

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
09 de enero de 2020 (09.01.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/008083 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

G01N 33/68 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2018/070484

(22) Fecha de presentación internacional:

05 de julio de 2018 (05.07.2018)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES];** C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: **MELLADO GARCÍA, Mario;** CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA (CNB), C/Darwin, 3, Cantoblanco, 28049 Madrid (ES). **RODRÍGUEZ FRADE, José Miguel;** CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA (CNB), C/ Darwin, 3, Cantoblanco, 28049 Madrid (ES). **MARTÍNEZ MUÑOZ, Laura;** CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA (CNB), C/Darwin, 3, Cantoblanco, 28049 Madrid (ES). **SANTIAGO HERNÁNDEZ, César Augusto;** CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA (CNB), C/ Darwin, 3, Cantoblanco, 28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel;** Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,

MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: THERAPEUTIC TARGET IN CHEMOKINE RECEPTORS FOR THE SCREENING OF COMPOUNDS USEFUL FOR THE TREATMENT OF PATHOLOGICAL PROCESSES INVOLVING CHEMOKINE SIGNALING

(54) Título: DIANA TERAPÉUTICA EN RECEPTORES DE QUIMIOCINAS PARA LA SELECCIÓN DE COMPUESTOS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE PROCESOS PATOLÓGICOS QUE IMPLICAN LA SEÑALIZACIÓN DE QUIMIOCINAS

(57) Abstract: The invention provides a molecular target (SEQ ID NO: 1) within chemokine receptors, specifically located within the transmembrane VI region of the CXCR4 chemokine receptor, which enables the detection and/or design of molecules whose union selectively inhibits chemokine-mediated receptor oligomerization, preferably CXCL12 chemokine-mediated CXCR4 receptor oligomerization. Since this oligomerization is the active conformational state of these chemokine/chemokine receptor complexes, the inhibition of this molecular target represents a new therapeutic approach to intervening in cellular responses associated with chemokine signaling, including pathological process such as inflammation or cell migration in cancer.

(57) Resumen: La invención proporciona una diana molecular (SEQ ID NO: 1) dentro de receptores de quimiocinas, localizada específicamente dentro de la región transmembrana VI del receptor de quimiocinas CXCR4, que permite la detección y/o el diseño de moléculas cuya unión inhibe selectivamente la oligomerización del receptor mediada por quimiocinas, preferentemente la oligomerización del receptor CXCR4 mediada por quimiocina CXCL12. Puesto que esta oligomerización es el estado conformacional activo de estos complejos de quimiocina/receptor de quimiocinas, la inhibición de esta diana molecular representa un nuevo enfoque terapéutico para intervenir en respuestas celulares asociadas a la señalización de quimiocinas, incluyendo procesos patológicos tales como la inflamación o la migración celular en el cáncer.



WO 2020/008083 A1

DIANA TERAPÉUTICA EN RECEPTORES DE QUIMIOCINAS PARA LA SELECCIÓN DE COMPUESTOS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE PROCESOS PATOLÓGICOS QUE IMPLICAN LA SEÑALIZACIÓN DE QUIMIOCINAS

5 La invención se refiere a la identificación de dianas moleculares en complejos de receptores de quimiocinas/quimiocina cuya modulación es útil para intervenir en respuestas celulares mediadas por quimiocinas. La modulación exógena de estas dianas terapéuticas bloquea específicamente los acontecimientos desencadenados por la unión de la quimiocina ligando a su receptor, dichos acontecimientos incluyen, entre otros, la migración celular. Por tanto, la invención pertenece a los campos de la
10 medicina y la farmacología, en particular al campo de dianas terapéuticas para la detección de compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades o afecciones clínicas cuyos síntomas o patologías son consecuencia de los acontecimientos desencadenados por la señalización de quimiocinas, tales como enfermedades
15 inflamatorias y autoinmunitarias, así como el cáncer.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

 Varias pruebas muestran la importancia de las quimiocinas y sus receptores en muchos procesos fisiológicos y patológicos; su expresión desregulada se relaciona con enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias crónicas, inmunodeficiencias y
20 cáncer. Sin embargo, a pesar de los estudios exhaustivos, no se han aprobado todavía fármacos para bloquear la unión de las quimiocinas a sus receptores en pacientes con enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias.

 Mediante el uso de técnicas convencionales de inmunoprecipitación y Western blot y, más recientemente, metodologías biofísicas basadas en la transferencia de energía de resonancia fluorescente, se ha demostrado claramente que el sistema quimiocina/receptor es considerablemente más complejo de lo que se esperaba inicialmente. Los ligandos y los receptores forman homodímeros y heterodímeros, e incluso entidades oligoméricas en la superficie celular; estas estructuras muy
25 dinámicas están reguladas por la expresión del receptor y los niveles de ligando. Aunque estudios previos demostraron que los complejos receptores regulan la señalización desencadenada por quimiocinas e incluso modulan la capacidad de unión de las quimiocinas, poco se sabe acerca de los factores que contribuyen a la oligomerización del receptor, de la dinámica de estos complejos receptores en la
30 superficie celular o de los residuos implicados en la formación de oligómeros.
35

Descritas originariamente como mediadores específicos del movimiento direccional de leucocitos, hoy en día se sabe que las quimiocinas están implicadas en una amplia diversidad de tipos y funciones celulares; se han relacionado con el tráfico de linfocitos, la regulación de la diferenciación de linfocitos T, la polarización de macrófagos, la infección por VIH-1, la angiogénesis, la organogénesis y la metástasis tumoral. Por tanto, la desregulación de su expresión está implicada en muchas enfermedades humanas, incluyendo enfermedades inflamatorias autoinmunitarias y crónicas, inmunodeficiencia y cáncer (Charo IF y Ransohoff RM (2006) *N Engl J Med* 354 (6): 610-621; Gerard CaR BJ (2001) *Nat. Immunol.* 2: 108-115). Las quimiocinas son, por tanto, un importante foco de interés como dianas terapéuticas potenciales.

Existen casi 50 quimiocinas humanas conocidas y clasificadas. Las quimiocinas constitutivas generalmente se regulan durante el desarrollo y participan en la homeostasis, mientras que la expresión de quimiocinas inducibles se regula principalmente durante procesos inflamatorios. Además, varios virus codifican quimiocinas altamente selectivas que actúan como agonistas o antagonistas y pueden participar en la propagación vírica y/o la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador (Alcami A (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3:36-50).

Las quimiocinas actúan mediante la unión a GPCR (receptores acoplados a proteína G, por sus siglas en inglés) de clase A. Esta interacción implica restos de aminoácidos en el dominio N-terminal del receptor y el tercer bucle extracelular, entre otros. Los 20 receptores caracterizados hasta la fecha se clasifican como CCR, CXCR, CX3CR y XCR, basándose en sus ligandos; la familia también incluye varios receptores señuelo (DARC, D6, CCXCKR), que participan en la eliminación de quimiocinas en sitios de inflamación. Aunque existen ejemplos de pares específicos quimiocina-receptor (receptores específicos), la mayoría son capaces de interactuar con más de una quimiocina (receptores compartidos), lo que explica la gran redundancia que caracteriza a este sistema. La expresión de quimiocinas y sus receptores se regula de forma precisa por varios factores que incluyen las citocinas, los factores de crecimiento y el estado del ciclo celular, lo que indica que el contexto celular influye en estas respuestas. Para facilitar el tráfico orquestado de distintas poblaciones celulares, generalmente varias quimiocinas se expresan simultáneamente y las células coexpresan más de un receptor. La complejidad de este escenario se completa con la notable redundancia entre las quimiocinas y sus receptores (Rossi DaZ A (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18: 217-242) y con los glucosaminoglicanos (GAG) que presentan las quimiocinas a las células (Hamel DJ et al. (2009) *Methods in*

enzymology 461: 71-102). En este escenario, es probable que las interacciones entre estos mediadores, entre sus receptores y entre los complejos que forman resulten cruciales para integrar la organización espaciotemporal del sistema inmunitario y para comprender su función fisiológica.

5 CXCR4 es uno de los receptores de quimiocinas más conservados en vertebrados y, en ratones, es esencial para la vida (Sierro F et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (37): 14759-14764). Se une al ligando homeostático clave CXCL12, también denominado factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), que es secretado constitutivamente por células del estroma de la médula ósea (MO) y por
10 muchos otros tipos celulares en varios tejidos. CXCR4 es un GPCR clásico que señala de una manera dependiente de proteína G. La unión de CXCL12 a CXCR4 activa todas las vías de transducción de señales típicas de receptores de quimiocinas, incluyendo las que desencadenan la adhesión, la quimiotaxis, la supervivencia y la proliferación. CXCR4 también se une a ligandos que no son quimiocinas, tales como la
15 proteína de envuelta gp120 del VIH CXCR4 (X4)-trópico. Por tanto, CXCR4 es considerado uno de los principales correceptores del VIH (Moore JP et al. (1997) *Current Opinion in Immunology* 9: 551-562).

CXCR4 se expresa ampliamente en tejidos indiferenciados y diferenciados. Se encuentra sobre casi todas las células hematopoyéticas, las células endoteliales
20 vasculares, en neuronas del sistema nervioso central y periférico, microglía y astrocitos. Por tanto, su actividad se relaciona con la migración celular y el posicionamiento, la neovascularización, la supervivencia y el crecimiento. También se expresa funcionalmente por muchas células cancerosas de origen hematopoyético y no hematopoyético (Balkwill F (2004) *Nat Rev Cancer* 4 (7): 540-550). CXCR4
25 conserva precursores hematopoyéticos en la MO, media la segregación de células B en órganos linfoides, así como la salida de neutrófilos de la MO y el retorno a la MO de neutrófilos senescentes (Ma Q et al. (1999) *Immunity* 10: 463-471).

CXCR4 también puede desempeñar un papel importante en el tráfico de células B vírgenes y de memoria a los centros germinales. Los ratones que albergan
30 una ganancia de función promovida por CXCL12 para CXCR4 muestran una compartimentalización anormal de células B en la periferia, con una reducción de los folículos primarios en el bazo y su ausencia en los ganglios linfáticos. El truncamiento del extremo C de CXCR4, que conduce a una ganancia de función estimulada por agonista para el receptor, se asocia en el hombre con el síndrome VHIM (verrugas
35 provocadas por infección por virus del papiloma humano, hipogammaglobulinemia,

infecciones y mielotetraxia), un trastorno de inmunodeficiencia raro que promueve la retención anormal de leucocitos maduros en la MO y, posiblemente, en otros órganos inmunitarios (Balabanian K et al. (2005) *Blood* 105 (6): 2449-2457). Las pruebas crecientes indican la implicación de CXCR4/CXCL12 en la autoinmunidad, como, por ejemplo, en la patogenia de la artritis reumatoide (AR). Los linfocitos T CD4+ expresan niveles elevados de CXCR4 y la concentración de CXCL12 también es elevada en el líquido sinovial de enfermos de AR (Nanki T et al. (2000) *J Immunol* 165 (11): 6590-6598), lo que indica que CXCR4 es importante para la retención de linfocitos T en tejidos sinoviales afectados por AR. Varios antagonistas de CXCR4, incluyendo el competidor del sitio de unión AMD3100, tienen actividad anti-AR (Matthys P et al. (2001) *J Immunol* 167 (8): 4686-4692).

Un modelo explicativo simple de la activación celular mediada por quimiocinas implicaría la unión de una quimiocina monomérica a su receptor monomérico. Aunque los monómeros de quimiocinas obligados a concentraciones nanomolares conservan la actividad completa para desencadenar respuestas celulares mediadas por receptores *in vitro*, varias series de indicios indican que la situación *in vivo* es mucho más compleja. Las quimiocinas se encuentran como monómeros o como oligómeros, como factores solubles o asociadas a GAG y son capaces de unirse y activar un receptor monomérico u oligómeros receptores en la superficie celular (Proudfoot A et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100: 1885-1890). Varios estudios informan que algunos GPCR pueden actuar como monómeros *in vitro*; sin embargo, análisis bioinformáticos, estructurales y funcionales han avanzado la idea de que los receptores de quimiocinas probablemente se expresan en la superficie celular como dímeros/oligómeros (Hamatake M et al. (2009) *Cancer Sci* 100 (1): 95-102). La estructura cristalina de CXCR4 en presencia de antagonistas (una molécula pequeña o un péptido cíclico) demostró una conformación homodimérica con la interfaz localizada en las regiones transmembrana V y VI (Wu B et al. (2010) *Science* 330 (6007): 1066-1071).

Los estudios de dimerización en células vivas se desarrollan actualmente usando técnicas basadas en la transferencia de energía de resonancia. La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia y bioluminiscencia (FRET, BRET, por sus siglas en inglés), ambas basadas en la detección de fluoróforos acoplados a receptor, permiten la medición indirecta de la asociación del receptor. Las variaciones en los valores de eficiencia FRET/BRET dependen de la posición relativa, la distancia y la orientación de los fluoróforos utilizados; aunque los datos positivos

indican claramente la asociación del receptor, los resultados negativos no pueden considerarse una falta de dimerización. El uso de estas técnicas confirmó que la dimerización es una regla general para la mayoría de los receptores de quimiocinas estudiados hasta la fecha y que los homodímeros y heterodímeros se regulan dinámicamente tanto por la expresión del receptor como por la unión del ligando. Algunos de estos métodos también permiten la evaluación de la ubicación subcelular de estos complejos. Los datos de FRET mediante fotoblanqueo aceptor demostraron que se encuentran homodímeros y heterodímeros receptores de quimiocinas en la superficie celular incluso en ausencia de ligandos, así como en vesículas intracelulares formadas supuestamente durante la síntesis y maduración del receptor (Martínez-Muñoz L. et al. (2016) *Methods Mol Biol* 1407: 341-359).

La dimerización puede afectar a la afinidad de unión a ligando y modula la transducción de señal. Los informes sugieren un papel para las conformaciones dimericas en la modulación de señales mediadas por quimiocinas. Los mutantes CCR2 y CXCR2 no funcionales bloquean la migración celular mediada por ligando mediante la dimerización con los receptores de tipo silvestre correspondientes (Rodriguez-Frade JM et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (7): 3628-3633; Trettel F et al. (2003) *The Journal of biological chemistry* 278 (42): 40980-40988). También se observó que heterodímeros CCR2/CCR5 desencadenan acontecimientos de señalización específicos tales como la activación de G_{11} , que a su vez promueve funciones celulares específicas que incluyen una mayor adhesión celular (Mellado M et al., (2001) *Embo J* 20 (10): 2497-2507). Los heterodímeros CCR5/CXCR4 se reclutan en la sinapsis inmunitaria, donde se acoplan a la proteína G_q y/o G_{11} ; los linfocitos T se vuelven insensibles a los gradientes quimiotácticos, forman conjugados más estables y responden con una proliferación y una producción de citocinas potenciadas (Molon B et al. (2005) *Nat Immunol* 6 (5): 465-471).

La estabilización de una conformación podría no solo desencadenar acontecimientos de señalización específicos, sino que también podría modular el comportamiento del receptor individual. Se notifican heterodímeros CXCR7/CXCR4 en transfectantes y en células primarias, donde CXCR7 modula respuestas mediadas por CXCR4 (Sierra F et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (37): 14759-14764). También se notifica modulación alostérica entre dímeros de receptor de quimiocinas y parece depender de la expresión relativa de cada receptor. En células transfectadas y primarias que expresan CCR2 solo, los ligandos específicos de CCR5 son incapaces de competir por la unión de ligandos específicos de CCR2; no obstante, evitan esta

unión eficientemente cuando CCR2 y CCR5 se coexpresan.

Aunque existe mucha evidencia de la relevancia funcional de la oligomerización del receptor de quimiocinas, aún está lejos de comprenderse bien. La homodimerización y la heterodimerización tienen implicaciones de gran alcance con respecto a mecanismos de activación inducidos por agonista y mecanismos de inhibición inducidos por antagonista, acoplamiento de proteína G y señalización e internalización y desensibilización de GPCR. Por tanto, es fundamental definir las complejidades de estos módulos de señalización, puesto que GPCR constituye una diana de gran importancia en el desarrollo y la intervención farmacéutica y la eficacia de los fármacos dirigidos a estos receptores podría depender en gran medida del estado de interacción del receptor.

Por tanto, es necesario identificar las regiones implicadas en la adopción del estado conformacional activo (oligomerización) de complejos de receptores de quimiocinas/quimiocinas. Estas regiones serían dianas terapéuticas cuya modulación exógena puede ser interesante desde un punto de vista clínico para el tratamiento y/o la prevención de afecciones clínicas, procesos patológicos o enfermedades que implican señalización de quimiocinas, tales como enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias. Análogamente, es necesario desarrollar moléculas o compuestos capaces de interferir con estas nuevas dianas terapéuticas evitando de este modo la adopción del estado conformacional activo (oligomerización) en el complejo quimiocina/receptor de quimiocinas y bloqueando, por tanto, la señalización mediada por quimiocinas en la célula. Estas moléculas desarrolladas podrían usarse para mejorar procesos patológicos, tales como el cáncer o la inflamación, en los que las vías de señalización de quimiocinas son cruciales.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2TX_4ILIX_8A$ (SEQ ID NO: 1) o su secuencia invertida, donde

30

X_1 es K o E,

X_2 es T o P,

X_4 es V o A,

X_8 es L o A, y

donde dicho péptido es capaz de inhibir la señalización de CXCL12.

35

En otro aspecto, la invención se refiere a una proteína de fusión que

comprende el péptido de la invención y al menos un polipéptido heterólogo.

En otro aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula que comprende el péptido o la proteína de fusión de la invención.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a una partícula similar a virus que comprende el péptido o la proteína de fusión de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido, proteína de fusión, nanopartícula o partícula similar a virus de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la detección de compuestos, moléculas y/o composiciones que inhiben la respuesta celular mediada por quimiocinas o son útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer, donde dicho método comprende:

15 a) poner en contacto un receptor de quimiocinas con un compuesto, molécula y/o composición que se ha de someter a ensayo,

b) analizar la unión entre el compuesto, molécula y/o composición que se ha de someter a ensayo y la región que consiste en el péptido de la invención dentro de la secuencia de aminoácidos del receptor de quimiocinas, y

20 c) clasificar el compuesto, molécula y/o composición como útil para inhibir la respuesta celular mediada por quimiocinas o útil para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer, cuando se ha detectado una unión en la etapa b).

25 En otro aspecto, la invención se refiere al péptido, proteína de fusión, nanopartícula, partícula similar a virus de acuerdo con la invención o composición farmacéutica de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un péptido, proteína de fusión, nanopartícula, partícula similar a virus o composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 La presente invención proporciona una diana molecular dentro de los receptores de quimiocinas, específicamente dentro de la región VI transmembrana del

receptor de quimiocinas CXCR4, que permite la detección y/o el diseño de moléculas cuya unión inhibe selectivamente la oligomerización del receptor mediada por quimiocinas, preferentemente la oligomerización del receptor CXCR4 mediada por quimiocinas CXCL12. Puesto que esta oligomerización es el estado conformacional activo de estos complejos de quimiocina/receptor de quimiocinas, la inhibición de la oligomerización de receptores de quimiocinas bloquea los acontecimientos desencadenados por la señalización de quimiocinas, incluyendo procesos patológicos tales como la inflamación o la migración celular en el cáncer.

Por tanto, los inventores han identificado, dentro de los receptores de quimiocinas, preferentemente dentro del receptor CXCR4, los restos implicados en la oligomerización del receptor mediada por quimiocinas. Estos restos representan una nueva diana terapéutica para intervenir en respuestas celulares asociadas a la señalización de quimiocinas.

Usando el modelo de receptor/ligando CXCR4/CXCL12, los inventores han aplicado microscopía fluorescente de reflexión interna total (TIRF, por sus siglas en inglés) y microscopía de agotamiento de emisión estimulada (STED, por sus siglas en inglés) para estudiar, en condiciones basales y después de la estimulación por ligando, la oligomerización del receptor de quimiocinas y la dinámica del receptor en la superficie de la célula. Los inventores han evaluado la relevancia biológica de estos oligómeros y, usando péptidos diseñados para imitar las regiones transmembrana de este receptor, han identificado como diana la región que consistía en los restos de aminoácidos ²³⁹KTTVILILA²⁴⁷, SEQ ID NO: 2, ubicados en el dominio VI transmembrana (TMVI, por sus siglas en inglés) del receptor CXCR4, cuya modulación exógena bloquea específicamente la migración celular mediada por CXCL12. Por tanto, esta región del receptor de quimiocinas se propone en la presente invención como una diana molecular para la detección de compuestos capaces de inhibir la oligomerización del receptor de quimiocinas, afectando a la señalización de quimiocinas implicada en varios procesos patológicos.

Aunque los restos de aminoácidos no se conservan, esta región está conservada estructuralmente en otros miembros de la familia de receptores de quimiocinas (Figura 5) y, por tanto, es una diana potencial para inhibir la oligomerización de otros receptores de quimiocinas.

Además, basándose en un análisis informático, los inventores estudiaron estos restos en CXCR4 y generaron un triple mutante CXCR4 que consistía en la secuencia de aminoácidos de CXCR4 (SEQ ID NO: 3) donde en la región que comprende los

restos ²³⁹KTTVILILA²⁴⁷ se incluyeron las sustituciones K239E, V242A y L246A (²³⁹ETTAILIAA²⁴⁷, SEQ ID NO: 4). Este receptor mutante triple se expresó normalmente en la membrana celular, se dimerizó como se demostró mediante FRET, se unió a CXCL12 pero no fue capaz de desencadenar la migración celular ni la fosforilación de ERK y AKT. Los datos TIRF usando células JK transfectadas con este mutante CXCR4 mostraron una falta de oligomerización del receptor mediada por CXCL12. Por tanto, la presente invención también proporciona una molécula (el péptido que comprende la SEQ ID NO: 4) que evita la oligomerización del receptor de quimiocinas y que puede usarse para el tratamiento de procesos patológicos que implican la señalización de quimiocinas.

Además, en experimentos *in vivo*, el tratamiento con el péptido ²³⁹KTTVILILA²⁴⁷, SEQ ID NO: 2, bloqueó específicamente el retorno de neutrófilos a la médula ósea. Por tanto, este péptido que consiste en la SEQ ID NO: 2 también se propone en la presente invención como agonista para el bloqueo de la oligomerización del receptor de quimiocinas y para el tratamiento de procesos patológicos que implican la señalización de quimiocinas.

Resumiendo, los resultados de los inventores mostrados en los ejemplos a continuación indican que: i) los restos responsables de la oligomerización del receptor mediada por quimiocinas son una diana terapéutica que puede modularse exógenamente con el fin de tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias o, en general, todos los procesos patológicos en los que hay implicadas vías de señalización de quimiocinas y ii) la secuencia específica SEQ ID NO: 2 dentro de la secuencia de aminoácidos del CXCR4 es responsable de dicha oligomerización, siendo de este modo una diana terapéutica prometedora para intervenir en respuestas mediadas por quimiocinas dentro de las células.

Péptido de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un péptido, en lo sucesivo en el presente documento péptido de la invención, que comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂TX₄ILIX₈A (SEQ ID NO: 1) o su secuencia invertida, donde

X₁ es K o E,

X₂ es T o P,

X₄ es V o A,

X₈ es L o A, y

donde dicho péptido es capaz de inhibir la señalización de CXCL12.

El término "péptido" o "polipéptido", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a una cadena lineal de aproximadamente 2 a 50 restos de aminoácidos unidos entre sí con enlaces peptídicos. Se entenderá que las expresiones "enlace peptídico", "péptido", "polipéptido" y proteína son conocidos para los expertos en la materia. En lo sucesivo en el presente documento, "péptido" y "polipéptido" se usarán indistintamente.

Como se usa en el presente documento, un "resto de aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido de origen natural, cualquier derivado de aminoácido o cualquier mimético de aminoácido conocido en la técnica. La expresión "resto de aminoácido" abarca restos de aminoácidos L y D.

En una realización particular, el péptido de la invención no comprende la secuencia de longitud completa de CXCR4 (SEQ ID NO: 3).

El término "CXCR4", como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 4 (CXCR-4) también conocido como fusina o CD184 (grupo de diferenciación 184) y es una proteína que, en seres humanos, está codificada por el gen CXCR4. CXCR-4 es un receptor de alfa-quimiocinas específico para el factor 1 derivado del estroma (SDF-1 también denominado CXCL12), una molécula dotada de una potente actividad quimiotáctica para los linfocitos. CXCR4 es también uno de varios receptores de quimiocinas que el VIH puede usar para infectar linfocitos T CD4+. El CXCR4 puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización particular, el CXCR4 es la proteína humana con el número de acceso de Uniprot P61073 (CXCR4_HUMAN) (SEQ ID NO: 3).

El término "CXCL12", como se usa en el presente documento, se refiere al motivo C-X-C quimiocina 12, también conocida como factor 1 derivado de células estromales (SDF1). CXCL12 es una proteína quimiocina que en humanos está codificada por el gen CXCL12 en el cromosoma 10. CXCL12 es fuertemente quimiotáctico para linfocitos y su señalización se ha observado en varios tipos de cáncer. CXCR4 es el receptor exclusivo para CXCL12; por tanto, mediante el bloqueo de su receptor, CXCL12 actúa como un inhibidor endógeno de cepas de VIH-1 CXCR4-trópicas.

En una realización particular, el péptido de la invención consiste en menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20 o menos de 10 restos de aminoácidos.

En una realización particular, el péptido de la invención tiene entre 9 y 50 aminoácidos de longitud, preferentemente entre 9 y 40, más preferentemente entre 9 y

30, incluso más preferentemente entre 9 y 20. En una realización particular, el péptido tiene entre 9 y 15 aminoácidos de longitud.

En una realización particular, el péptido de la invención tiene una longitud de 9 aminoácidos. En una realización más particular, el péptido de la invención tiene la
5 secuencia de aminoácidos KTTVILILA (SEQ ID NO: 2). En una realización más particular, el péptido de la invención comprende la secuencia inversa de la SEQ ID NO: 2.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos ETTAILIAA (SEQ ID NO: 4). En una realización más
10 particular, el péptido de la invención comprende la secuencia inversa de la SEQ ID NO: 4.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos KPTVILILA (SEQ ID NO: 5). En una realización más particular, el péptido de la invención comprende la secuencia inversa de la SEQ ID
15 NO: 5.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende la secuencia invertida del péptido de la invención. La expresión "secuencia invertida", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido en el que se invierte la dirección de la secuencia de aminoácidos, es decir, la secuencia de aminoácidos de un péptido leído desde su extremo C hasta su extremo N, de modo que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amida se intercambian. Este péptido también se conoce como "retropéptido". Como el experto en la materia sabrá, la secuencia invertida, o retropéptido, de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 es AX₂ILIX₆TX₈X₉ (SEQ ID NO: 6) donde X₂ es L o A, X₆ es V o A, X₈ es T o P y X₉ es K o
20 E.

En una realización particular, la secuencia inversa del péptido SEQ ID NO: 2 es ALILIVTTK (SEQ ID NO: 7).

En otra realización particular, la secuencia inversa del péptido SEQ ID NO: 4 es AAILIATTE (SEQ ID NO: 8).

En otra realización particular, la secuencia inversa del péptido SEQ ID NO: 5 es ALILIVTPK (SEQ ID NO: 9).

En una realización particular, el péptido de la invención comprende una secuencia que es una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que tiene al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 56 %, al menos el 60 %, al
35 menos el 65 %, al menos el 67 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el

78 %, al menos el 80 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. El grado de identidad entre las variantes y la SEQ ID NO: 1 se determina mediante el uso de algoritmos y métodos informáticos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente mediante el uso del algoritmo BLASTP (*BLAST Manual*, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894). En una realización preferida, la identidad de secuencia se determina a lo largo de toda la longitud de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o a través de toda la longitud de la variante o ambos.

En una realización particular, X₁ es K o E. En una realización más particular, X₁ es K.

En una realización particular, X₂ es T o P. En una realización más particular, X₂ es T.

En otra realización particular, X₄ es V o A. En una realización más particular, X₄ es V.

En otra realización particular, X₈ es L o A. En una realización más particular, X₈ es L.

De acuerdo con la presente invención, la variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 es capaz de inhibir la señalización de CXCL12/CXCR4, es decir, la señalización del receptor CXCR4 mediada por CXCL12.

La capacidad de un péptido para inhibir la señalización de CXCL12/CXCR4 puede determinarse midiendo la capacidad del péptido para bloquear la activación de las dianas CXCL12 mediada por CXCR4, a saber, las vías JAK/Stat, GRK/b-arrestina, Rho/Rac, PI3K/Akt, Grb2/Ras/RAF/ERK, PKC o NFκB, ERK y/o Akt, que da como resultado acontecimientos tales como la migración, la polarización, la adhesión, el crecimiento, la compartimentación celulares y similares. Más preferentemente, la inhibición de la respuesta celular mediada por quimiocinas a la que se hace referencia en la presente invención comprende un flujo de calcio reducido, la falta de activación de AKT y ERK, dificultades para polarizar y/o adherirse al sustrato y/o la ausencia de migración celular, la falta de activación de neutrófilos, la reducción de la proliferación celular, la linfopoyesis, la supervivencia celular y/o la angiogénesis, bloqueando la metástasis de células tumorales en células en respuesta a la quimiocina CXCL12. La modificación en la función de CXCR4 referida en la presente invención también

comprende la inhibición de la infección por VIH-1. En una realización particular, se considera que un péptido es capaz de inhibir la señalización de CXCL12/CXCR4 si reduce la fosforilación inducida por CXCL12 de cualquiera de JAK/STAT, ERK1/2 y AKT en al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o un 100%.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende al menos un aminoácido D. La expresión "aminoácido D", como se usa en el presente documento, se refiere al enantiómero D de un aminoácido, que es la imagen especular del aminoácido L.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más aminoácidos D.

En una realización particular, el péptido de la invención consiste completamente en aminoácidos D, es decir, es un enantiómero todo D. Como sabe el experto, la glicina es el único aminoácido que no tiene enantiómero, por lo que en esta realización particular no se excluye que el péptido comprenda glicina.

En otra realización particular, el péptido de la invención comprende el enantiómero totalmente D de la secuencia $X_1X_2TX_4ILIX_8A$ (SEQ ID NO: 1) donde X_1 es K o E, X_2 es T o P, X_4 es V o A y X_8 es L o A.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende el enantiómero todo D de la secuencia KTTVILILA (SEQ ID NO: 2) o el péptido inverso de la misma.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende el enantiómero todo D de la secuencia ETTAILIAA (SEQ ID NO: 4) o el péptido inverso de la misma.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende el enantiómero todo D de la secuencia KPTVILILA (SEQ ID NO: 5) o el péptido inverso de la misma.

Como sabe el experto, el péptido inverso del enantiómero todo D también se denomina péptido retroinverso o retroinvertido. El péptido retroinverso, como se usa en el presente documento, constituye isómeros de péptidos lineales en los que la dirección de la secuencia de aminoácidos se invierte (retro) y la quiralidad, D o L, de uno o más aminoácidos de los mismos está invertida (inverso), por ejemplo, usando aminoácidos D en lugar de aminoácidos L, por ejemplo, Jameson et al., *Nature*, 368, 744-746 (1994); Brady et al., *Nature*, 368, 692-693 (1994). El resultado neto de la

combinación de enantiómeros D y la síntesis inversa es que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amida se intercambian, mientras que la posición de los grupos de cadena lateral en cada carbono alfa se conserva. Una ventaja de los péptidos retroinversos es su actividad potenciada in vivo debido a la resistencia mejorada a la degradación proteolítica, es decir, el péptido tiene una estabilidad mejorada.

El péptido de la invención puede obtenerse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pero no limitado a, un método *in vitro* como, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante técnicas de proteínas recombinantes. Por ejemplo, a través de la síntesis de péptidos en fase sólida o mediante aproximaciones de ADN recombinante. Los péptidos y polipéptidos de la invención pueden producirse de forma recombinante, no solo directamente sino también como péptidos y polipéptidos de fusión junto con uno o más péptidos o polipéptidos heterólogos que pueden contener, por ejemplo, pero sin limitación, una secuencia señal, una secuencia marcadora u otro péptido que tenga un sitio de escisión de proteasa, por ejemplo, pero no limitado a, en el extremo N-terminal del péptido o polipéptido maduro. Los péptidos o polipéptidos de la invención también pueden comprender uno o más grupos químicos unidos a los extremos N-terminal y/o C-terminal, tales como grupos biotina u otros grupos fluorescentes que permitan la visualización y el control del péptido o polipéptido. La producción recombinante de los péptidos o polipéptidos de la invención comprende el diseño y opcionalmente la amplificación, de un polinucleótido que codifica dicho péptido o polipéptido, la clonación del polinucleótido en una construcción génica, preferentemente en un vector de expresión, la transformación o transfección de una célula competente con dicha construcción, el cultivo de dicha célula en condiciones que promuevan la expresión del péptido o polipéptido de la invención y el aislamiento y la purificación del péptido o polipéptido de la invención producido o expresado por la célula.

Proteína de fusión, nanopartícula y partícula similar a virus de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a una proteína de fusión, en lo sucesivo en el presente documento "proteína de fusión de la invención", que comprende el péptido de la invención y al menos un polipéptido heterólogo.

El péptido de la invención se ha definido anteriormente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido de la invención son completamente aplicables a la proteína de fusión de la invención.

La expresión "proteína de fusión", como se usa en el presente documento, se refiere a una única cadena polipeptídica diseñada artificialmente que comprende dos o más secuencias de diferentes orígenes, natural y/o artificial. La proteína de fusión, por definición, nunca se encuentra en la naturaleza como tal.

5 La expresión "polipéptido heterólogo", como se usa en el presente documento, significa que el polipéptido no se encuentra naturalmente fusionado al péptido de la invención.

En una realización particular, el polipéptido heterólogo es un péptido que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. La conjugación del péptido de la
10 invención con este tipo de péptido facilitará que el péptido atraviese la barrera hematoencefálica y es especialmente útil para entregar el péptido en el sistema nervioso central mediante administración sistémica. Se conocen en la técnica péptidos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, el documento WO200979790 divulga una serie de péptidos conocidos colectivamente como
15 Angiopeps que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica por transcitosis mediada por receptor usando la proteína 1 relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP-1) y que permite la entrega al SNC de conjugados administrados por vía sistémica que comprendan dichos péptidos. El documento WO2011087804 describe un péptido derivado de la glicoproteína G del virus de la rabia, que permite
20 que el conjugado que comprenda dicho péptido atraviese la barrera hematoencefálica. Prades et al., (Padres R et al. (2015) *Angew Chem Int. Ed. Engl* 54 (13): 3967-3972) describe un péptido de 12 aminoácidos derivado del péptido transferrina humana que es capaz de superar la barrera hematoencefálica.

La proteína de fusión de la invención puede obtenerse mediante cualquier
25 técnica adecuada que permita obtener dos péptidos (el péptido de la invención y el polipéptido heterólogo) en una única cadena de polinucleótidos. Dichas técnicas incluyen técnicas recombinantes, donde una construcción génica que codifica la proteína de fusión se introduce en un vector adecuado para la expresión en un sistema de expresión adecuado, y técnicas de ligadura de proteínas que implican la formación
30 de un enlace peptídico entre dos polipéptidos, como la ligadura química nativa o la ligadura de proteínas expresadas.

En otro aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula, en lo sucesivo en el presente documento "nanopartícula de la invención", que comprende el péptido o la proteína de fusión de la invención.

35 El péptido y la proteína de fusión se han definido anteriormente. Todas las

realizaciones particulares y preferidas del péptido y la proteína de fusión de la invención son completamente aplicables a la nanopartícula de la invención.

El término "nanopartícula", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material que tenga dimensiones en el intervalo de 1-1.000nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen dimensiones en el intervalo de 2-200nm, preferentemente en el intervalo de 2-150nm, e incluso más preferentemente en el intervalo de 2-100nm.

Las nanopartículas pueden contribuir a preservar la integridad del péptido o de la proteína de fusión en los fluidos biológicos hasta que alcanzar el órgano diana. Además, en el caso de la fusión que comprende un inmunomodulador, la encapsulación de la composición puede disminuir los efectos secundarios provocados por el modulador. Por último, las nanopartículas también pueden modificarse para incluir restos que permitan dirigir la nanopartícula a un órgano de interés.

Las nanopartículas adecuadas que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen materiales a escala nanométrica tales como una nanopartícula a base de lípidos (tales como liposomas), una nanopartícula superparamagnética, una nanocubierta, un nanocristal semiconductor, un punto cuántico, una nanopartícula a base de polímero, una nanopartícula a base de silicio, una nanopartícula a base de sílice, una nanopartícula a base de metal, un fullereno y un nanotubo.

La entrega dirigida puede conseguirse mediante la adición de ligandos sin comprometer la capacidad de las nanopartículas para entregar sus cargas útiles de péptidos. Se contempla que esto permitirá la entrega a células, tejidos y órganos específicos. La especificidad de dirección de los sistemas de entrega a base de ligandos se basa en la distribución de los receptores de ligando en diferentes tipos celulares. El ligando de dirección puede asociarse de forma no covalente o covalente con una nanopartícula y puede conjugarse con las nanopartículas mediante una diversidad de métodos como se describe en el presente documento.

Los ejemplos de proteínas o péptidos que pueden usarse para dirigir nanopartículas incluyen transferrina, lactoferrina, TGF- β , factor de crecimiento nervioso, albúmina, péptido Tat del VIH, péptido RGD e insulina, así como otros.

Se entenderá que la formulación del producto de la invención en una nanopartícula no tiene por objeto o no solo tiene por objeto facilitar el acceso del producto al interior de la célula, sino proteger el producto de la degradación y/o facilitar la orientación de la nanopartícula al órgano de interés.

En otro aspecto, la invención se refiere a una partícula similar a virus (en inglés, *virus-like particle o VLP*), en lo sucesivo en el presente documento "partícula similar a virus de la invención", que comprende el péptido o la proteína de fusión de la invención.

5 El péptido y la proteína de fusión de la invención se han definido anteriormente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido y la proteína de fusión de la invención son totalmente aplicables a partículas similares a virus de la invención.

La expresión "partícula similar a virus", también denominada "VLP", por sus siglas en inglés, se refiere a partículas no infecciosas que se asemejan a virus que no
10 contienen ningún material genético vírico. Las VLPs son el resultado de la expresión de proteínas estructurales víricas, tales como las proteínas de la cápside, y su autoensamblaje.

En una realización particular, la VLP puede comprender o, como alternativa, consistir en proteínas estructurales de Parvovirus, Rotavirus; proteínas estructurales
15 del virus de Norwalk; proteínas estructurales de Alfavirus; proteínas estructurales del virus de la Fiebre Aftosa; proteínas estructurales del virus del sarampión, proteínas estructurales del virus Sindbis, proteínas estructurales del Retrovirus, proteínas estructurales del virus de la Hepatitis B (por ejemplo, un HBcAg); proteínas estructurales del virus del mosaico del tabaco; proteínas estructurales del Virus Flock
20 House; proteínas estructurales del virus del papiloma humano; proteínas estructurales del virus de Polioma; proteínas estructurales de bacteriófagos, proteínas estructurales de fagos de ARN.

En una realización particular, el péptido o proteína de fusión de la invención se acopla o se une a la cápside de la partícula similar a virus. La unión del péptido o
25 proteína de fusión a la cápside puede realizarse mediante un enlace covalente o no covalente.

Diana farmacológica

El péptido de la invención puede usarse como diana farmacológica para la
30 detección/selección/búsqueda de compuestos, moléculas y/o composiciones útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer. Por tanto, en otro aspecto de la invención, el péptido de la invención es una diana farmacológica para la detección de compuestos, moléculas y/o composiciones útiles para el tratamiento y/o
35 la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades

autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer.

Como se ha mencionado anteriormente, el péptido de la SEQ ID NO: 1 se ha identificado en la presente invención como la región dentro del receptor CXCR4 responsable de la oligomerización del receptor inducida por la quimiocina CXCL12.

5 Por tanto, este péptido puede usarse *in vitro*, por sí mismo o formando parte del receptor CXCR4, como diana molecular para la detección de compuestos o moléculas útiles para la inhibición de la oligomerización del receptor y, por tanto, para bloquear la señalización mediada por quimiocinas dentro de la célula.

La expresión "diana", "diana molecular", "diana farmacológica" o "diana
10 terapéutica", como se usa en la presente invención, se refiere al péptido de la invención que es útil para estudiar el efecto bioquímico de moléculas, compuestos o composiciones capaces de unirse a esta secuencia, interfiriendo con la actividad de esta secuencia o bloqueando esta secuencia o su actividad. Las moléculas, compuestos o composiciones de interés son los que, a través de su unión a esta
15 secuencia o la interferencia con la actividad de esta secuencia, evitan la oligomerización del receptor de quimiocina, preferentemente el receptor CXCR4, que comprende el péptido de la invención.

Los "compuestos, moléculas o composiciones" a los que se hace referencia en la presente invención pueden ser, sin limitación, agentes bloqueantes, agentes de
20 interferencia, inhibidores, ligandos que inducen sesgo de estímulo, moduladores alostéricos y bifuncionales, o similares, de cualquier naturaleza (biológica o agentes químicos) y pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos capaces de unirse al antígeno, aptámeros, ARN de interferencia, péptidos, ácidos nucleicos, metabolitos o agentes químicos.

25 Los compuestos, moléculas y/o composiciones que interfieren con, se asocian a o se unen al péptido de la invención, son capaces de bloquear la actividad de esta diana afectando de este modo a su implicación en la oligomerización del receptor de quimiocinas, preferentemente la oligomerización del receptor CXCR4, mediada por quimiocinas, más preferentemente mediada por la quimiocina CXCL12. Por tanto,
30 estos compuestos, moléculas y/o composiciones inhiben la oligomerización del receptor de quimiocinas afectando, por tanto, a las vías de señalización de quimiocinas.

El término "inhibición", como se usa en la presente invención, se refiere a una inhibición, reducción, modulación, interferencia, cancelación o similar, total o parcial,
35 de modo que la oligomerización del receptor de quimiocinas y, por tanto, la

señalización mediada por quimiocinas no se produzca de la forma en que ocurriría en una célula de tipo normal, sana o silvestre (no manipulada).

La expresión "inhibir la respuesta celular mediada por quimiocinas", "inhibir la señalización mediada por quimiocinas", "inhibir las vías de señalización de quimiocinas", "inhibir los acontecimientos desencadenados por la señalización de quimiocinas" o similares se refieren a inhibir cualquier vía corriente abajo activada o desencadenada mediante la unión de la quimiocina (ligando) a su receptor. Preferentemente, pero sin limitación, las vías corriente abajo (*downstream*) activadas por quimiocinas comprenden la activación de las vías JAK/Stat, GRK / β -arrestina, Rho/Rac, PI3K/Akt, Grb2/Ras/RAF/ERK, PKC o NF κ β , ERK y/o Akt, lo que da como resultado acontecimientos tales como la migración, la polarización, la adhesión, el crecimiento, la compartimentación celulares y similares. Más preferentemente, la inhibición de la respuesta celular mediada por quimiocinas a la que se hace referencia en la presente invención comprende un flujo de calcio reducido, la falta de activación de AKT y ERK, dificultades para polarizar y/o adherirse al sustrato y/o la ausencia de migración celular, la falta de activación de neutrófilos, la reducción de la proliferación celular, la linfopoyesis, la supervivencia celular y/o la angiogénesis, bloqueando la metástasis de células tumorales en células en respuesta a la quimiocina CXCL12. La modificación en la función de CXCR4 referida en la presente invención también comprende la inhibición de la infección por VIH-1.

En una realización particular, el péptido de la invención se usa para diseñar nuevas moléculas de unión o de interferencia, preferentemente mediante peptidomiméticos.

Un fármaco peptidomimético, en su sentido más amplio, es un término utilizado para designar moléculas orgánicas que imitan algunas propiedades de ligandos peptídicos; por lo general son compuestos derivados de péptidos y proteínas y obtenidos mediante modificación estructural usando aminoácidos no naturales, restricciones conformacionales.

Las composiciones, combinaciones y métodos de la presente invención también incluyen los caracterizados por análogos peptidomiméticos de los péptidos descritos en el presente documento. Los análogos peptidomiméticos imitan la estructura tridimensional del sitio activo contenido en el péptido original. Por ejemplo, los análogos del péptido de la invención pueden ser de naturaleza semipeptídica o no peptídica. Estos análogos peptidomiméticos presentan ventajosamente una mayor vida útil y bioestabilidad en comparación con el compuesto original. Además, la

biodisponibilidad de estos análogos peptidomiméticos puede ser mayor que la de los péptidos correspondientes cuando se administran por vía oral o tópica. Además, estos análogos pueden presentar una actividad inmunomoduladora aumentada para la respuesta celular mediada por quimiocinas. Ha de entenderse que los análogos peptidomiméticos de la presente invención se caracterizan por actividades biológicas que son similares a las de los péptidos de hirudina que se describen en el presente documento. En consecuencia, estos análogos pueden emplearse en composiciones, combinaciones y métodos de la presente invención de la misma manera que el péptido de la invención. Ha de entenderse que el peptidomimético y análogos covalentes de la presente invención se caracterizan por actividades biológicas que son similares a las de los péptidos que se describen en el presente documento. En consecuencia, estos análogos pueden emplearse en composiciones, combinaciones y métodos para el diagnóstico, la terapia y la profilaxis de la misma manera que los péptidos de la presente invención.

15

Método de detección de la invención

En otro aspecto de la invención, el péptido de la invención se usa en un método de detección/búsqueda/selección de compuestos, moléculas y/o composiciones que inhiben la respuesta celular mediada por quimiocinas, preferentemente la quimiocina es CXCL12. En una realización específica, la invención se refiere al uso del péptido de la invención como diana farmacológica para la detección de compuestos, moléculas y/o composiciones útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método de detección *in vitro*, en lo sucesivo en el presente documento "el método de detección de la invención", para la detección, el diseño o la identificación de compuestos, moléculas y/o composiciones que inhiben la respuesta celular mediada por quimiocinas, preferentemente donde la quimiocina es CXCL12 o es útil para el tratamiento y/o la prevención de afecciones clínicas, procesos patológicos o enfermedades que implican la señalización de quimiocinas, preferentemente señalización de CXCL12, para el desarrollo de síntomas, donde dicho método comprende:

- a. poner en contacto el péptido de la invención o un receptor de quimiocinas, preferentemente el receptor CXCR4, con un compuesto, molécula y/o composición que se ha de someter a ensayo,
- b. analizar la unión o la interferencia entre el compuesto, molécula y/o

composición que se ha de someter a ensayo y la región que consiste en el péptido de la invención dentro de la secuencia de aminoácidos del receptor de quimiocinas y

5 c. clasificar el compuesto, molécula y/o composición como útil para inhibir la respuesta celular mediada por quimiocinas o útil para el tratamiento y/o la prevención de afecciones clínicas, procesos patológicos o enfermedades que implican señalización de quimiocinas para el desarrollo de síntomas, cuando se ha detectado unión o interferencia en la etapa (b).

10 "Poner en contacto el péptido de la invención o un receptor de quimiocinas, preferentemente el receptor CXCR4, con un compuesto, molécula y/o composición" significa la incubación del compuesto, molécula y/o composición que se ha de estudiar con el péptido de la invención o un receptor de quimiocinas, preferentemente el receptor CXCR4, en condiciones que permitan la unión de la molécula, compuesto o composición a la diana, donde el péptido de la invención es la diana. Si la molécula
15 que se ha de estudiar es un anticuerpo o un fragmento del mismo, la incubación se realiza en condiciones que permitan la formación y el control de los complejos antígeno-anticuerpo. Preferentemente, la diana y/o el compuesto, molécula o composición que se ha de someter a ensayo se marcan, más preferentemente con un marcador bioluminiscente o fluorescente.

20 El término "unión" se refiere a una unión física total o parcial o una unión que ejerce un impedimento estérico. El término "interferencia" se refiere a la capacidad del compuesto, molécula o composición para bloquear o inhibir total o parcialmente la actividad de la diana, preferentemente la actividad de oligomerización que la diana ejerce sobre el receptor de quimiocinas. Por tanto, un buen compuesto, molécula o
25 composición candidato será capaz de inhibir la oligomerización del receptor de quimiocinas, preferentemente el receptor CXCR4, mediada por quimiocinas, preferentemente por la quimiocina CXCL12.

Dependiendo de la naturaleza del compuesto, molécula y/o composición que se ha de someter a ensayo, el análisis de la unión o interferencia en la etapa (b) puede
30 realizarse, por ejemplo, pero sin limitaciones, mediante FRET ("transferencia de energía por resonancia fluorescente"), BRET (transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia), TIRF (microscopía de reflexión interna total), microscopía STED de alta resolución (agotamiento de emisión estimulada), Biacore (SPR, resonancia de plasmón superficial), citometría de flujo, Western blot, geles de electroforesis,
35 inmunoprecipitación, matrices de proteínas, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica,

ELISA o cualquier otro método enzimático; por medio de incubación usando un ligando específico, preferentemente CXCL12; por medio de RM o cualquier otra técnica de formación de imágenes de diagnóstico; o, por ejemplo, usando técnicas cromatográficas combinadas con espectrometría de masas.

5 En una realización preferida del método de la invención, la afección clínica, el proceso patológico o la enfermedad se selecciona entre enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer. Las definiciones de estas enfermedades y ejemplos de las mismas pueden encontrarse a continuación.

10

Anticuerpo de la invención

En otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención como antígeno para generar un anticuerpo que se une o interfiere con la respuesta celular mediada por quimiocinas.

15

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo donde dicho anticuerpo se une al péptido de la invención, en lo sucesivo en el presente documento el "anticuerpo de la invención". Dicho anticuerpo o fragmento del mismo puede identificarse mediante el método de detección de la invención y de este modo es capaz de inhibir la respuesta celular mediada por quimiocinas o de ser útil para el tratamiento y/o la prevención de afecciones clínicas, procesos patológicos o enfermedades que implican señalización de quimiocinas para el desarrollo de síntomas.

20

Un "anticuerpo" (utilizado indistintamente en forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos (por ejemplo, de longitud completa), sino también fragmentos de unión a antígeno de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenarios (scFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida,

35

incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgD, IgE, IgG, IgA o IgM (o subclase del mismo) y no es necesario que el anticuerpo sea de ninguna clase particular.

5 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las
10 diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o
15 más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CXCR4). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Dichas realizaciones de anticuerpos también pueden ser de formatos biespecíficos, específicos duales o multiespecíficos; que se
20 unen de forma específica a dos o más antígenos diferentes. Las construcciones de anticuerpos multiespecíficas, de doble especificidad y biespecíficas son bien conocidas en la técnica y se describen y caracterizan en Kontermann (ed.), *Bispecific Antibodies*, Springer, NY (2011) y Spiess C et al. (2015) *Mol Immunol* 67 (2 Parte A): 95-106.

25 Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los
30 dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward ES et al. (1989) *Nature* 341 (6242): 544-546; documento WO 90/05144 A1 incorporado en el presente documento por referencia), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) aislada. Además,
35 aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH están codificados por genes

separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird RE et al. (1988) *Science* 242 (4877): 423-426; Huston JS et al. (1988) *Proc Natl Acad. Sci USA* 85 (16): 5879-5883. Se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén incluidos dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger P et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (14): 6444-6448; Poljak RJ et al. (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Dichas porciones de unión a anticuerpo son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 págs. (ISBN 3-540-41354-5).

Se conocen numerosos métodos que pueden usarse para la obtención de anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la invención. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos usando métodos de ADN recombinante. También pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante generación de hibridomas (véase, por ejemplo, Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256 (5517): 495-497) de acuerdo con métodos conocidos. Después, los hibridomas formados de esta manera se detectan usando métodos convencionales, tales como el análisis por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y el análisis por resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, OCTET o BIACORE), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno específico. Puede usarse cualquier forma del antígeno especificado como inmunógeno, por ejemplo, antígeno recombinante, formas de origen natural, cualquier variante o fragmento de los mismos, así como péptido antigénico de los mismos (por ejemplo, cualquiera de los epítomos que se describen en el presente documento como un epítomo lineal o dentro de un armazón como un epítomo conformacional). Un método de ejemplo para producir anticuerpos incluye explorar bibliotecas de expresión de proteínas que expresan anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, scFv), por ejemplo, bibliotecas de presentación de fagos o ribosomas. La presentación en

fagos se describe, por ejemplo, en: la Patente de los EE.UU. N.º 5.223.409; Smith GP (1985) *Science* 228 (4705): 1315-1317; Clackson T et al. (1991) *Nature* 352 (6336): 624-628; Marks JD et al. (1991) *Journal of molecular biology* 222 (3): 581-597; documento WO92/18619; documento WO 91/17271; documento WO 92/20791; documento WO 92/15679; documento WO 93/01288; documento WO 92/01047; documento WO 92/09690; y documento WO 90/02809.

Además del uso de bibliotecas de presentación, el antígeno especificado (por ejemplo, el péptido de la invención) puede usarse para inmunizar un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster o rata. En una realización particular, el animal no humano es un ratón.

En otra realización particular, se obtiene un anticuerpo monoclonal del animal no humano y después se modifica, por ejemplo, quimérico, usando técnicas de ADN recombinante adecuadas. Se ha descrito una diversidad de enfoques para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison SL et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (21): 6851-6855; Takeda S et al. (1985) *Nature* 314 (6010): 452-454; Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567; Patente de los EE.UU. N.º 4.816.397; documento EP171496; documento EP0173494; documento GB 2177096B.

Para técnicas de producción de anticuerpos adicionales, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow et al., *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988. La presente divulgación no se limita necesariamente a ninguna fuente particular, método de producción u otras características especiales de un anticuerpo.

Ácido nucleico, construcción génica, vector y célula de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica el péptido, la proteína de fusión o el anticuerpo de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "ácido nucleico de la invención" y a una construcción génica que comprende dicho ácido nucleico, en lo sucesivo en el presente documento "construcción génica de la invención".

Los términos "péptido", "proteína de fusión" y "anticuerpo de la invención" se han definido anteriormente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido, la proteína de fusión y el anticuerpo de la invención son completamente aplicables al ácido nucleico y construcción génica de la invención.

Las expresiones "polinucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos,

ribonucleótidos y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. El término "polinucleótido" incluye, por ejemplo, moléculas monocatenarias, bicatenarias y triple helicoidales, un gen o fragmento génico, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Además de una molécula de ácido nucleico nativa, una molécula de ácido nucleico de la presente invención también puede comprender moléculas de ácido nucleico modificadas. Como se usa en el presente documento, ARNm se refiere a un ARN que puede traducirse en una célula.

En una realización preferida, el polinucleótido de la invención es un ARNm. El ARNm puede sintetizarse químicamente, puede obtenerse mediante transcripción *in vitro* o puede sintetizarse *in vivo* en la célula diana. Las secuencias de nucleótidos que forman el ácido nucleico que codifica el conjugado o proteína de fusión de la invención están en el mismo marco de lectura correcto para su expresión.

Las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden codificar los péptidos o polipéptidos maduros o preproteínas que consisten en un péptido señal unido al péptido o polipéptido maduro que posteriormente debe procesarse. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención también pueden comprender, además de la secuencia codificante, otros elementos, tales como intrones, secuencias no codificantes en los extremos 3' y/o 5', sitios de unión a ribosomas, sitios de restricción, etc. Estas secuencias de nucleótidos también pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que son útiles para la purificación o estabilidad de los péptidos o polipéptidos codificados.

La expresión "construcción génica", como se usa en el presente documento, se refiere al ácido nucleico de la invención junto con regiones adecuadas para regular la expresión de dicho ácido nucleico, incluyendo promotores, terminadores de la transcripción, regiones 5' y 3' no traducidas, señales de poliadenilación y similares. La expresión "construcción génica", "construcción genética" o "construcción de ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere a una unidad funcional necesaria para transferir, y preferentemente expresar, una secuencia de ácido nucleico de interés, en el presente documento las secuencias de nucleótidos de la invención como se describen, en una célula hospedadora. Estas construcciones génicas también comprenden preferentemente secuencias reguladoras o de control que incluyen, por ejemplo, un promotor, un potenciador, un terminador, etc., unidas

operativamente a la secuencia que codifica el péptido o polipéptido. Estas construcciones génicas se refieren a una molécula de ácido nucleico, mono o bicatenaria, que se aísla de un gen natural o que se modifica para contener segmentos de ácido nucleico de manera que de otro modo no existirían en la naturaleza. La
5 expresión "construcción de ácido nucleico" es sinónimo de la expresión "casete de expresión", cuando la construcción de ácido nucleico contiene las secuencias de control necesarias para la expresión de la secuencia de codificación.

Preferentemente, las construcciones génicas de la invención comprenden adicionalmente un promotor unido operativamente a las secuencias de ácido nucleico de la invención. El promotor puede ser, pero sin limitaciones, un promotor constitutivo
10 o inducible. Preferentemente, las construcciones génicas de la invención comprenden adicionalmente un terminador.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector, en lo sucesivo en el presente documento "vector de la invención", que comprende un polinucleótido de la
15 invención.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende las secuencias necesarias de manera que después de transcribir y traducir dichas secuencias en una célula se genere un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención. Dicha secuencia está
20 unida operativamente a segmentos adicionales que proporcionan su replicación autónoma en una célula hospedador de interés. Preferentemente, el vector es un vector de expresión, que se define como un vector que, además de las regiones de la replicación autónoma en una célula hospedadora, contiene regiones unidas operativamente al ácido nucleico de la invención y que son capaces de potenciar la
25 expresión de los productos del ácido nucleico de acuerdo con la invención. Los vectores de la invención pueden obtenerse por medio de técnicas ampliamente conocidas en la técnica.

Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a vectores víricos, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, plásmidos, cósmidos o vectores de
30 fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados a agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

El vector de la invención puede usarse para transformar, transfectar o infectar células que pueden transformarse, transfectarse o infectarse mediante dicho vector.
35 Dichas células pueden ser procarióticas o eucarióticas.

El vector preferentemente comprende el ácido nucleico de la invención unido operativamente a secuencias que regulan la expresión del ácido nucleico de la invención. Las secuencias reguladoras de uso en la presente invención pueden ser promotores nucleares o, como alternativa, secuencias potenciadoras y/u otras
5 secuencias reguladoras que aumenten la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. En principio, puede usarse cualquier promotor en la presente invención a condición de que dicho promotor sea compatible con las células donde se ha de expresar el ácido nucleico.

El vector de expresión de la invención se introduce en una célula hospedadora
10 de manera que el vector permanezca como un constituyente cromosómico o como un vector autorreplicante extracromosómico. Son ejemplos de vectores de expresión, pero sin limitaciones, fagos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales de levadura (YAC), cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales humanos (HAC) o vectores víricos, tales como adenovirus, retrovirus o lentivirus. Son ejemplos
15 de vectores de expresión apropiados para la inserción de los polinucleótidos de la invención, preferentemente pero sin limitaciones, pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, Co1E1, pCR1, RP4, plásmidos pET, fagos y vectores "iniciadores", tales como pSA3 y pAT28; vectores de expresión de levadura tales como el plásmido de 2 micrómetros de *Saccharomyces cerevisiae*, plásmidos de
20 integración, vectores YEP, plásmidos de centrómero y similares; vectores de expresión en células de insecto tales como los vectores de las series pAC y pVL; vectores de expresión en células vegetales tales como piBi, pEarleyGate, PAVA, pCAMBIA, PGSA, PGWB, PMDC, PMY, series de poros y similares, y otros plásmidos de expresión de proteínas utilizados en células eucariotas, incluyendo baculovirus adecuados para la
25 transfección celular.

Además, las construcciones génicas de la invención comprenden preferentemente un marcador, tal como un gen resistente a la ampicilina. Dichos plásmidos están disponibles en el mercado (serie pUC (Takara S buzo), serie pPROK (Clontech), pKK233-2 (Clontech), etc.). Como alternativa, el marcador puede ser otro
30 gen resistente a fármacos tal como un gen resistente a kanamicina, neomicina o cloranfenicol, o un gen de fluorescencia, tal como luciferasa, GFP, mCherry y similares. O el marcador puede ser un marcador genético auxótrofo.

En otro aspecto de la invención, se refiere a una célula aislada, preferentemente una célula eucariótica, más preferentemente una célula de mamífero,
35 incluso más preferentemente una célula humana, en lo sucesivo en el presente

documento "célula de la invención", que comprende el péptido, proteína de fusión, anticuerpo, ácido nucleico, construcción génica o vector de la invención.

El término "aislado" significa que el elemento se ha separado y extraído de su entorno natural o se ha sintetizado *in vitro* y que está fuera de un organismo vivo (*ex vivo*).

El péptido, la proteína de fusión, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica y el vector de la invención se han definido anteriormente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido, la proteína de fusión, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica y el vector de la invención son completamente aplicables al ácido nucleico y la construcción génica de la invención.

Las células adecuadas en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de mamífero, de levadura, vegetales, de insecto, fúngicas y bacterianas.

Composición farmacéutica de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido, proteína de fusión, nanopartícula, partícula similar a virus, anticuerpo, ácido nucleico, construcción génica, vector o célula de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, la partícula similar a virus, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector y la célula de la invención se han definido anteriormente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, la partícula similar a virus, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector y la célula de la invención son completamente aplicables al ácido nucleico y a la construcción génica de la invención.

Como se usa en la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una formulación que se ha adaptado para administrar una dosis predeterminada de uno o varios agentes terapéuticos útiles a una célula, un grupo de células, un órgano, un tejido o un animal en el que la división celular está descontrolada, tal como el cáncer.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se entiende como una cantidad capaz de proporcionar un efecto terapéutico y que puede ser determinada por el experto en la materia por medios utilizados habitualmente. La cantidad del péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, el

virus o la partícula vírica o la célula de la invención que puede incluirse en las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención variará dependiendo del sujeto y el modo particular de administración. Los expertos en la materia apreciarán que las dosificaciones también pueden determinarse con la orientación de *Goodman*
5 *and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, novena edición (1996), apéndice II, páginas 1707-1711 y de *Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, décima edición (2001), Apéndice II, páginas 475-493.

La dosificación apropiada del principio o principios activos dentro de la composición farmacéutica dependerá del tipo de enfermedad que se ha de tratar, de la
10 gravedad y del curso de la enfermedad, de si la composición se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica y de la respuesta del paciente a la composición y de la discreción del médico especialista. La cantidad del péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, el virus o la partícula vírica o la célula de la invención se
15 administra adecuadamente al paciente de una sola vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, un nivel de dosificación apropiado generalmente será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg; más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg/kg, incluso más preferentemente de aproximadamente 0,75 a
20 aproximadamente 2,5 mg/kg, aún más preferentemente aproximadamente 1 mg/kg, que puede administrarse en dosis únicas o múltiples. Los compuestos pueden administrarse en una pauta de 1 a varias veces por día o por dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete días, preferentemente una vez cada dos días. La composición farmacéutica puede administrarse durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 o más
25 días, preferentemente durante 14 días. La composición farmacéutica puede administrarse preferentemente una vez cada dos días durante 14 días.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también contienen uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. Se entiende por "excipiente farmacéuticamente aceptable" una sustancia terapéuticamente inactiva
30 que se dice que se usa para incorporar el principio activo y que es aceptable para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que lo fabrica desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad. El excipiente o vehículo también incluye cualquier sustancia que sirva para mejorar la
35 entrega y la eficacia del principio activo dentro de la composición farmacéutica. Los

ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia de la proteína de fusión o de las composiciones que forman parte de las composiciones farmacéuticas. Se conocen bien en la bibliografía ejemplos de vehículos apropiados (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). Son ejemplos de vehículos sin limitación una serie de sacáridos tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol; una serie de almidones tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; una serie de celulosa tal como celulosa, metil celulosa, carboximetil celulosa de sodio e hidroxipropilmetil celulosa; y una serie de cargas tales como gelatina y polivinilpirrolidona. En algunos casos, puede añadirse un disgregante tal como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o alginato de sodio.

El número y la naturaleza de los excipientes farmacéuticamente aceptables dependen de la forma de dosificación deseada. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos por el experto en la materia (Faulí y Trillo C. (1993) "*Tratado de Farmacia Galénica*", Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid). Dichas composiciones pueden prepararse por medio de los métodos convencionales conocidos en el estado de la técnica ("*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*", 20ª edición (2003) Genaro A.R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, EE.UU.).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por cualquier tipo de vía adecuada, tal como por vía oral, nasal, ocular, tópica, intradérmica, intracraneal o intravenosa. La vía de administración preferida de dichas composiciones farmacéuticas es la vía oral, nasal, ocular, tópica, intracraneal o intradérmica.

La "vía oral" se entiende como la composición farmacéutica incorporada dentro del organismo después de la deglución.

La "vía nasal" se entiende como la administración de la composición farmacéutica insuflada a través de la nariz.

La "vía ocular" se entiende como la administración tópica de la composición

farmacéutica por instilación directamente en el ojo.

La "vía tópica" se entiende como la aplicación en el exterior del cuerpo, tal como, sin limitación, la piel, el cuero cabelludo y las uñas; y también la aplicación a mucosas tales como, sin limitación, la mucosa bucal, nasal o rectal.

5 La "vía intradérmica" se entiende como la administración de la composición farmacéutica mediante la inyección en la dermis.

La "vía intracraneal" se entiende como la administración de la composición farmacéutica dentro del cráneo.

10 La "vía intravenosa" se entiende como la administración de la composición farmacéutica mediante la inyección en el flujo sanguíneo.

Usos médicos de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere al péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, la partícula similar a virus, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula o la composición farmacéutica de la invención para su uso en medicina.

20 Como alternativa, la invención se refiere al uso del péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, la partícula similar a virus, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula o la composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento.

Los autores de la presente invención han demostrado que el péptido de 9 aminoácidos de longitud que contiene una secuencia conservada de 9 restos del dominio transmembrana VI (TMVI) fue eficaz como inmunomodulador para la respuesta celular mediada por quimiocinas, en particular para CXCL12, y también es una diana para diseñar nuevas moléculas que interfieren con la multimerización del receptor, en particular anticuerpos. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, la partícula similar a virus, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer.

35 Como alternativa, la invención se refiere a un método para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido, proteína de fusión, nanopartícula, partícula similar

a virus, anticuerpo, nucleico ácido, construcción génica, vector, célula o composición farmacéutica de la invención.

Se ha notificado que la inmunomodulación de la respuesta celular mediada por quimiocinas es útil en varias enfermedades, incluyendo enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer (Charo IF y Ransohoff RM (2006) *N Engl J Med* 354 (6): 610-621; Balkwill F (2004) *Nat Rev Cancer* 4 (7): 540-550; Bachelier F et al. (2014) *Pharmacological reviews* 66 (1): 1-79). Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, la partícula similar a virus, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer.

Como alternativa, la invención se refiere al uso del péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, la partícula similar a virus, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula o la composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades crónicas inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer.

Como alternativa, la invención se refiere a un método para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, la partícula similar a virus, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula o la composición farmacéutica de la invención.

El péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, la partícula similar a virus, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula y la composición farmacéutica de la invención se han definido anteriormente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula y la composición farmacéutica de la invención son completamente aplicables a los usos médicos de la invención.

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proceso, acción, aplicación, terapia o similar, donde a un sujeto (o paciente), incluyendo un ser humano, se le proporciona asistencia médica con el fin de mejorar la afección del sujeto, directa o indirectamente, o ralentizar la progresión de una afección o trastorno en el sujeto, o mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno

en tratamiento.

El término "prevención", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad del péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula y la composición farmacéutica de la invención, para prevenir, minimizar o dificultar la progresión de una enfermedad.

El término "paciente" o "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal, preferentemente un mamífero, e incluye, entre otros, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores como ratas y ratones. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier edad o raza.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se ha definido anteriormente.

En algunas realizaciones, el medicamento de la invención se usa como una coterapia tal como, por ejemplo, la administración junto con radiación, cirugía u otros productos quimioterápicos. En algunas realizaciones, el medicamento se administra en combinación con un agente anticancerosos adicional. En la técnica se conoce una amplia diversidad de agentes anticancerosos (es decir, antineoplásicos) e incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antineoplásicos naturales, agentes antineoplásicos hormonales, inhibidores de angiogénesis, reactivos de diferenciación, inhibidores de ARN, anticuerpos o agentes inmunoterápicos, agentes de terapia génica, inhibidores enzimáticos de molécula pequeña, modificadores de respuesta biológica y agentes antimetastásicos.

En algunas realizaciones, el medicamento de la invención puede usarse como una terapia adyuvante (es decir, tratamiento adicional).

Algunas realizaciones se refieren a la administración del medicamento de la invención como terapia neoadyuvante, que se administra antes de un tratamiento primario.

La expresión "enfermedad inflamatoria crónica" también conocida como EIC, como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad caracterizada por la inflamación prolongada debida a patógenos no degradables, infección vírica, cuerpos extraños persistentes o reacciones autoinmunitarias que persisten hasta muchos meses o años, y donde los resultados son la destrucción, la fibrosis y/o la necrosis del tejido. Son ejemplos no limitantes de enfermedad inflamatoria crónica: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (lupus), esclerosis múltiple, aterosclerosis, artritis psoriásica (APs), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que

incluye colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), etc.

La expresión "enfermedad autoinmunitaria" como se usa en el presente documento, se refiere a una afección que surge de una respuesta inmunitaria anormal a una parte normal del cuerpo. Los ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunitarias incluyen: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (lupus), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que incluye colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC), esclerosis múltiple (EM), diabetes mellitus de tipo 1, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, psoriasis, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, vasculitis, etc.

El término "inmunodeficiencia", como se usa en el presente documento, se refiere a una afección en la que la capacidad del sistema inmunitario para combatir las enfermedades infecciosas y el cáncer está comprometida o completamente ausente. La mayoría de los casos de inmunodeficiencia se adquieren ("secundarios") debido a factores extrínsecos que afectan al sistema inmunitario del paciente, los ejemplos de estos factores extrínsecos incluyen la infección por VIH, los extremos de edad y los factores ambientales, tales como la nutrición. A veces puede conseguirse mediante la inmunosupresión por algunos fármacos, tales como los esteroides, ya sea como un efecto adverso o el objetivo previsto del tratamiento. En esta definición se incluyen los defectos intrínsecos en su sistema inmunitario o inmunodeficiencias primarias. Una persona inmunocomprometida puede ser particularmente vulnerable a las infecciones oportunistas. La inmunodeficiencia también disminuye la inmunosupervisión contra el cáncer, en la que el sistema inmunitario detecta las células corporales y destruye las neoplásicas. Los ejemplos de trastornos de inmunodeficiencia primaria incluyen, de manera no limitante: agammaglobulinemia ligada a X (XLA, por sus siglas en inglés), inmunodeficiencia variable común (IDCV, por sus siglas en inglés), inmunodeficiencia combinada grave (IDCG, por sus siglas en inglés), etc. Los ejemplos no limitantes de trastornos de inmunodeficiencia secundaria incluyen: quemaduras graves, quimioterapia, radiación, diabetes, desnutrición, intoxicación por metales, etc. Los ejemplos no limitantes de enfermedades de inmunodeficiencia secundaria incluyen: SIDA, cánceres del sistema inmunitario (leucemia), enfermedades del inmunocomplejo (hepatitis vírica), mieloma múltiple, etc.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad caracterizada por la división celular descontrolada (o por un aumento de la supervivencia o la resistencia a la apoptosis) y por la capacidad de dichas células

para invadir otros tejidos vecinos (invasión) y diseminarse a otras áreas del cuerpo donde las células no se localizan normalmente (metástasis) a través de los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente sanguíneo y después invadir tejidos normales en otras partes del cuerpo. Dependiendo de si pueden diseminarse o no por invasión y metástasis, los tumores se clasifican como benignos o malignos: los tumores benignos son tumores que no pueden diseminarse por invasión o metástasis, es decir, que solo crecen localmente; mientras que los tumores malignos son tumores que son capaces de diseminarse por invasión y metástasis. Los procesos biológicos que se sabe que están relacionados con el cáncer incluyen la angiogénesis, la infiltración de células inmunitarias, la migración celular y la metástasis. Como se usa en el presente documento, el término cáncer incluye, pero no se limita a, los siguientes tipos de cáncer: cáncer de mama; cáncer de vías biliares; cáncer de vejiga; cáncer de cerebro que incluye glioblastomas y meduloblastomas; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias hematológicas que incluyen leucemia linfocítica aguda y mielógena; leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos T; leucemia de células pilosas; leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple; leucemias asociadas al SIDA y leucemia/linfoma de linfocitos T adultos; neoplasias intraepiteliales que incluyen la enfermedad de Bowen y la enfermedad de Paget; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; linfomas, que incluyen la enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer oral que incluye carcinoma de células escamosas; cáncer de ovario, que incluye los que surgen de células epiteliales, células del estroma, células germinales y células mesenquimales; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer de recto; sarcomas que incluyen leiomioma, rhabdomioma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel que incluye melanoma, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células basales y cáncer de células escamosas; cáncer de testículo que incluye tumores germinales tales como seminoma, no seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores del estroma y tumores de células germinales; cáncer de tiroides que incluye adenocarcinoma de tiroides y carcinoma medular; y cáncer renal que incluye adenocarcinoma y tumor de Wilms.

El péptido, la proteína de fusión, la nanopartícula, el anticuerpo, el ácido nucleico, la construcción génica, el vector, la célula y la composición farmacéutica de la invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, la vía oral, nasal, ocular, tópica, intradérmica, intracraneal o intravenosa. La vía de administración

preferida es la vía oral, nasal, ocular o intradérmica.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente
5 invención. Los métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento pueden usarse en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Serán evidentes para los expertos en la materia objetos, ventajas y
10 características adicionales de la invención tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. La invención se describe en el presente documento con más detalle por medio de los siguientes ejemplos que han de considerarse meramente ilustrativos y no limitantes del alcance de la invención.

15 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. CXCR4 forma nanoagregados y muestra diversos tipos de movimiento en la superficie de los linfocitos T. (A-B) Imágenes de STED representativas de CXCR4 en células de estado estacionario, linfocitos T (A) y células CD4+ Jurkat (B) junto con ampliaciones en regiones de la membrana específicas
20 (recuadros cuadrados). La escala del pseudo-código de color indica la intensidad de manchas individuales marcadas con CXCR4/AF488, desde el dímero (color gris oscuro) hasta el más claro (de color gris a color blanco). La distribución de intensidad (representación superior) de manchas de CXCR4 individuales en la membrana celular (línea continua) y de anticuerpos individuales unidos no específicamente a vidrio (línea
25 discontinua), se obtiene a partir de imágenes de STED. Se obtienen histogramas de probabilidad (representación inferior) de la distribución del receptor CXCR4 a partir del análisis de los datos de distribución de intensidad. 2076 manchas para células CD4+ Jurkat y 2575 manchas para linfocitos T de 30 células en 2-3 experimentos de STED independientes. (C) Trayectorias representativas (I-confinada, II-Browniano/libre, III-
30 transporte directo) de partículas de CXCR4-AcGFP que difunden en la membrana en momentos indicados, detectadas por SPT-TIRF en células JKCD4 en reposo. La posición centroide de la mancha (círculo) se rastreó (línea negra). (D) Porcentaje de trayectorias de CXCR4-AcGFP clasificadas como inmóviles o móviles. 593 trayectorias de 22 células JKCD4 en tres experimentos independientes. (E) Gráficos de DCM
35 representativos de trayectorias individuales de CXCR4-AcGFP que muestran

diferentes tipos de movimiento. (F) Porcentaje de trayectorias individuales que presentan diferentes tipos de movimiento, clasificadas por EEM. 192 trayectorias de 22 células en tres experimentos independientes. (G) Coeficientes de difusión de lapsos de tiempo cortos (D1-4) de las trayectorias individuales analizadas en F) con la mediana
5 indicada. (H) Distribución de intensidad de trayectorias de CXCR4-AcGFP individuales, promediada en los primeros 20 marcos y restada del fondo. 595 trayectorias en 5 experimentos independientes, la media se indica en la figura. (I) Porcentaje del número de receptores/partículas extraídos de la distribución de la intensidad de trayectorias de CXCR4-AcGFP individuales (H) (véanse los métodos). (J) Porcentaje
10 de etapas discretas de fotoblanqueo de trayectorias de CXCR4-AcGFP individuales. 151 trayectorias de 8 células diferentes en dos experimentos independientes.

Figura 2. La unión a CXCL12 modula la dinámica de CXCR4 y potencia el nanoagrupamiento del receptor. (A-F) Análisis por SPT de CXCR4-AcGFP en células JKCD4 en cubreobjetos recubiertos con FN o FN+CXCL12. (A) Coeficiente de
15 difusión (D1-4) de trayectorias individuales, con la mediana indicada. 427 trayectorias en 23 células en condiciones de equilibrio (FN) y 424 trayectorias en 24 células cultivadas en placas en FN+CXCL12 ($n = 3$; * $p \leq 0,05$). (B) Porcentaje de trayectorias móviles e inmóviles en la membrana celular. 593 trayectorias en 23 células (FN); 651 trayectorias en 24 células (FN+CXCL12) ($n = 3$, ** $p \leq 0,001$). (C) Porcentaje de la
20 cantidad de receptores/partículas. 595 trayectorias a partir de 23 células (FN) y 673 trayectorias a partir de 24 células (FN+CXCL12), en 5 experimentos independientes). (D) Porcentaje de partículas móviles e inmóviles analizadas como en B), en función del tamaño de partícula (monómero: 1; dímero: 2, nanoagregado: ≥ 3 receptores/partícula). (E) Porcentaje de trayectorias de partícula única de células
25 estimuladas con CXCL12, clasificadas por el tipo de movimiento usando análisis por EEM (254 trayectorias en 24 células de 3 experimentos independientes). (F) D1-4 de trayectorias individuales que muestran un movimiento confinado (izquierda) o libre (derecha) asociado a su tamaño. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$). (G-H) Imágenes representativas de STED de CXCR4 en células Jurkat CD4+ (G) y linfocitos T (H)
30 activados con CXCL12, con ampliaciones en regiones de membrana específicas (cuadrado). Barra de escala: 1 μm . Distribución de probabilidad del número de receptores/mancha (parcelas inferiores) para los dos tipos celulares diferentes, en condiciones de estado estacionario (barra gris) y tras la estimulación con CXCL12 (barra blanca). 1446 manchas individuales para células CD4+ Jurkat y 1849 para
35 linfocitos T, 30 células en 2-3 experimentos de STED independientes.

Figura 3. La región transmembrana CXCR4 VI tiene un papel clave en el agrupamiento de receptores. (A) Esquema de un homodímero de CXCR4 modelado en la estructura cristalina de CXCR4 resuelta (PDB: 3OE8), generado en el servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Las regiones transmembrana que se prevén implicadas en la oligomerización de CXCR4 se representan en color oscuro.

5 (B) Se preincubaron células CD4+ Jurkat con péptidos indicados o con el péptido diluyente (DMSO, control) y se les permitió migrar (CXCL12). Los datos se muestran como la media \pm DT ($n = 5$; *** $p \leq 0,0001$). (C) Se preincubaron células 293T, cotransfectadas transitoriamente a una relación fija de CXCR4-YFP: CXCR4-CFP 1:1, con DMSO (control) o con los péptidos 221TMV o 239TMVI y se evaluó la eficacia de FRET. Los datos se muestran como media \pm DT ($n = 3$, *** $p \leq 0,0001$).

10 (D) Distribución de intensidades (unidades arbitrarias; u.a.) de trayectorias de CXCR4 individuales en células JKCD4 no estimuladas y estimuladas con CXCL12, pretratadas con 221TMV, péptidos 239TMVI o DMSO (control) (221TMV basal 1750 trayectorias a partir de 71 células; 239TMVI basal 916 a partir de 62 células; control basal 1031 a partir de 56 células; 221TMV estimulado por CXCL12 1157 a partir de 58 células; 239TMVI estimulado por CXCL12 1104 a partir de 59 células; control estimulado por CXCL12 1200 trayectorias a partir de 48 células). Media indicada con barra horizontal ($n = 3$; no significativo, $p > 0,05$, *** $p \leq 0,0001$).

15 (E) A la izquierda, restos en la región TMVI (representación de barra, color oscuro) que se prevé que están implicados en la interfaz de nanoagrupamiento de CXCR4 (TMVIwt). Derecha, restos mutados (TMVImut).

20 (F) Curvas de saturación de FRET usando células 293T transfectadas transitoriamente con una cantidad constante de CXCR4wt-CFP o CXCR4mut-CFP y cantidades crecientes de CXCR4wt-YFP o CXCR4mut-YFP. Datos ajustados a la ecuación de regresión no lineal asumiendo un sitio de unión. Los valores de FRET_{máx} y FRET₅₀ se compararon mediante un ensayo F de suma de cuadrados extra ($n = 4-6$, * $p \leq 0,05$).

25 (G) Porcentaje de receptor/partícula de JKCD4 wt no estimulado (595 trayectorias de 22 células $n = 3$) y células JKCD4 mut (996 trayectorias de 24 células, $n = 3$). Para facilitar la comparación, la Fig.1I (JKCD4 wt) también se reproduce en la figura.

30 (H) Células como en G) o J células K-CD4 mut (barras sombreadas). Porcentaje de receptores/partículas a partir de células estimuladas por CXCL12 (CXCR4wt: 669 trayectorias de 24 células; CXCR4mut, 420 trayectorias de 22 células; JK-CD4 mut, 392 trayectorias de 22 células, $n = 3$). Para facilitar el análisis comparativo, la Fig. 2C (JKCD4 wt, FN+CXCL12) se reproduce aquí.

35 (I) Se muestra la distribución D1-4 de partículas de CXCR4 de estado estacionario o estimuladas con

CXCL12 con la mediana indicada (horizontal line), usando células JK-CD4 mut o CD4+ Jurkat electroporadas con un ARNip no diana (control) y con CXCR4mut-AcGFP (células JKcCD4 mut; JKcCD4 mut en estado estacionario 792 trayectorias de 26 células; JK-CD4 113 en estado estacionario a partir de 14 células; JKcCD4 mut estimadas con CXCL12 281 a partir de 22 células; JK-CD4 mut estimadas con CXCL12 272 trayectorias a partir de 22 células; n = 3). (J) Porcentaje de trayectorias móviles e inmóviles de CXCR4 (como en la Figura 2B) en células JK-CD4 mut no estimuladas (336 trayectorias a partir de 22 células, n = 3).

Figura 4. El receptor mutante CXCR4 de oligomerización deficiente y el péptido 239TMVI reducen las respuestas celulares mediadas por CXCL12. (A) Análisis por inmunotransferencia de la asociación de la proteína de G α i a células KG1a transfectadas con CXCR4wt-AcGFP o CXCR4mut-AcGFP en respuesta a CXCL12. Parte inferior, datos de densitometría con media \pm DT (n = 3). (B) Células 293T no estimuladas y estimuladas con CXCL12 cotransfectadas transitoriamente a una relación G α i-Rluc:CXCR4mut-YFP fija. El gráfico muestra cambios en la eficiencia de la relación de BRET (n = 3; no significativo, p > 0,05). (C) Respuesta de flujo de Ca $^{2+}$ a CXCL12 en células 293T transfectadas con CXCR4wt-CFP o CXCR4mut-CFP (n = 3; * p \leq 0,05) (D) Análisis de inmunotransferencia de pERK1/2 y -pAkt en respuesta a CXCL12 en células como en A. Se usa Akt total como control de carga. (E) Quimiotaxis inducida por CXCL12 de células JK-CD4 wt y JK-CD4 mut (n = 3; * p \leq 0,05). (F) DIC de lapsos de tiempo fusionados (indicados en s) e imágenes de fluorescencia de células representativas JK-CD4 wt y JK-CD4 mut como en E, en bicapas lipídicas que contienen ICAM1 recubiertas con CXCL12. Puntas de flecha, células controladas en cada condición. Perfiles de área de contacto celular (μm^2) estimados por IRM. (G) Frecuencia de adherencia de las células como en F) a bicapas lipídicas recubiertas con CXCL12 que contienen ICAM-1 (n = 3; *** p \leq 0,0001). (H) Migración inducida por CXCL12 de neutrófilos de ratón pretratados con 221TMV, péptidos 239TMVI, el diluyente (DMSO) o PTx (n = 3; ** p \leq 0,001, *** p \leq 0,0001). (I) Cuantificación de neutrófilos marcados con CMFDA transferidos adoptivamente obtenidos de médula ósea de ratones C57BL/6 receptores 1 hora después de la transferencia celular. Antes de la transferencia, los neutrófilos se preincubaron como en H (n = 3; ** p \leq 0,001, *** p \leq 0,0001).

Figura 5. Homología de secuencia en la región TMVI KTTVILILA de la familia de receptores de quimiocinas. Alineación de secuencias múltiples de la región correspondiente a KTTVILILA (SEQ ID NO: 2) en todos los receptores de

quimiocinas, realizada con la prestación <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>. Aunque los restos de aminoácidos no se conservan, esta región se conserva estructuralmente en otros miembros de la familia de receptores de quimiocinas.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1. CXCR4 muestra diferentes tipos de trayectorias en la superficie de los linfocitos T.

Los inventores utilizaron microscopía de agotamiento de emisión estimulada (STED, *stimulated emission depletion*) para visualizar la oligomerización de CXCR4 en linfocitos T vírgenes o *naïve* (linfocitos T) y en la estirpe de linfocitos T CD4⁺ Jurkat (JKCD4⁺). La mayoría de los receptores se encontraron en forma de monómeros y dímeros (~80% en linfocitos T y ~35% en células JKCD4⁺), pero también se detectaron nanoagrupamientos (*nanoclusters*), complejos formados por más de tres receptores (~20% y 65%, respectivamente) (Figura 1A-B). Para evaluar la dinámica de CXCR4, los inventores usaron el seguimiento de partículas individuales (SPT, por sus siglas en inglés) en el modo de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) y transfectaron células JKCD4⁺ con CXCR4 fusionadas con la proteína monomérica AcGFP (JKCD4⁺-X4). Primero se estimaron las densidades de partículas apropiadas para la obtención de imágenes TIRF usando AcGFP purificado inmovilizado en vidrio. Solo las películas con densidades de partículas $\leq 4,5$ partículas/ μm^2 se usaron para detectar y rastrear CXCR4. Se reconstruyeron trayectorias de los receptores usando un algoritmo de rastreo de partículas para seguir partículas individuales y capturar su fusión y separación de otras partículas (Figuras 1C, D). En estado estacionario, el ~28% de las partículas de CXCR4 eran inmóviles (Figuras 1E); los receptores restantes mostraron perfiles de difusión distintos (Figuras 1F), como se demostró mediante diagramas de desplazamiento cuadrado medio (DCM) (Manzo C y García-Parajo MF (2015) *Rep Prog Phys* 78 (12): 124601) y se clasificaron usando el espectro de escalado de momento (EEM) (Ewers H et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (42): 15110-15115). La mayoría de estas partículas móviles (~78%) mostraron una movilidad restringida dentro de regiones de ~200 nm; el ~15% exhibieron difusión sin movimiento Browniano y el ~7% eran partículas con movimiento dirigido (Figuras 1G). La mediana del coeficiente de difusión ($D_{1,4}$) para las partículas de CXCR4 varió de $0,0037 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ para receptores confinados a $0,0094 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ para CXCR4 con movimiento de transporte directo (Figura 1H). Para estimar la estequiometría puntual,

se midió la intensidad de fluorescencia promedio para los primeros 50 marcos de cada trayectoria (Figura 1I) y se usó como referencia la intensidad de la proteína monomérica CD86-AcGFP (Calebiro D et al. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110 (2): 743-748). La mayoría de las partículas CXCR4 eran monómeros (~23%), dímeros (~47%) y trímeros (~19%), aunque también se identificaron complejos de 4 a 6 receptores (~1% eran hexámeros) (Figura 1J).

Se descartó la influencia de CXCR4 expresado endógenamente en el sistema celular, ya que el tamaño de agrupamiento y los parámetros dinámicos fueron similares cuando se analizaron las células JKCD4⁺ en las que CXCR4 endógeno estaba regulado negativamente por ARNip antes de la transfección con CXCR4-AcGFP (JKCD4⁺si). Los datos indican que los monómeros CXCR4, los dímeros y los nanoagrupamientos pequeños dinámicos coexisten en la membrana de los linfocitos T.

Ejemplo 2. La unión de CXCL12 desencadena el agrupamiento de CXCR4 y modula la dinámica de las partículas.

Como la unión de CXCL12 al receptor promueve cambios conformacionales en complejos de CXCR4 y aumenta el número de dímeros de CXCR4 (Schiraldi M et al. (2012) *J Exp Med* 209 (3): 551-5639), se usó SPT-TIRFM para evaluar el efecto del ligando sobre la dinámica de CXCR4. Se cultivaron en placas células JKCD4⁺-X4 en placas recubiertas con fibronectina o fibronectina/CXCL12 y se siguió la movilidad lateral de las partículas individuales a lo largo del tiempo. CXCL12 promovió una reducción significativa en la difusividad total de CXCR4 (basal, D_{1-4} : $0,0047\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$; CXCL12, $0,0042\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) y aumentó el porcentaje de partículas inmóviles del ~27% (basal) al ~35% (CXCL12) (Figuras 2A, B). Estos datos coinciden con los publicados para otros GPCR después de la activación del agonista (Baker A et al. (2007) *Eur Biophys J* 36 (8): 849-860). También se detectó un mayor número de nanoagrupamientos más grandes en la membrana de células activadas con CXCL12 (un ~70% de nanoagrupamientos con ≥ 3 receptores, en comparación con el ~30% de nanoagrupamientos similares en condiciones basales (Figura 2C); un ~22% de partículas inmóviles eran nanoagrupamientos formados por ≥ 3 receptores/partícula en comparación con el ~7% en estado estacionario (Figura 2D). Estas diferencias fueron incluso mayores cuando solo se tuvieron en cuenta nanoagrupamientos más grandes (4-7 receptores/partícula). Estos resultados indican un nanoagrupamiento de receptor desencadenado por CXCL12, que afecta a la dinámica de CXCR4 en la membrana celular.

Usando STED, se validó la estimulación por CXCL12 del agrupamiento de receptores en células JKCD4⁺ y en linfocitos T; CXCL12 promovió el agrupamiento de CXCR4 hasta un máximo de 10 a 18 receptores/partícula (Figuras 2G-H). El ligando redujo de este modo el porcentaje de monómeros y dímeros a expensas de aumentar el número de nanoagrupamientos grandes y promover su inmovilización.

Sin embargo, el agrupamiento mediado por CXCL12 no se alteró cuando las células se pretrataron con PitStop2 o brefeldina A, fármacos que bloquean los pocillos recubiertos de clatrina y el tráfico de vesículas, respectivamente (Figuras 2I-J), lo que indica que el agrupamiento de receptores mediado por ligando no se asociaba a procesos de internalización.

Ejemplo 3. K239E, V2424 y L246A en CXCR4 TM VI son restos esenciales para el agrupamiento del receptor y las funciones inducidas por CXCL12.

La estructura cristalina de CXCR4 muestra un homodímero cuya interfaz está localizada en las regiones transmembrana (Wu B et al. (2010) *Science* 330 (6007): 1066-1071). Los inventores predijeron de este modo oligómeros como complejos formados por entidades diméricas y realizando un análisis informático para determinar los restos en las regiones TM de CXCR4 implicadas en la oligomerización del receptor sin alterar los homodímeros del receptor. Los análisis revelaron varios péptidos transmembrana en TMIV, TMV, TMVI y TMVII (Figura 3A), que se exploraron para determinar su capacidad para antagonizar la migración celular mediada por CXCL12. El péptido basado en CXCR4 TMVI ²³⁹KPTVILILA²⁴⁷ (SEQ ID NO: 5) (²³⁹TMVI), que bloqueó la migración de la célula JKCD4⁺ mediada por CXCL12 (Figura 3B), se seleccionó para estudios adicionales. Los péptidos restantes no alteraron las funciones mediadas por CXCR4, lo que confirma la especificidad del efecto. El péptido sintético TMV ²²¹IIISKLSH²²⁸ (SEQ ID NO: 10) (²²¹TMV) se eligió como control para experimentos posteriores (Figura 3B). El tratamiento con ²³⁹TMVI promovió específicamente un aumento significativo en la eficacia de FRET de homodímeros de CXCR4, lo que confirmó su interacción con CXCR4 sin alterar los complejos homodiméricos. El tratamiento con control ²²¹TMV no modificó la eficiencia de FRET basal (Figura 3C). Ambos péptidos se incorporaron a la membrana celular, como se muestra mediante citometría de flujo usando péptidos marcados con biotina.

Sobre la base de los efectos *in vitro* del péptido TMVI, los inventores exploraron informáticamente los restos de aminoácidos de ²³⁹TMVI que tenían sus cadenas laterales en el lado externo del complejo receptor (Figura 3D). Los inventores

generaron un mutante puntual triple (sustituciones K239E, V242A y L246A; X4mut), en la región de contacto teórico de oligómeros de CXCR4 (Figura 3D), que se evaluó en detalle. En células JKCD4⁺si transfectadas transitoriamente con CXCR4mut (X4mut) y CXCR4 de tipo silvestre (X4wt), la tinción anti-CXCR4 demostró que los dos
5 receptores se expresaban por igual en las membranas celulares (Figura 3E), CXCL12 unido (K_D de X4wt: 0,60 nM, K_D de X4mut: 0,62 nM) y se internalizaban de manera similar en respuesta al ligando (Figura 3F). También formaron homodímeros y heterodímeros, como se muestra mediante el análisis por FRET (Figura 3G). Sin embargo, sus valores de FRET_{máx} y FRET₅₀ indicaron que los homodímeros X4wt y
10 X4mut adoptaban conformaciones distintas (Figura 3G y Tabla 1).

El análisis por SPT-TIRF de las células JKCD4⁺ transfectadas indicó que en el estado estacionario el tamaño de partícula de X4mut era similar al de X4wt (Figura 3H). Por el contrario, mientras que CXCL12 promovió el agrupamiento de X4wt (~70 % de nanoagrupamientos), el efecto sobre X4mut fue más pequeño (~30 % de
15 nanoagrupamientos) (Figura 3I). Cuando se analizaron las células JKCD4⁺si-X4mut, la reducción en el tamaño del agrupamiento fue incluso mayor a pesar de la activación de CXCL12; el agrupamiento se abolió en gran medida, y el >94 % de las partículas eran monómeros/dímeros (Figura 3I). La capacidad de X4mut y X4wt para heterodimerizarse podría explicar las diferencias más grandes detectadas en función
20 de las células utilizadas. No se encontraron cambios en los perfiles de trayectoria entre los dos receptores ni variación en el coeficiente de difusión X4mut entre células con o sin expresión de X4wt endógena (Figura 3J). En ausencia de CXCR4 endógeno, también se encontró el ≥90 % de partículas de X4mut móviles (Figura 3K). Estos datos indican fuertemente que K239, V242 y L246 participan en la oligomerización de
25 CXCR4 y, por tanto, influyen en su movilidad lateral.

Para determinar los efectos funcionales del agrupamiento de CXCR4, se evaluó la activación de la proteína G α_i por X4mut. La inmunoprecipitación y el análisis por inmunotransferencia mostraron que X4wt y X4mut asociaron G α_i en respuesta a CXCL12 (Figura 4A). Sin embargo, las mediciones de BRET demostraron que tanto el
30 CXCR4 de tipo silvestre como el mutante se asociaron constitutivamente a G α_i (Figura 4B). Aunque la unión de CXCL12 a X4wt promovió un cambio conformacional en el complejo CXCR4/G α_i compatible con la activación de cascada de señalización, no se observaron cambios marcados cuando CXCL12 se unió a X4mut (Figura 4B).

CXCL12 también promovió el flujo de Ca²⁺ intracelular en células que expresan
35 X4wt o X4mut, aunque las respuestas a través de X4mut fueron significativamente

más bajas (Figura 4C). También se observó que la activación mediada por CXCL12 de MAPK (ERK1, 2) y PI3K (Akt) se vio notablemente comprometida en células que expresaban X4mut (Figura 4D) y que la migración celular hacia CXCL12, de este modo, se alteraba (Figura 4E). Usando el sistema de bicapa lipídica con ICAM-1
5 incluido más CXCL12, se encontró que las células JKCD4⁺si que expresaban X4mut no migraron, se adhirieron deficientemente al sustrato y tenían un área de contacto más pequeña. Por el contrario, las células JKCD4⁺si que expresaban X4mut estaban polarizadas, con una extensión de borde de ataque aplanada y migraron a lo largo de la bicapa lipídica (Figuras 4F-G). Estos datos indicaron que los receptores no
10 agrupados son capaces de promover el flujo de Ca²⁺ intracelular mediado por ligando, aunque el agrupamiento de receptores es necesario para la activación completa de la función de CXCR4.

Para determinar la relevancia *in vivo* del agrupamiento de CXCR4 mediado por CXCL12, se usó un modelo de eliminación de neutrófilos senescentes a la médula
15 ósea. Algunos informes demostraron que este proceso depende del eje CXCR4/CXCL12 (Furze RC y Rankin SM (2008) *Immunology* 125 (3): 281-288). Los neutrófilos de médula ósea murina se tiñeron con verde CellTracker (CMFDA) y se incubaron con el péptido ²³⁹TMVI, ²²¹TMV (control) o PTx como control positivo del bloqueo de la función de CXCR4. Primero se confirmó el antagonismo de ²³⁹TMVI en
20 un ensayo de quimiotaxis *in vitro* de neutrófilos frente a gradientes de CXCL12 (Figura 4H). Los neutrófilos tratados se inyectaron después por vía intravenosa en ratones y se analizó la acumulación de células en la médula ósea después de 60 minutos mediante citometría de flujo. El tratamiento con ²³⁹TMVI inhibió la eliminación de
25 neutrófilos en un ~62 %, mientras que los neutrófilos tratados con el péptido de control ²²¹TMV retornaron a la médula ósea, al igual que los controles (neutrófilos tratados con PBS o DMSO). Como control positivo de la inhibición, el tratamiento con PTx inhibió la eliminación en el ~46 % (Figura 4I).

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2TX_4ILIX_8A$ (SEQ ID NO: 1) o su secuencia invertida, en el que
- 5 X_1 es K o E,
 X_2 es T o P,
 X_4 es V o A,
 X_8 es L o A, y
- en el que dicho péptido es capaz de inhibir la señalización de CXCL12.
- 10
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido tiene una longitud de entre 9 y 50 aminoácidos.
3. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el
- 15 que el péptido tiene una longitud de 9 aminoácidos y en el que la secuencia de aminoácidos es KTTVILILA (SEQ ID NO: 2) o su secuencia invertida.
4. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el
- que el péptido tiene una longitud de 9 aminoácidos y en el que la secuencia de
- 20 aminoácidos es KPTVILILA (SEQ ID NO: 5) o su secuencia invertida.
5. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el
- que el péptido tiene una longitud de 9 aminoácidos y en el que la secuencia de
- aminoácidos es ETTAILIAA (SEQ ID NO: 4) o su secuencia invertida.
- 25
6. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el
- que el péptido comprende al menos un aminoácido D.
7. Una proteína de fusión que comprende un péptido de acuerdo con una
- 30 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y al menos un polipéptido heterólogo.
8. Una nanopartícula que comprende un péptido de acuerdo con una cualquiera
- de las reivindicaciones 1 a 6 o una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación
- 7.

9. Una partícula similar a virus que comprende un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7.
- 5 10. Uso del péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un método de selección de compuestos, moléculas y/o composiciones que inhiben la respuesta celular mediada por quimiocinas.
- 10 11. Uso del péptido de acuerdo con la reivindicación 1 a 5 para el diseño de un peptidomimético que inhibe la respuesta celular mediada por quimiocinas.
- 15 12. Un método *in vitro* para la selección de compuestos, moléculas y/o composiciones que inhiben la respuesta celular mediada por quimiocinas o son útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer, en el que dicho método comprende:
- a) poner en contacto un receptor de quimiocinas con un compuesto, molécula y/o composición que se ha de someter a ensayo,
- 20 b) analizar la unión entre el compuesto, molécula y/o composición que se ha de someter a ensayo y la región que consiste en el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 dentro de la secuencia de aminoácidos del receptor de quimiocinas, y
- c) clasificar el compuesto, molécula y/o composición como útil para inhibir la respuesta celular mediada por quimiocinas o útil para el tratamiento y/o la
- 25 prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer, cuando se ha detectado una unión en la etapa b).
- 30 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la quimiocina es CXCL12.
14. Uso del péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como diana farmacológica para la detección de compuestos, moléculas y/o composiciones útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer.

15. Anticuerpo que reconoce el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como antígeno.
16. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7, o una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 8, o una partícula similar a virus de acuerdo con la reivindicación 9, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
17. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7, o una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 8, o una partícula similar a virus de acuerdo con la reivindicación 9, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en medicina.
18. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7, o una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 8, o una partícula similar a virus de acuerdo con la reivindicación 9, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencias o cáncer.

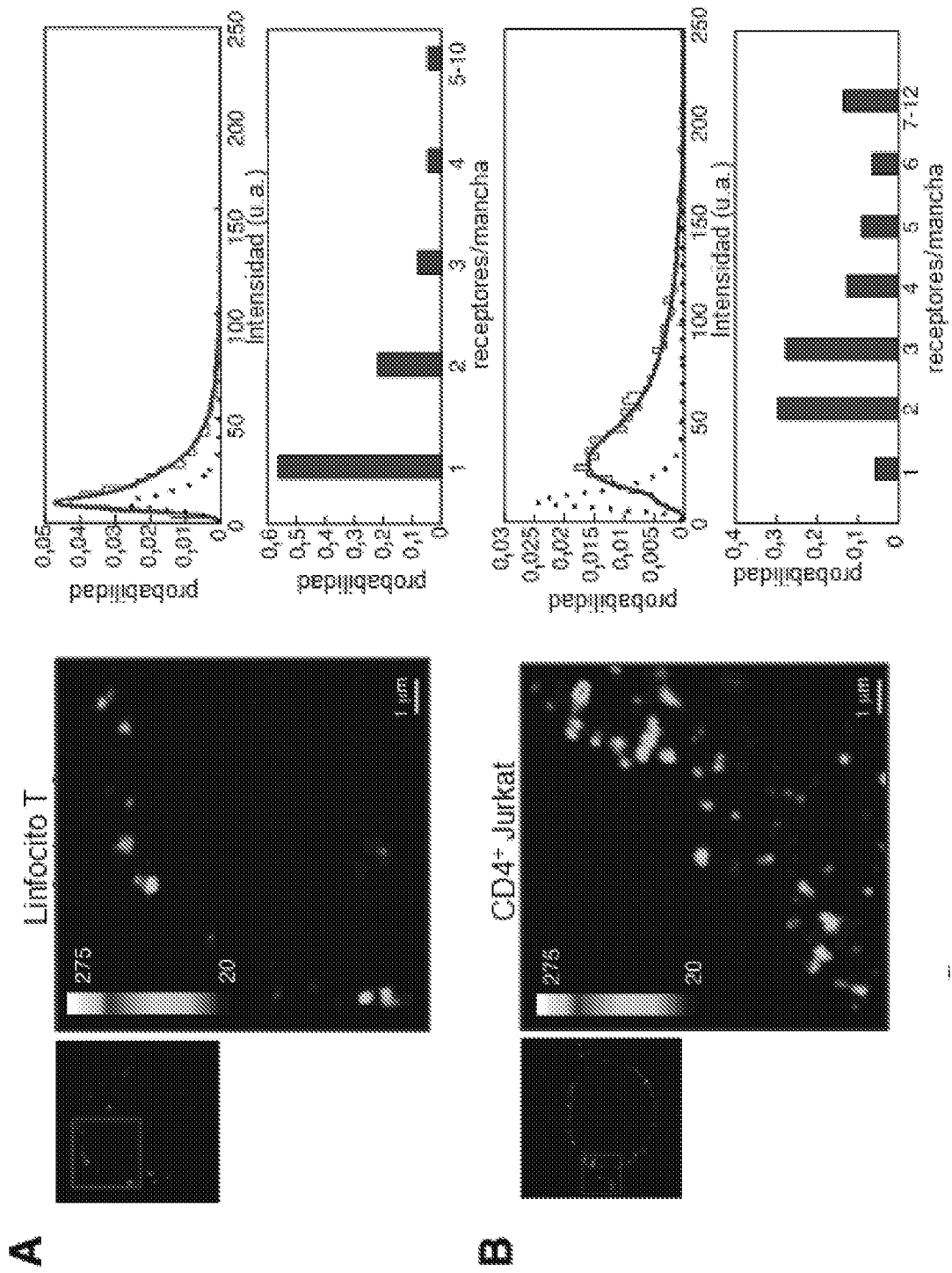


FIG. 1

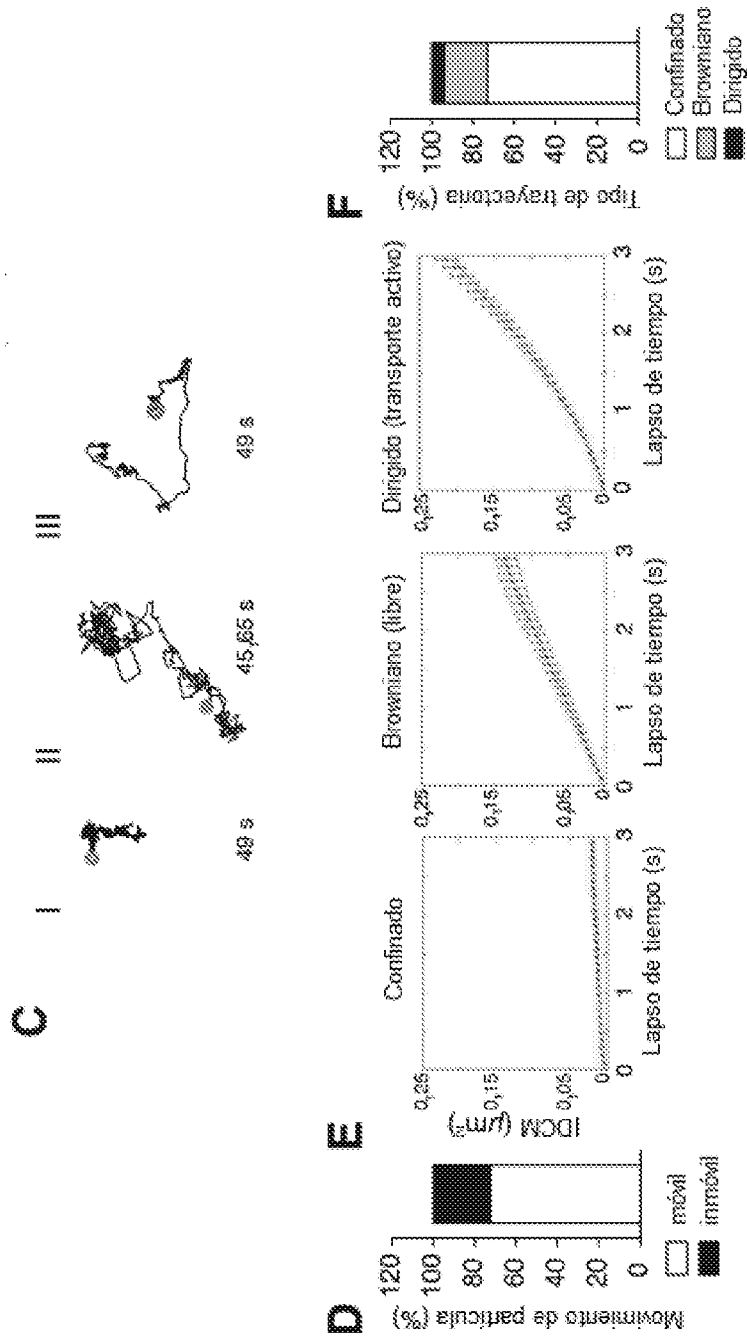


FIG. 1 (continuación)

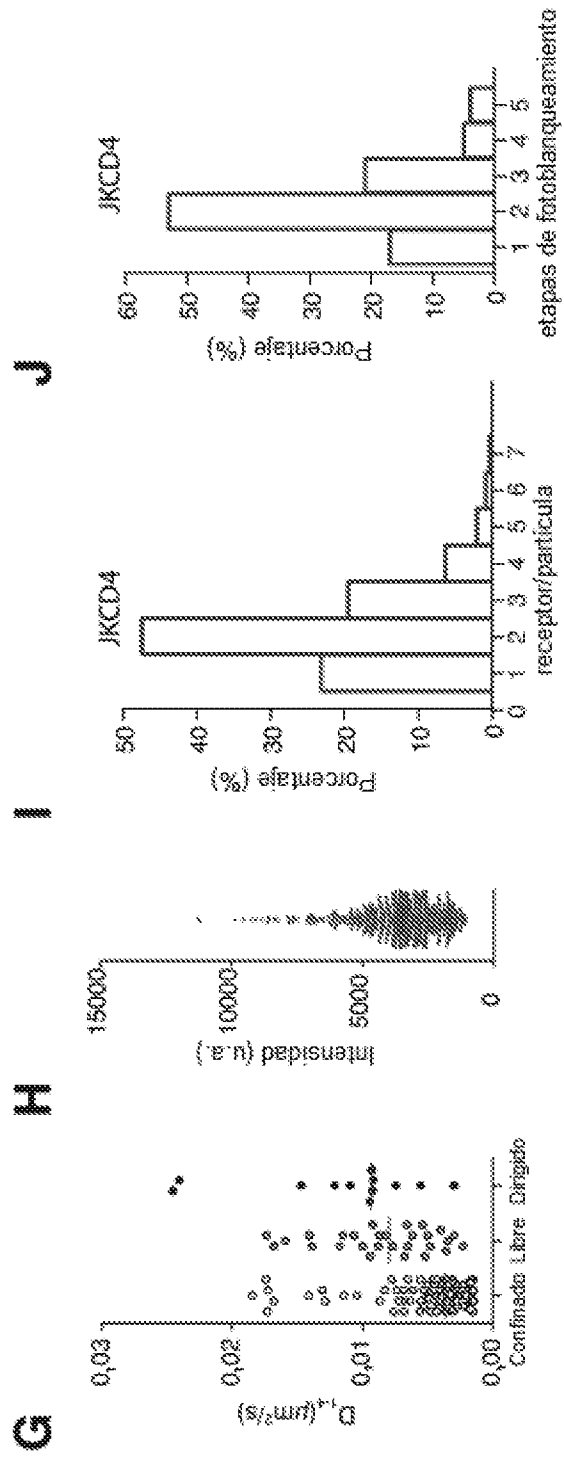


FIG. 1 (continuación)

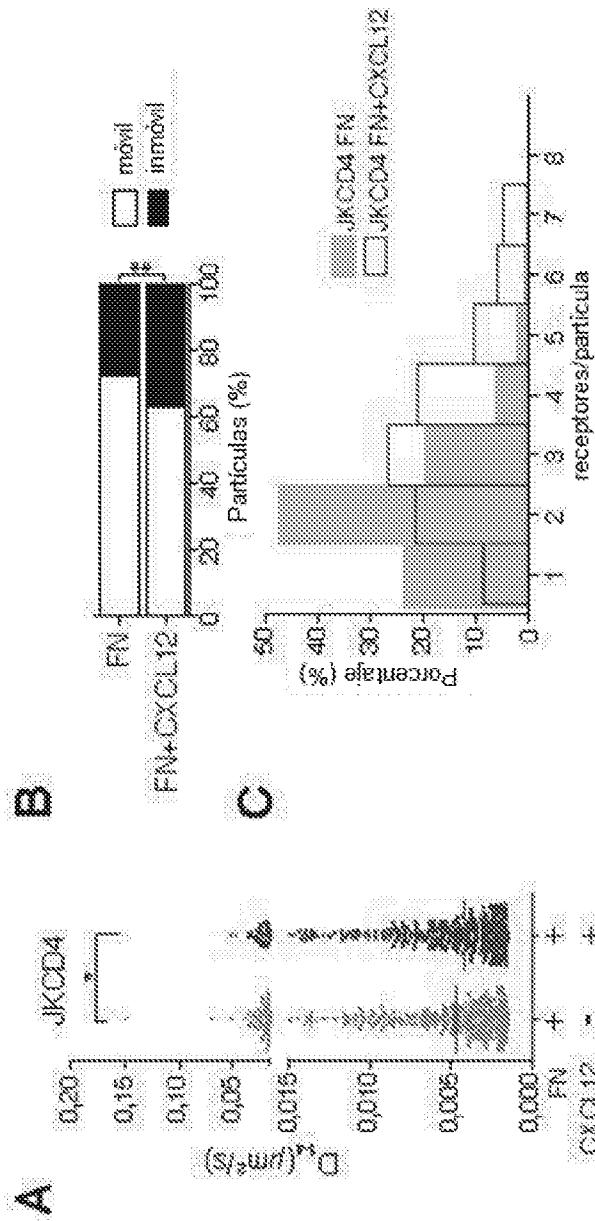


FIG. 2

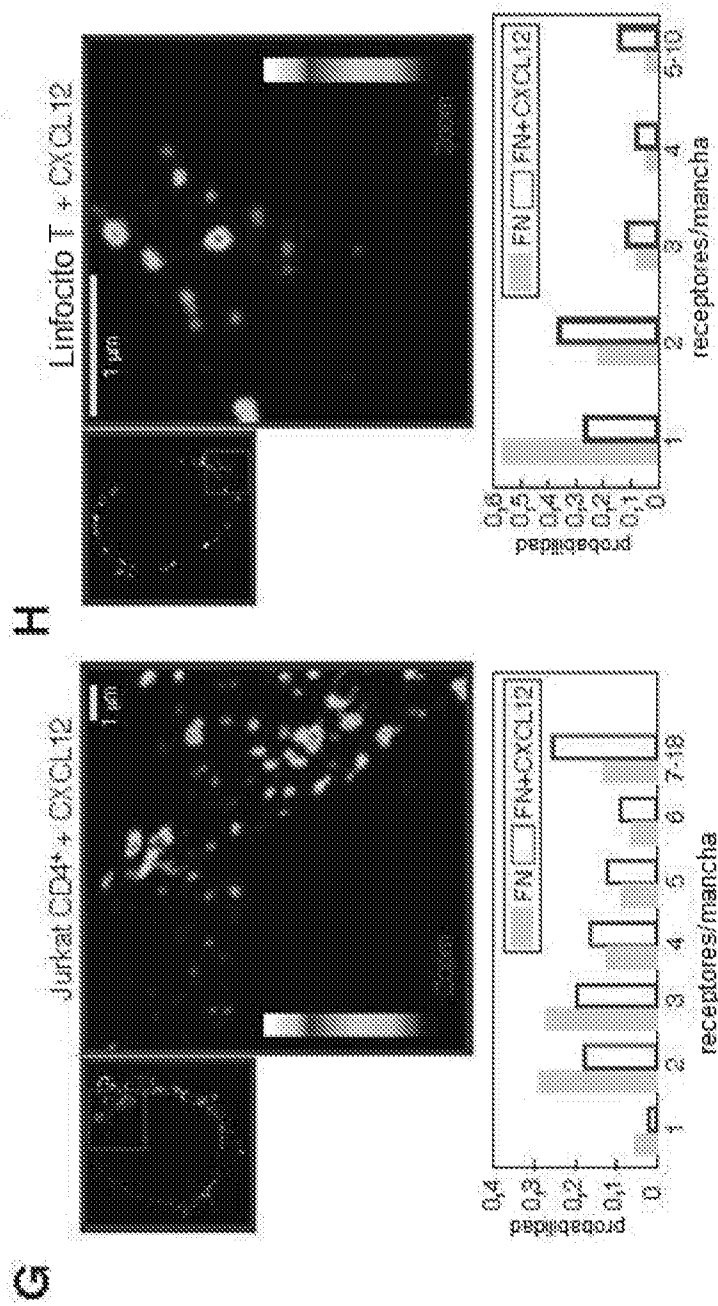


FIG. 2 (continuación)

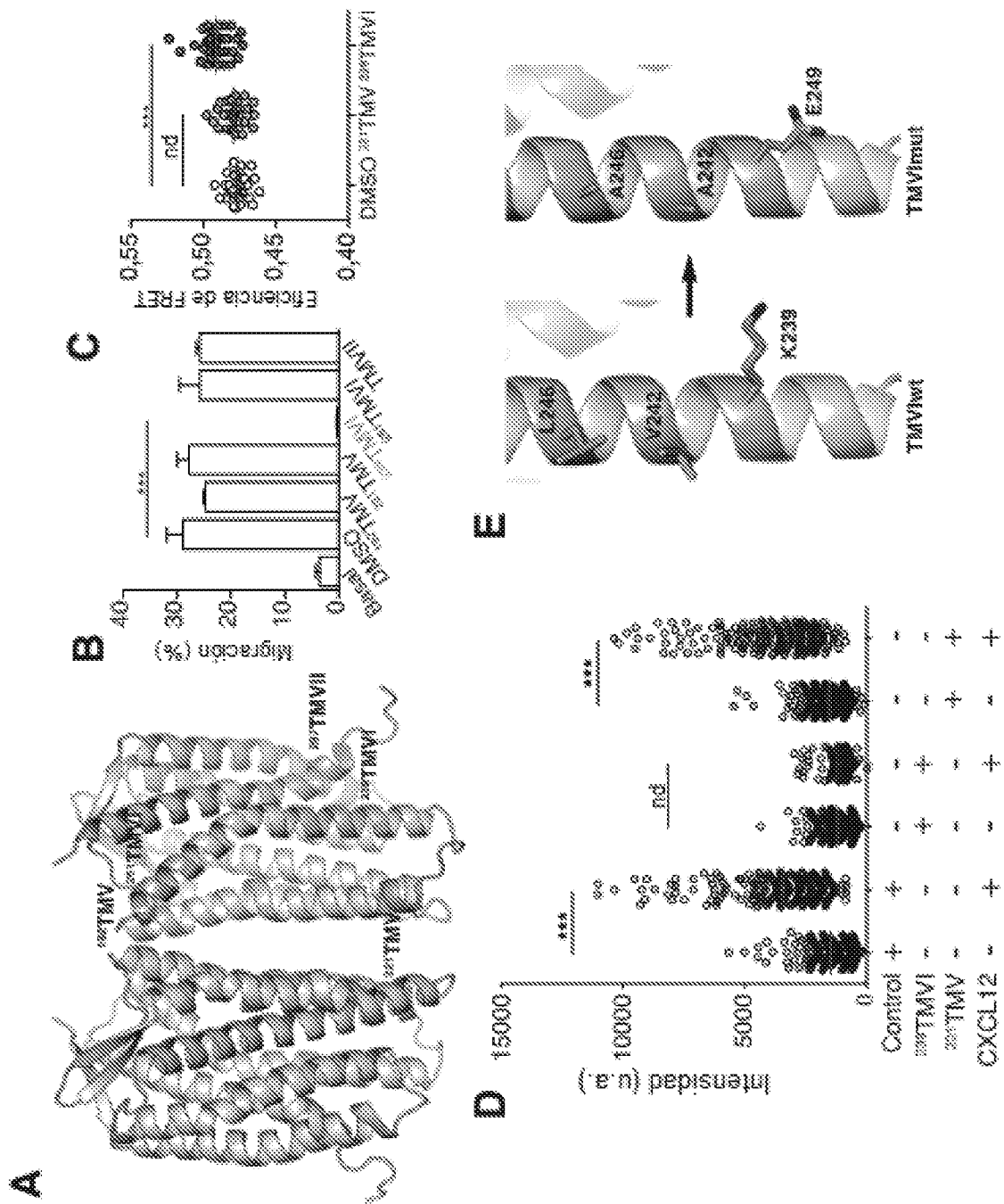


FIG. 3

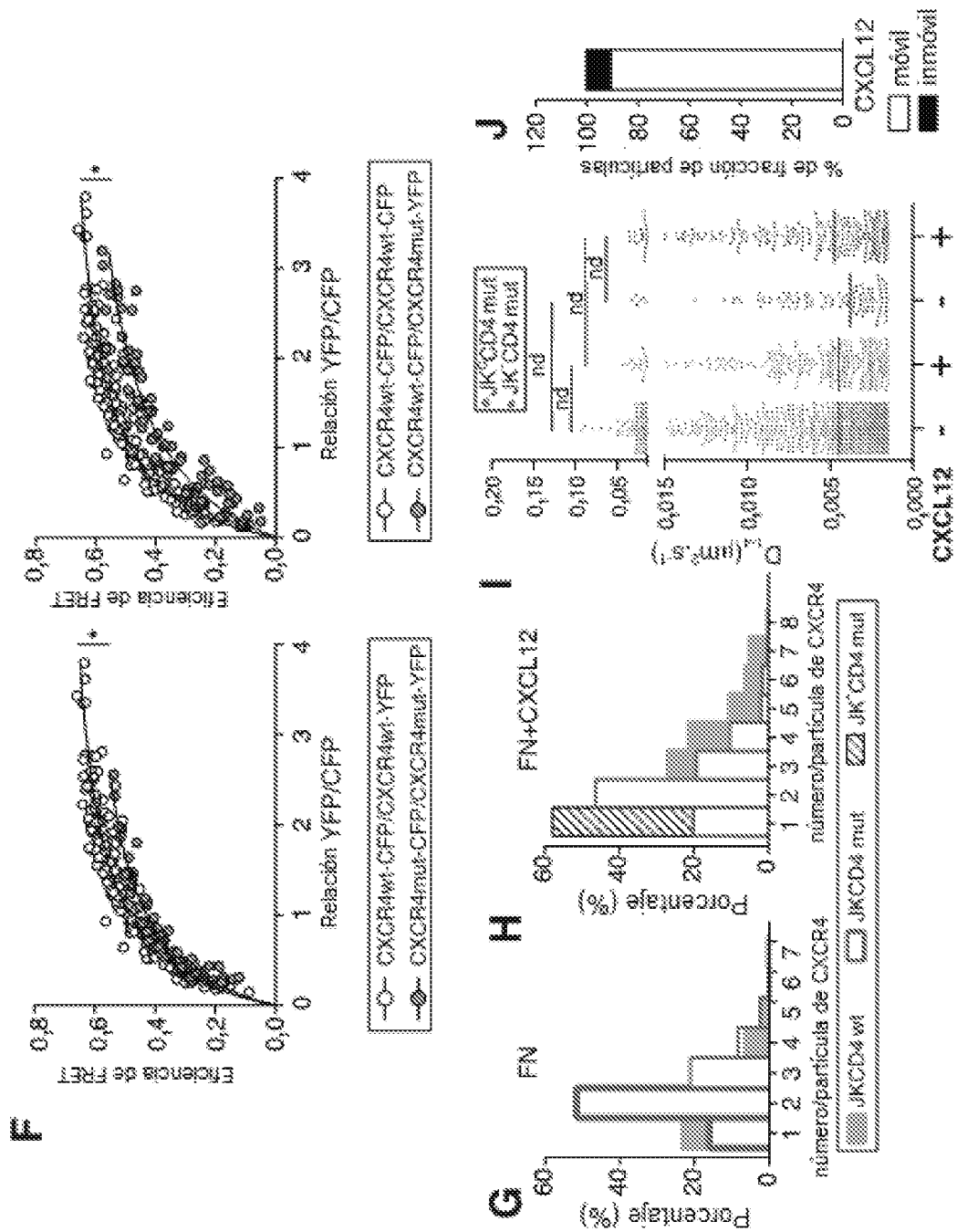
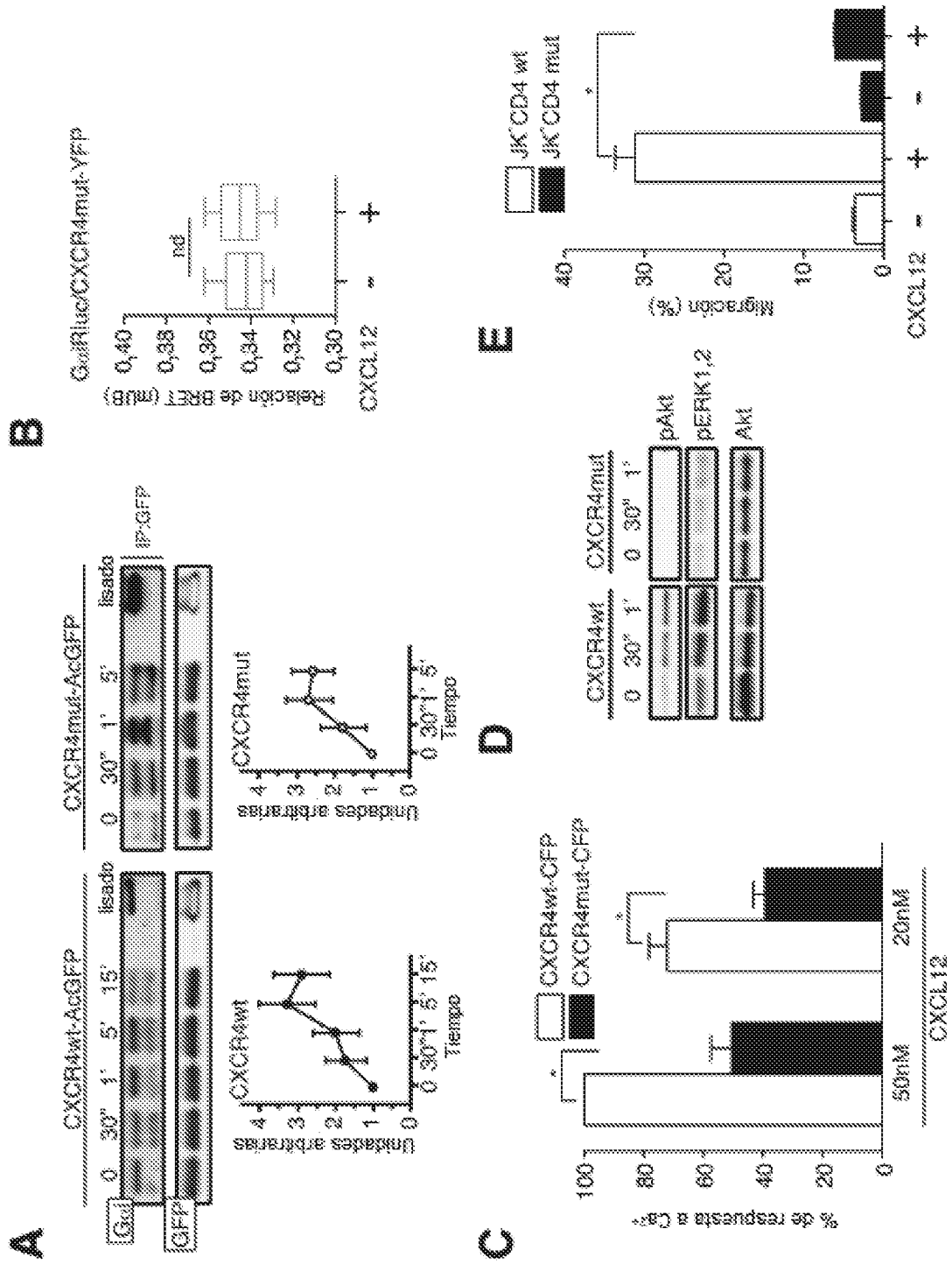


FIG. 3 (continuación)



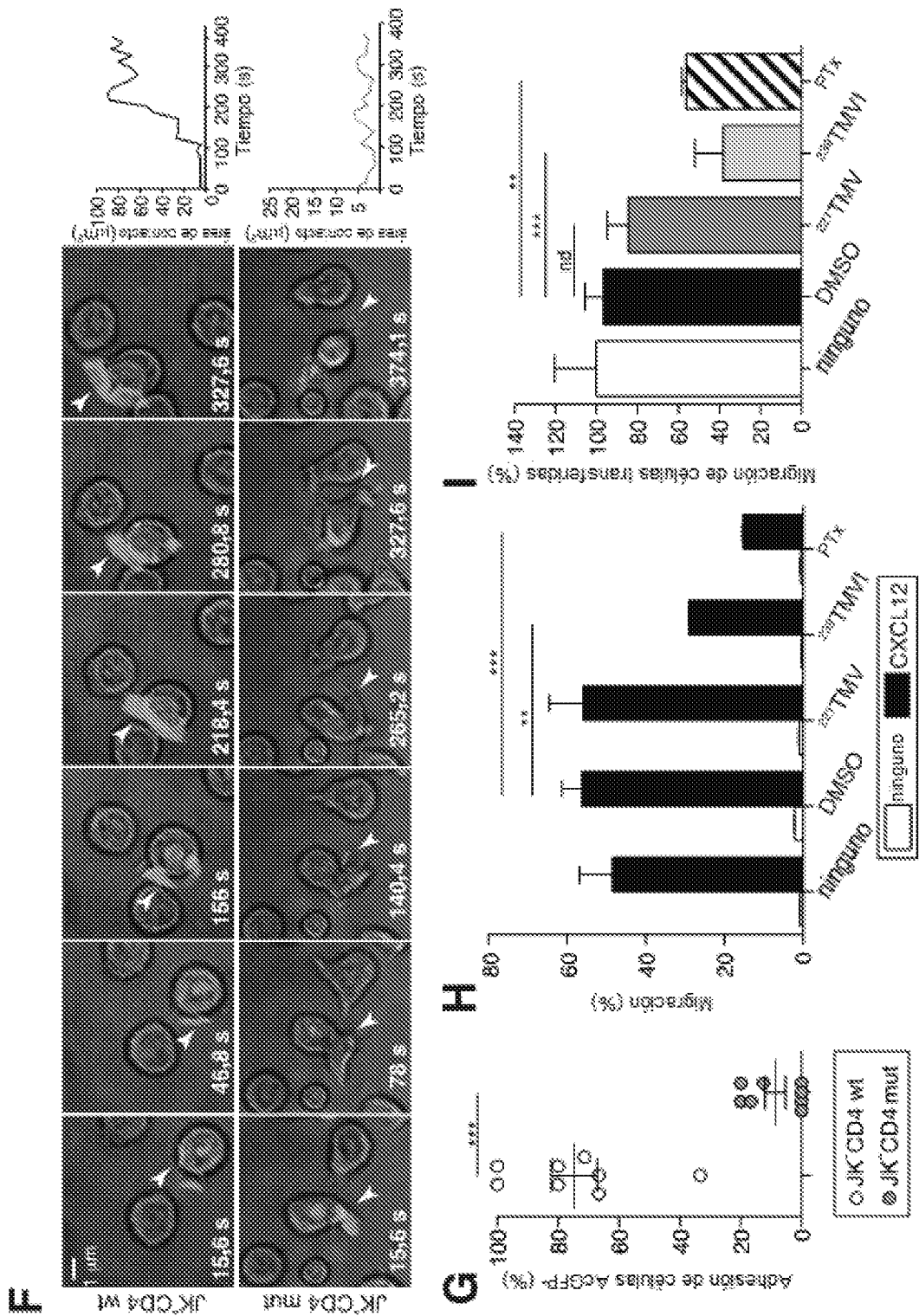


FIG. 4 (continuación)

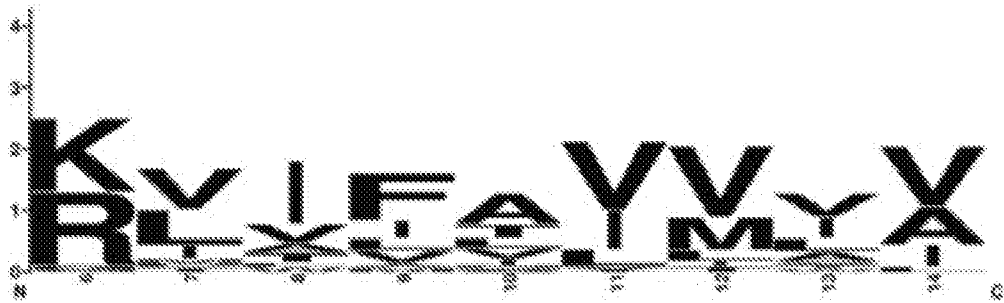


FIG. 5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES2018/070484

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
 INV. G01N33/68 C07K14/715 C12N15/62
 ADD.

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K A61K C12N G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	MARTÍNEZ-MUÑOZ LAURA ET AL: "Separating Actin-Dependent Chemokine Receptor Nanoclustering from Dimerization Indicates a Role for Clustering in CXCR4 Signaling and Function", MOLECULAR CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 70, no. 1, 5 de abril de 2018 (2018-04-05), página 106, XP085371376, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2018.02.034 todo el documento página 113 - página 116; figuras 6-7	1-18
X	----- WO 01/16182 A2 (US HEALTH [US]; SAXINGER CARL [US]) 8 de marzo de 2001 (2001-03-08) todo el documento página 40 ----- -/--	1-3

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
---	---

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 7 de diciembre de 2018	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 17/12/2018
--	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2018/070484

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	WO 2004/097425 A2 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; PHARMACIA SPAIN S A [ES]; MELLADO) 11 de noviembre de 2004 (2004-11-11) todo el documento -----	1-18

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2018/070484

WO 0116182	A2	08-03-2001	AU	6941000 A	26-03-2001
			WO	0116182 A2	08-03-2001

WO 2004097425	A2	11-11-2004	NINGUNO		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2018/070484

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/68 C07K14/715 C12N15/62
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARTÍNEZ-MUÑOZ LAURA ET AL: "Separating Actin-Dependent Chemokine Receptor Nanoclustering from Dimerization Indicates a Role for Clustering in CXCR4 Signaling and Function", MOLECULAR CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 70, no. 1, 5 April 2018 (2018-04-05), page 106, XP085371376, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2018.02.034 the whole document page 113 - page 116; figures 6-7	1-18
X	WO 01/16182 A2 (US HEALTH [US]; SAXINGER CARL [US]) 8 March 2001 (2001-03-08) the whole document page 40	1-3

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 7 December 2018	Date of mailing of the international search report 17/12/2018
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Cervigni, S
--	---------------------------------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2018/070484

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/097425 A2 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; PHARMACIA SPAIN S A [ES]; MELLADO) 11 November 2004 (2004-11-11) the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2018/070484

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0116182	A2 08-03-2001	AU 6941000 A WO 0116182 A2	26-03-2001 08-03-2001

WO 2004097425	A2 11-11-2004	NONE	
