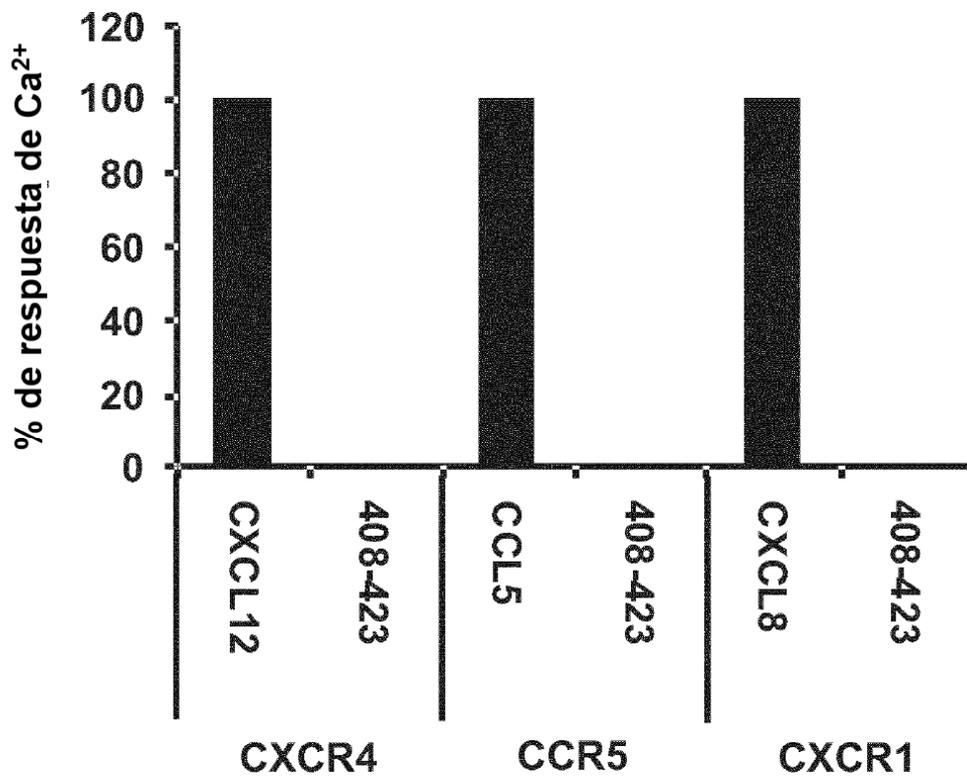


**Fig.11**



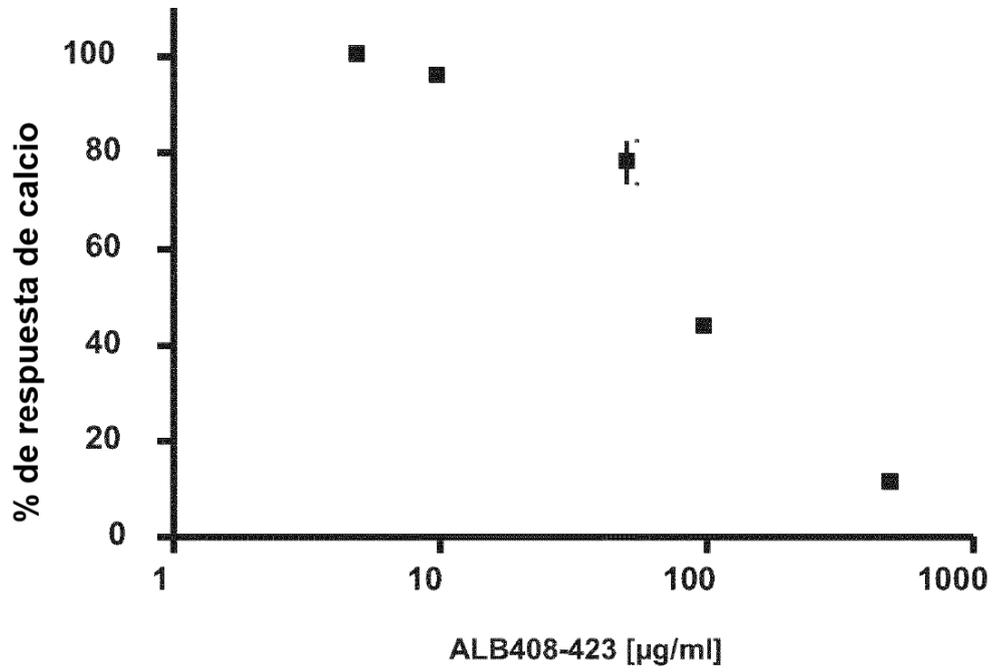
**Fig.12**



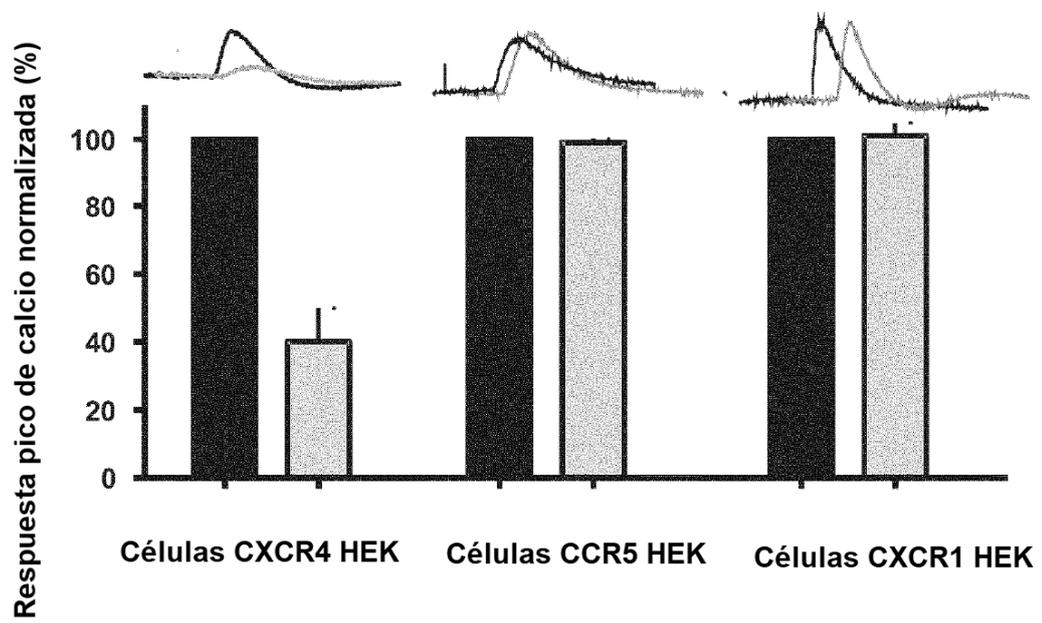


**Fig.13**

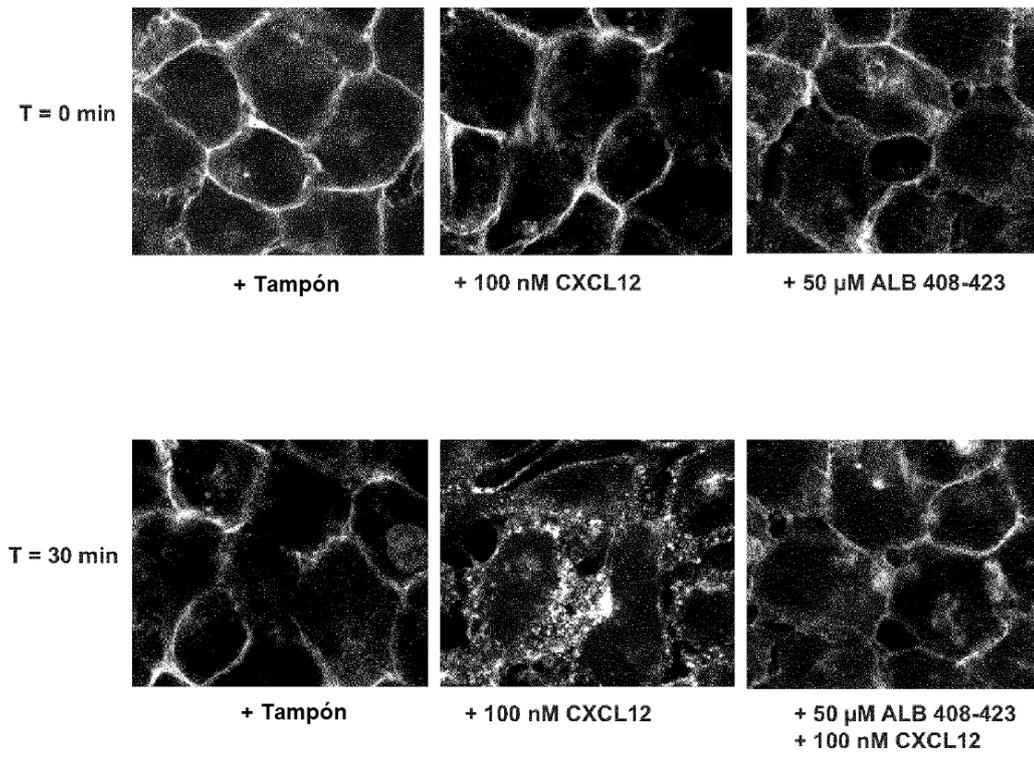
**Fig.14A**



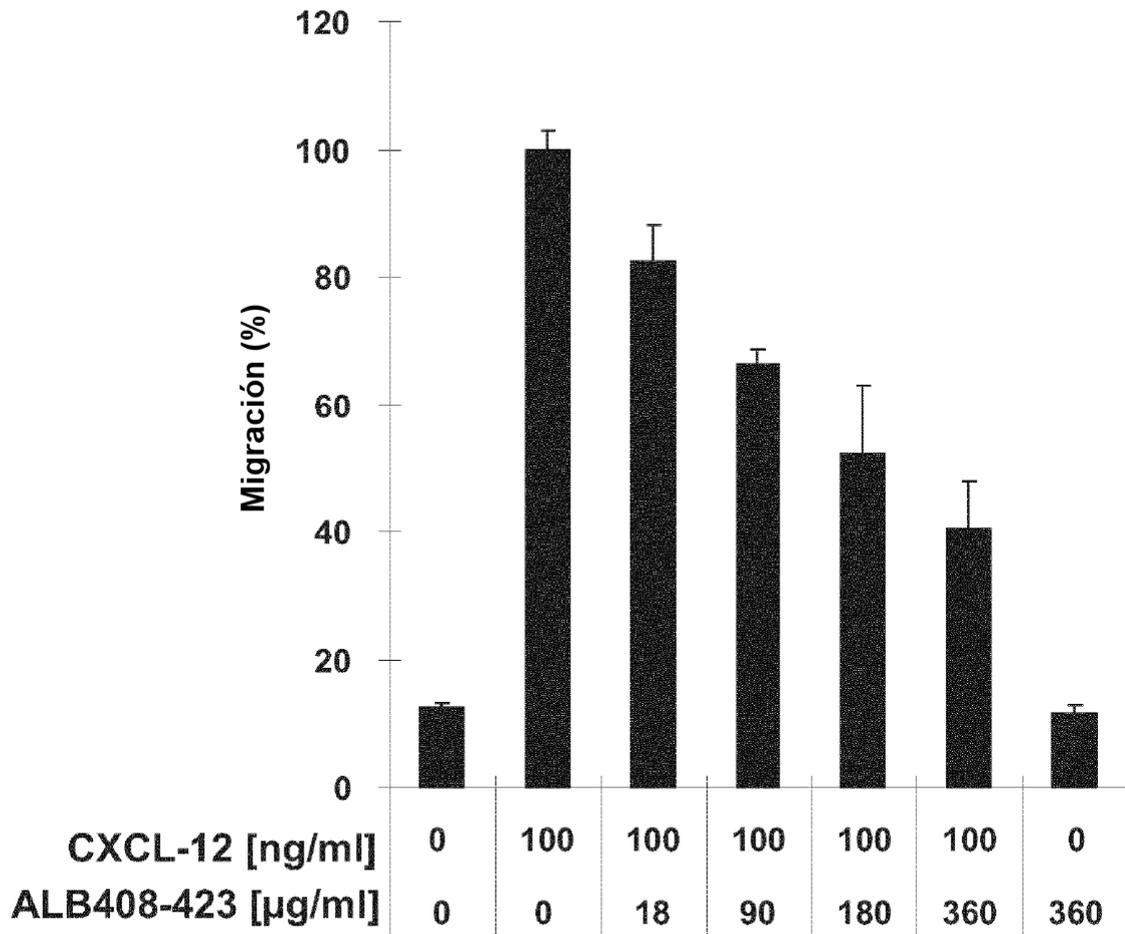
**Fig.14B**



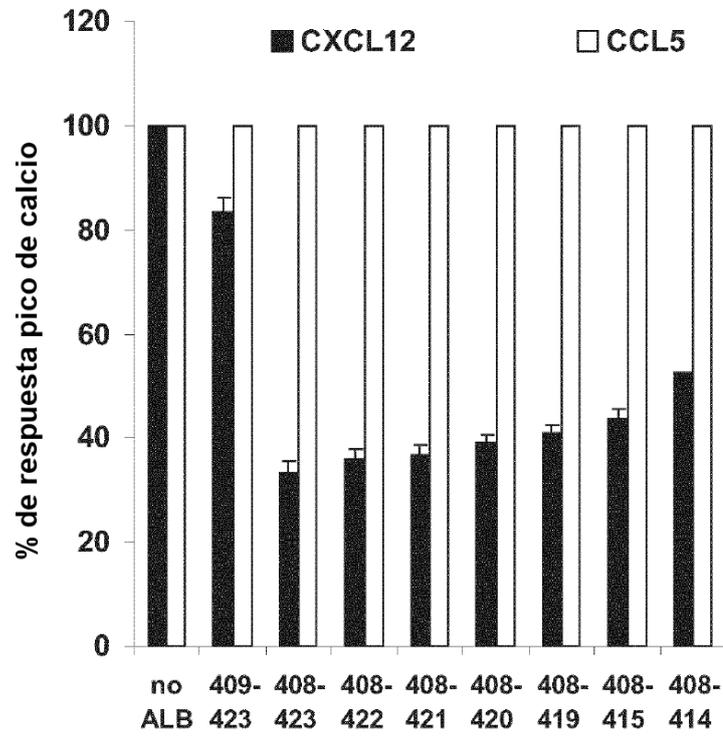
**Fig.15**



**Fig.16**



**Fig.17A**



**Fig.17B**

