



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 255 716**

⑤① Int. Cl.⁷: **C12N 15/12**
C07K 14/705
C07K 16/28
C12N 5/20

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **96945669 .8**

⑧⑥ Fecha de presentación : **20.12.1996**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0811063**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.1997**

⑤④ Título: **Receptor de quimioquinas 88C y sus anticuerpos.**

③⑩ Prioridad: **20.12.1995 US 575967**
07.06.1996 US 661393

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2006

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2006

⑦③ Titular/es: **ICOS Corporation**
22021 20th Avenue S.E.
Bothell, Washington 98201, US

⑦② Inventor/es: **Gray, Patrick, W.;**
Schweickart, Vicki, L. y
Raport, Carol, J.

⑦④ Agente: **Cañadell Isern, Roberto**

ES 2 255 716 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 255 716 T3

DESCRIPCIÓN

Receptor de quimioquinas 88C y sus anticuerpos.

5 La presente solicitud es continuación, en parte, de la solicitud de patente US 08/661,393 de 7 de Junio de 1996, que era a su vez continuación, en parte, de la solicitud de patente US 08/575,967 de 20 de diciembre de 1995.

10 La presente invención se refiere en general a las vías de transducción de señales. Más particularmente, la presente invención se refiere a receptores de quimioquinas, ácidos nucleicos que codifican receptores de quimioquinas, ligandos de receptores de quimioquinas, moduladores de la actividad de receptores de quimioquinas, anticuerpos que reconocen quimioquinas y receptores de quimioquinas, métodos para la identificación de ligandos y moduladores de receptores de quimioquinas, métodos para la producción de receptores de quimioquinas y métodos para la producción de anticuerpos que reconocen receptores de quimioquinas.

15 Los recientes avances en la biología molecular han conducido a una apreciación del papel central que desempeñan en los procesos biológicos las vías de transducción de señales. Estas vías comprenden un dispositivo central, mediante el cual se comunican las células individuales en un organismo multicelular, coordinando los procesos biológicos. Véase Springer, *Cell* 76:301-314 (1994), Cuadro I, como modelo. Un ramal de las vías de transducción de señales, definido por la participación celular de nucleótido de guanina que fija proteínas (proteínas G), afecta a una amplia gama de procesos biológicos.

20 Lewin, *GENES* V 319-348 (1994) trata en general de las vías de transducción de señales de proteína G que hacen intervenir, como mínimo, los siguientes componentes: una señal extracelular (p. ej. neuro-transmisores, hormonas peptídicas, moléculas orgánicas, ligeras u olorosas), un receptor que reconoce señales (receptor acoplado con proteína G, mencionado en Probst *et al.*, *DNA and Cell Biology* 11:I-20 [1992] y también conocido como GPR o GPCR) y una proteína hetero-trimérica intracelular fijadora de GTP o proteína G. En particular, estas vías han llamado la atención debido a su papel en la regulación del "trafficking" de glóbulos blancos o leucocitos.

30 Los leucocitos comprenden un grupo de tipos de células sanguíneas móviles, que incluyen los granulocitos (es decir neutrófilos, basófilos y eosinófilos), linfocitos y monocitos. Una vez movilizadas y activadas, estas células intervienen principalmente en la defensa del cuerpo contra materias extrañas. Esta tarea es complicada debido a la diversidad de procesos normales y patológicos en los que participan los leucocitos. Por ejemplo, intervienen leucocitos en la respuesta inflamatoria normal a la infección. Los leucocitos también están involucrados en toda una serie de inflamaciones patológicas. Para tener una visión general, véase Schall *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 6:865-873 (1994). Además, cada uno de estos procesos puede suponer contribuciones únicas, en grado, clase y duración, por parte de cada uno de los tipos celulares de leucocitos.

35 Al estudiar estas reacciones inmunológicas, los investigadores se centraron inicialmente en las señales que actúan sobre los leucocitos, arguyendo que se precisa una señal para provocar cualquier forma de respuesta. Murphy, *Ann. Rev. Immunol.* 12:593-633 (1994) ha estudiado los elementos de un grupo importante de señales de leucocitos, las señales de péptidos. Un tipo de señal peptídica comprende las quimioquinas (citoquinas quimio-atractoras), designadas intercrinas en Oppenheim *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 9:617-648 (1991). Además de Oppenheim *et al.*, Baggiolini *et al.*, *Advances in Immunol.* 55:97-179 (1994), documentan el creciente número de quimioquinas que se han identificado y sometido a análisis genéticos y bioquímicos.

45 Las comparaciones de las secuencias de aminoácidos de las quimioquinas conocidas han conducido a un esquema clasificatorio que divide las quimioquinas en dos grupos: el grupo α , caracterizado por un solo aminoácido que separa las primeras dos cisteínas (CXC; término N como referente) y el grupo β , donde estas cisteínas son adyacentes (CC). Véase Baggiolini *et al.*, véase más arriba. Se han encontrado correlaciones entre las quimioquinas y los tipos particulares de células leucocíticas que responden a estas señales. Schall *et al.*, véase más arriba, informan que las quimioquinas CXC afectan generalmente los neutrófilos; las quimioquinas CC tienden a afectar los monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos. Por ejemplo, Baggiolini *et al.*, véase más arriba, indican que RANTES, una quimioquina CC, funciona como quimioattractor para monocitos, linfocitos (por ejemplo células T de la memoria) basófilos y eosinófilos, pero no para los neutrófilos, mientras que induce la liberación de histamina de los basófilos.

55 Cocchi *et al.*, *Science*, 270: 1811-1815 (1995) han mostrado recientemente que las quimioquinas son supresoras de la proliferación de HIV. Cocchi *et al.*, demostraron que RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β eran supresores de HIV-1, HIV-2 y de infección por SIV de una línea celular CD4⁺ designada PM1 y de células mononucleares de la sangre periférica humana principal.

60 Recientemente sin embargo, la atención se ha centrado en los receptores celulares que fijan las quimioquinas, porque las quimioquinas extracelulares parecen contactar células de forma indiscriminada y por consiguiente carecen de la especificidad necesaria para regular los tipos celulares de leucocito individual.

65 Murphy, véase más arriba, informa que la superfamilia GPCR de receptores incluye la familia de receptores de quimioquinas. La estructura típica del receptor de quimioquinas incluye un dominio de fijación de quimioquina extracelular situado cerca del término N, seguido de siete regiones espaciadas de aminoácidos predominantemente hidrófobos, capaces de formar hélices α que abarcan la membrana. Entre cada uno de los dominios helicoidales α se encuentran

localizados dominios hidrófilos, alternativamente, en los espacios intra o extracelulares. Estas características imprimen una conformación de serpentín al receptor de quimioquinas, incrustado en la membrana. El tercer bucle intercelular suele interactuar con proteínas G. Además, Murphy, véase más arriba, señaló que el término carboxilo intracelular es también capaz de interactuar con proteínas G.

5 Los primeros receptores de quimioquinas analizados mediante técnicas de clonación molecular fueron los dos receptores neutrófilos para IL8 humano, una quimioquina CXC. Holmes *et al.*, Science 253:178-1280 (1991) y Murphy *et al.*, Science 253:1280-1283 (1991) comunicaron la clonación de estos dos receptores para IL8. Lee *et al.*, J. Biol. Chem. 267:16283-16287 (1992) analizó los cADN que codifican estos receptores y encontró un 77% de identidad
10 de aminoácidos entre los receptores codificados, mostrando cada receptor características de la familia de receptores acoplada con la proteína G. Uno de estos receptores es específico de IL-8, mientras que los otros fijan y señalizan en respuesta a IL-8, gro/MGSA, y NAP-2. La manipulación genética de los genes que codifican receptores IL-8 ha contribuido a nuestra comprensión de los papeles biológicos que desempeñan estos receptores. Por ejemplo, Cacalano *et al.*, Science 265:682-684 (1994) informan que la delección del receptor IL-8 homólogo en el ratón dio como resultado un fenotipo pleiotrópico que apuntaba a linfadenopatía y esplenomegalia. Además, un estudio de mutaciones “missense”
15 descrito en Leong *et al.*, J. Biol. Chem. 269:19343-19348 (1994) reveló la presencia de aminoácidos en el receptor IL-8, determinantes para la fijación de IL-8. Los experimentos de permutación de dominio tratados en Murphy, véase más arriba, implicaron el dominio extracelular amino terminal como determinante de la especificidad de fijación.

20 Se han identificado y clonado también varios receptores para quimioquinas CC. CCCKR1 fija tanto MIP-1 α como RANTES y causa un flujo de iones de calcio intracelular en respuesta a ambos ligandos. Charo *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. (USA) 91:2752-2756 (1994) comunicó que otro receptor de quimioquinas CC, MCP-R1 (CCCKR2), es codificado por un solo gen que produce dos variantes de empalme (splice) que difieren en sus dominios terminales carboxílicos. Este receptor fija y responde a MCP-3 además de a MCP-1.

25 También se ha identificado un receptor promiscuo que fija tanto quimioquinas CXC como CC. Este receptor fue identificado inicialmente en glóbulos rojos y Horuk *et al.*, Science 261:1182-1184 (1993) comunica que fija IL-8, NAP-2, GRO- α , RANTES Y MCP-1. El receptor de quimioquinas de eritrocito comparte aprox. el 25% de identidad con otros receptores de quimioquinas y puede ayudar a regular los niveles en circulación de quimioquinas o ayudar a la presentación de quimioquinas a sus blancos (targets). Además de fijar quimioquinas, el receptor de quimioquinas
30 eritrocítico ha resultado ser también el receptor para *plasmodium vivax*, una de las causas principales de la malaria (id). Otro receptor acoplado con la proteína G, estrechamente relacionado con receptores de quimioquinas, el receptor de factor de activación de plaquetas ha resultado ser también el receptor para un patógeno humano, la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (Cundell *et al.*, Nature 377-438 (1995)).

35 Además de los receptores de quimioquina de mamífero, se han identificado dos homólogos de receptores de quimioquinas. Ahuja *et al.*, J. Biol. Chem. 268:20691-20694 (1993) describen un producto génico del *Herpesvirus saimiri* que comparte en torno a 30% de identidad con los receptores IL-8 y fija quimioquinas CXC. Neote *et al.*, Cell, 72:415-425 (1993) informa que el cito megalovirus humano contiene un gen que codifica un receptor que comparte en torno a
40 30% de identidad con los receptores de quimioquina CC que fija MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 y RANTES. Estos receptores virales pueden afectar el papel normal de las citoquinas y proporcionar una ventaja patológica selectiva para el virus.

45 Debido a la amplia diversidad de quimioquinas y a sus actividades, existen numerosos receptores para las quimioquinas. Los receptores que han sido caracterizados representan solamente una fracción del complemento total de receptores de quimioquinas. Sigue existiendo por lo tanto la necesidad en el estado de la técnica de identificar receptores adicionales de quimioquinas. La disponibilidad de estos receptores nuevos proporcionará herramientas para el desarrollo de moduladores terapéuticos de quimioquina o de función de receptor de quimioquina. Se considera en la presente invención que dichos moduladores resultan útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de la
50 arteriosclerosis, artritis reumatoide, supresión del crecimiento tumoral, asma, infecciones virales, y otros estados inflamatorios. Alternativamente, se consideran terapéuticos fragmentos o variantes de los receptores de quimioquina o anticuerpos que reconocen dichos receptores.

55 La presente invención se refiere a ácidos nucleicos aislados y purificados que codifican receptores de quimioquina involucrados en el “trafficking” de leucocitos.

Según la presente invención, se ofrece un polinucleótido aislado y purificado que codifica la secuencia de aminoácidos del receptor de quimioquinas 88C presentado en SEQ ID NO:2 y un polinucleótido aislado y purificado que codifica la secuencia de aminoácidos de receptores de quimioquina de macaco 88C presentada en SEQ ID NO:20.

60 La presente también presenta un polinucleótido que codifica un polipéptido 88C donde dicho polinucleótido se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas obteniéndose el polinucleótido de SEQ ID NO:1 y un polinucleótido que codifica un polipéptido de macaco 88C, donde dicho polinucleótido se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas en el polinucleótido de SEQ ID NO:19.

65 La invención ofrece además un polipéptido aislado y purificado que comprende la secuencia de aminoácidos del receptor de quimioquinas 88C expuesta en SEQ ID NO:2 y un polipéptido aislado y purificado que comprende la secuencia de aminoácidos del receptor de quimioquinas 88C de macaco presentada en SEQ ID NO:20.

ES 2 255 716 T3

Según otro aspecto de la invención, se presenta un producto anticuerpo que fija específicamente un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 88C expuesta en SEQ ID NO:2 así como un producto anticuerpo que fija específicamente un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 88C de macaco expuesta en SEQ ID NO:20.

5

Según dicho aspecto de la invención, se ofrece además un hibridoma que produce un producto anticuerpo de la invención y líneas celulares del hibridoma 227M, 227P y 227R.

10

Según este aspecto de la presente invención, se presenta adicionalmente un producto anticuerpo de la invención, que se utiliza en terapia y un producto anticuerpo de la invención para el tratamiento de infección por HIV y estados patológicos relacionados con HIV y la utilización de un producto anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infección por HIV y estados patológicos relacionados con HIV.

15

Según otro aspecto de la invención, se presenta un método de cribaje para un modulador de infección por HIV, que comprende las siguientes etapas: (a) poner en contacto una primera composición que comprende un receptor 88C de mamífero de la SEQ ID NO:2 o 20, o codificado por un nucleótido de la invención, con una segunda composición, que comprende una proteína envoltura de virus de inmunodeficiencia humana (HIV), en presencia y ausencia de un compuesto; (b) la medición de la interacción del receptor 88C de mamífero con la proteína de envoltura de HIV en presencia y ausencia del compuesto; y el cribaje para la detección de un modulador de infección por HIV, donde una interacción reducida o aumentada del receptor 88C de mamífero con el HIV, en presencia del compuesto con respecto a la ausencia del compuesto, es indicativa de que el compuesto es un modulador de infección por HIV.

20

25

Los polinucleótidos de la invención (las cadenas sentido y antisentido de los mismos) comprenden ADN genómico, cADN y ARN así como ácidos nucleicos parcialmente sintéticos. Los polinucleótidos preferidos son el ADN que codifica el receptor de quimioquina 88-2B que se puede ver en SEQ ID NO:3, el ADN que codifica el receptor de quimioquina 88C que se expone en SEQ ID NO:1 y los ADN que se hibridan en aquellos ADN en condiciones de hibridación rigurosas standard o que se hibridarían pero para la redundancia del código genético. Como ejemplo de condiciones rigurosas, se pueden citar las siguientes: hibridación a 42°C en formamida al 50%, 5X SSC, 20 mM de fosfato sódico, pH 6,8 y lavado en 0,2X SSC a 55°C. Los expertos en la materia entenderán que se produce una variación en estas condiciones según la longitud y el contenido del nucleótido GC de las secuencias que van a hibridar. Las fórmulas standard en el estado de la técnica resultan adecuadas para determinar condiciones de hibridación exactas. Véase Sambrook *et al.*, §§(9,47-9.51 in Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación molecular: Manual de Laboratorio) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). También se contemplan polinucleótidos que codifican dominios de 88-2B o 88C, p. ej. polinucleótidos que codifican uno o más dominios extracelulares de proteína o de otros fragmentos biológicamente activos de la misma. Los dominios extracelulares 88-2B corresponden a SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4 en los residuos de aminoácido 1-36, 93-107, 171-196 y 263-284. Los dominios extracelulares de 88-2B son codificados por secuencias de polinucleótidos que corresponden a SEQ ID NO:3 en los nucleótidos 362-469, 638-682, 872-949, y 1148-1213. Los dominios extracelulares de 88C corresponden a SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 en los residuos de aminoácidos 1-32, 89-112, 166-191 y 259-280. Los dominios extracelulares 88C son codificados por secuencias de polinucleótidos que corresponden a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 55-150, 319-390, 550-627 y 829-894. También se incluyen los polinucleótidos que codifican dominios intracelulares de estos receptores de quimioquinas. Los dominios intracelulares de 88-2B incluyen aminoácidos 60-71, 131-151, 219-240 y 306-355 de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4. Estos dominios son codificados por secuencias de polinucleótidos que corresponden a SEQ ID NO: 3 en los nucleótidos 539-574, 752-814, 1016-1081 y 1277-1426 respectivamente. Los dominios intracelulares 88C incluyen residuos de aminoácidos 56-67, 125-145, 213-235 y 301-352 de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. Los dominios intracelulares de 88C son codificados por secuencias de polinucleótidos que corresponden a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 220-255, 427-489, 691-759 y 955-1110. Los péptidos correspondientes a uno o más de los dominios extracelulares o intracelulares o anticuerpos producidos contra estos péptidos se consideran moduladores de actividades de receptor, especialmente actividades de ligando y de fijación de proteína G de los receptores.

30

35

40

45

50

Las secuencias de nucleótidos de la invención y la presente descripción también se pueden utilizar para diseñar unos oligonucleótidos que se utilizan como sondas marcadas para aislar ADN genómicos que codifican 88-2B u 88C en condiciones de hibridación rigurosas (es decir utilizando análisis Southern y metodologías de Reacción de Cadena de Polimerasa). Además, estas sondas de oligonucleótidos se pueden utilizar para detectar alelos particulares de los genes que codifican 88-2B u 88C, facilitando tanto el diagnóstico como el tratamiento de gen-terapia de estados patológicos asociados con alelos particulares. Además, estos oligonucleótidos se pueden utilizar para alterar la genética del receptor de quimioquina para facilitar la identificación de moduladores de receptores de quimioquina. Las secuencias de nucleótidos también se pueden utilizar para diseñar elementos genéticos anti-sentido que se utilizan en la exploración o en la modificación de la genética y la expresión de 88-2B u 88C. La invención también comprende réplicas biológicas (es decir copias de ADN aislados realizados *in vivo* o *in vitro*) y transcriptos ARN de ADN de la invención. Se describen construcciones de recombinante de replicación autónoma como vectores de ácido nucleico plásmido, viral y cromosomal (p. ej. YAC) que incorporan efectivamente polinucleótidos 88-2B y 88C, y, particularmente, vectores donde el ADN que codifica efectivamente 88-2B u 88C está vinculado operativamente con una o más secuencias de control de expresión endógena o heteróloga.

Los receptores 88-2B y 88C pueden producirse de forma natural, recombinante o sintética. Las células huéspedes (procarióticas o eucarióticas) transformadas o transfectadas con polinucleótidos de la invención y de la presente

ES 2 255 716 T3

descripción por métodos standard se pueden utilizar para expresar los receptores de quimioquina 88-2B y 88C. Más allá de los productos génicos intactos 88-2B o 88C se consideran fragmentos biológicamente activos de 88-2B y 88C, análogos de 88-2B o 88C y péptidos sintéticos derivados de las secuencias de aminoácidos de 88-2B que aparecen en SEQ ID NO:4 o 88C, que aparecen en SEQ ID NO:2. Además, el producto génico 88-2B o 88C o un fragmento biológicamente activo de cualquiera de los productos génicos, cuando se producen en una célula eucariótica, puede modificarse post-translacionalmente (p. ej. mediante formación de enlace de disulfuro, glicosilación, fosforilación, miristoilación, palmitoilación, acetilación, etc). Los productos génicos 88-2B y 88C o los fragmentos biológicamente activos de los mismos, también se consideran, en conformaciones monómeras, homomultímera o heteromultímera).

En particular, un aspecto involucra productos anticuerpos capaces de interactuar específicamente con los receptores de quimioquina 88-2B o 88C. Los productos anticuerpos son generados por métodos standard en el estado de la técnica utilizando receptores recombinantes 88-2B o 88C, péptidos sintéticos o fragmentos peptídicos de receptores 88-2B o 88C, células huéspedes que expresan 88-2B o 88C en sus superficies o receptores 88-2B o 88C purificados a partir de fuentes naturales como inmunógenos. Los productos anticuerpos pueden incluir anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales de cualquier fuente o sub-tipo. Además, la invención contempla anticuerpos monómeros, homomultímeros y heteromultímeros y fragmentos de los mismos. Además, la invención comprende anticuerpos CDR-injertados, anticuerpos "humanizados" y otros productos anticuerpos modificados que retienen la capacidad de fijar específicamente un receptor de quimioquinas.

También se contempla la utilización de productos anticuerpos para la detección de los productos génicos 88-2B o 88C, sus análogos o fragmentos biológicamente activos de los mismos. Por ejemplo, se pueden utilizar productos anticuerpos en procedimientos de diagnóstico diseñados para revelar las correlaciones entre la expresión de 88-2B o 88C y varios estados normales o patológicos. Además, se pueden utilizar productos anticuerpos para diagnosticar variaciones específicas del tejido en la expresión de 88-2B o 88C, sus análogos o fragmentos biológicamente activos de los mismos. Los productos anticuerpos específicos de los receptores de quimioquina 88-2B y 88C también pueden actuar como moduladores de actividades de receptor. En otro aspecto, los anticuerpos de receptores 88-2B o 88C resultan útiles para fines terapéuticos.

También se describen ensayos de ligandos capaces de interactuar con los receptores de quimioquinas de la invención. Estos ensayos pueden suponer la detección directa de la actividad de receptor de quimioquinas, p. ej. controlando y siguiendo la fijación de un ligando rotulado al receptor. Además, estos ensayos se pueden utilizar para evaluar indirectamente la interacción del ligando con el receptor de quimioquina. Tal como se utiliza aquí, el término "ligando" comprende moléculas que son agonistas y antagonistas de 88-2B o 88C y otras moléculas que interactúan con los receptores.

La detección directa de la fijación de ligando a un receptor de quimioquina se puede conseguir utilizando el siguiente ensayo. Los compuestos de la prueba (p. ej. ligandos putativos) están rotulados de forma que se puedan detectar (p. ej. radio yodados). Los compuestos de la prueba rotulados de forma que se puedan detectar se ponen luego en contacto con preparaciones de membrana que contienen un receptor de quimioquina de la invención. De preferencia, las membranas se preparan a partir de células huéspedes que expresan receptores de quimioquina de la invención a partir de vectores recombinantes. Tras un período de incubación para facilitar el contacto entre los receptores de quimioquina incrustados en la membrana y los compuestos de la prueba rotulados de forma detectable, el material de la membrana se recoge en filtros utilizando filtración por vacío. El rótulo detectable asociado con los filtros se cuantifica entonces. Por ejemplo, las radiomarcas se cuantifican utilizando espectrofotometría por centelleo de líquido. Utilizando esta técnica, se identifican ligandos que interactúan con receptores de quimioquinas. Para confirmar la identificación de un ligando, se expone un compuesto de ensayo rotulado de forma que se pueda detectar a una preparación de membrana que presenta un receptor de quimioquina en presencia de cantidades cada vez mayores del compuesto de prueba en estado no marcado. Una reducción progresiva en el nivel de marcador asociado con filtro al ir añadiendo cantidades cada vez mayores de compuesto de prueba no marcado confirma la identificación de dicho ligando. Los agonistas son ligandos que interactúan con el receptor y provocan la transducción de señal intracelular y los antagonistas son ligandos que interactúan con el receptor pero no provocan transducción de señal intracelular. La determinación de si un ligando particular es un agonista o un antagonista se puede realizar p. ej. probando vías de transducción de señal acopladas con proteína G. La activación de estas vías se puede determinar midiendo el flujo intracelular Ca^{++} , actividad de la fosfolipasa C o actividad de la adenilil ciclasa, además de otros ensayos (véase ejemplos 5 y 6).

Tal como se indica de forma detallada en los presentes ejemplos, las quimioquinas que interactúan con el receptor 88C pueden ser: RANTES, MIP-1 α , y MIP-1 β , y RANTES es una quimioquina que interactúa con el receptor 88-2B.

En otro aspecto, se contemplan específicamente moduladores de la interacción entre los receptores 88C y 88-2B y sus ligandos. La función de los moduladores de receptores de quimioquina se puede identificar utilizando ensayos similares a los utilizados para identificar ligandos. La preparación de membrana que presenta un receptor de quimioquina se expone a una cantidad constante y conocida de ligando funcional marcado de forma detectable. Además, el receptor de quimioquina ligado a la membrana se expone también a una cantidad creciente de compuesto de prueba que se sospecha modula la actividad de dicho receptor de quimioquina. Si los niveles del marcador asociado con el filtro están correlacionados con la cantidad de compuesto de prueba, dicho compuesto es un modulador de la actividad del receptor de quimioquina. Si el nivel del marcador asociado con el filtro aumenta al aumentar las cantidades de

compuesto de prueba, se ha identificado un activador. En cambio, si varía inversamente a la cantidad de compuesto de prueba, se ha identificado un inhibidor de la actividad del receptor de quimioquina. Los ensayos de moduladores de fijación de receptores de este modo permiten el rápido cribaje de muchos moduladores putativos, ya que se pueden probar simultáneamente en la misma reacción mezclas que contiene muchos moduladores potenciales.

5 Los ensayos indirectos de fijación de receptor incluyen medidas de la concentración o nivel de actividad de alguno de los componentes encontrados en la vía de transducción de señal relevante. La activación del receptor de quimioquina está frecuentemente asociada con un flujo intracelular Ca^{++} . Se pueden cargar con tinta sensible al calcio células que expresan receptores de quimioquinas. Tras la activación del receptor expresado, el tinte permite detectar espectro-
10 fotométricamente el flujo Ca^{++} . Alternativamente, el flujo Ca^{++} podría ser detectado microscópicamente. Se pueden realizar ensayos paralelos, que utilizan cualquiera de estas técnicas, en presencia y en ausencia de ligandos putativos. Por ejemplo, utilizando el ensayo microscópico para flujo Ca^{++} , se identificó RANTES, una quimioquina CC como ligando del receptor de quimioquinas 88-2B. Los expertos en la materia reconocerán que estos ensayos también resultan útiles para identificar y controlar la purificación de moduladores de la actividad del receptor. Los activadores e
15 inhibidores de receptores activarán o inhibirán, respectivamente, la interacción de los receptores con sus ligandos en estos ensayos.

Alternativamente, la asociación de receptores de quimioquina con proteínas G ofrece la oportunidad de evaluar la actividad del receptor controlando las actividades de la proteína G. Una actividad característica de las proteínas G, la hidrólisis GTP se puede controlar utilizando p. ej. GTP marcado con ^{32}P .

Las proteínas G también pueden afectar a una variedad de otras moléculas debido a su participación en vías de transducción de señal. Por ejemplo, las moléculas efector de proteína G incluyen adenilil ciclasa, fosfolipasa C, canales iónicos y fosfodiesterasas. Los ensayos centrados en algunos de estos efectores se pueden utilizar para controlar la
25 actividad del receptor de quimioquinas inducida por fijación de ligando en una célula huésped, que expresa el receptor de quimioquina de interés y entra en contacto con un ligando apropiado. Por ejemplo, un método mediante el cual se puede detectar la actividad de los receptores de quimioquina incluye la medida de la actividad de la fosfolipasa C. En este ensayo, se detecta la producción de inositol fosfatos radio-marcados por células huéspedes que expresan un receptor de quimioquina en presencia de un agonista. La detección de la actividad de fosfolipasa puede requerir la
30 co-transfección con ADN que codifica una proteína G exógena. Si se precisa la co-transfección, este ensayo se puede realizar por co-transfección de ADN de proteína G híbrida, p. ej. Gq15 (Conklin, *et al.*, *Nature* 363: 274-276 (1993)), con ADN de 88-2B o 88C y detectando la producción de fosfoinositol cuando se expone la célula cotransfectada a un agonista del receptor 88-2B o 88C. Los expertos en la materia reconocerán que los ensayos centrados en las moléculas efector de proteína G resultan también útiles para identificar y controlar la purificación de moduladores de la actividad
35 del receptor. Los activadores e inhibidores de receptores activarán o inhibirán, respectivamente la interacción de los receptores con sus ligandos en estos ensayos.

Las quimioquinas se han relacionado con muchas patologías inflamatorias tales como la psoriasis, la artritis, la fibrosis pulmonar y la aterosclerosis. Véase Baggiolini *et al.*, más arriba. Los inhibidores de la acción de la quimioquina pueden resultar útiles para el tratamiento de estos estados patológicos. En un ejemplo, Broaddus *et al.*, *of Immunol.* 152:2960-2967 (1994) describe un anticuerpo para IL-8 que puede inhibir el reclutamiento neutrófilo en la pleuresía inducida por endotoxina, un modelo de inflamación aguda en el pulmón de los conejos. También se considera que la interacción de ligando o modulador con el receptor 88C o su activación puede resultar útil en el tratamiento de infección por HIV y estados patológicos relacionados con HIV.

45 Los moduladores de quimioquina que interactúan con receptores específicos contemplados por la invención pueden incluir anticuerpos dirigidos hacia una quimioquina o un receptor, pequeñas moléculas biológicas o químicas, o péptidos sintéticos correspondientes a fragmentos de la quimioquina o receptor.

50 Se considera la administración de composiciones que contienen moduladores 88-2B o 88C a mamíferos, con el objeto de controlar o remediar las reacciones inmunes normales o patológicas y las infecciones virales que incluyen la infección por retrovirus tales como HIV-1, HIV-2 y SIV. En particular, incluye la mitigación de respuestas inflamatorias, procesos hematopoyéticos anormales e infecciones virales por administración de una cantidad farmacéuticamente aceptable de moduladores receptores de quimioquinas 88-2B u 88C. Incluye además la administración de estas sustancias activas en composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden vehículos, diluyentes o medicamentos. Se contempla toda una variedad de vías de administración. Por ejemplo, las sustancias activas se pueden administrar por las siguientes vías: intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, oral, anal (es decir por medio de formulaciones de supositorios) o pulmonar (es decir, mediante inhaladores, atomizadores, nebulizadores, etc).

60 En otro aspecto, la información de la secuencia ADN facilitada por la presente invención o descrita aquí hace posible el desarrollo por recombinación homóloga o estrategias "knockout" [véase p. ej. Kapecchi, *Science*, 244:1288-1292(1989)], de roedores que no alcanza a expresar receptor de quimioquina funcional 88C u 88-2B o que expresan una variante del receptor. Alternativamente, se pueden preparar ratones transgénicos que expresan un receptor clonado 88-2B u 88C utilizando técnicas de laboratorio bien conocidas (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Manipulando el embrión de ratón: Un Manual de Laboratorio), Brigid Hohan, Frank Costantini and Elizabeth Lacy, eds. (1986) Cold Spring Harbor Laboratory ISBN 0-87969-175-1). Estos roedores resultan útiles como modelos
65 para estudiar las actividades de receptores 88C u 88-2B *in vivo*.

ES 2 255 716 T3

Otros aspectos y ventajas de la invención podrán ser apreciados por los expertos en los siguientes ejemplos.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. El ejemplo 1 describe el aislamiento de ADN genómicos que codifican los receptores de quimioquina 88-2B y 88C. El ejemplo 2 presenta el aislamiento y la secuenciación de cADN que codifican 88-2B y 88C humanos y 88C de macaco. El ejemplo 3 ofrece una descripción de los análisis Northern que revelan los modelos de expresión de los receptores 88-2B y 88C en una variedad de tejidos. El ejemplo 4 detalla la expresión recombinante de los receptores 88-2B y 88C. El ejemplo 5 describe los ensayos de flujo de Ca^{++} , ensayos de hidrólisis de fosfoinositol y ensayos de fijación para la actividad de receptor 88-2B y 88C en respuesta a una variedad de ligandos potenciales. En los ejemplos 6 y 7 se presentan experimentos que describen el papel de 88C y 88-2B como coreceptores para HIV. La preparación y caracterización de anticuerpos monoclonales y policlonales inmunoreactivos con 88C se describen en el ejemplo 8. El ejemplo 9 describe ensayos adicionales diseñados para identificar ligandos o moduladores 88-2B u 88C.

Ejemplo 1

Se aislaron clones genómicos parciales que codifican los nuevos genes del receptor de quimioquina de la invención, mediante PCR basado en secuencias conservadas, halladas en genes previamente identificados y basado en un agrupamiento "clustering" de estos genes de receptor de quimioquinas dentro del genoma humano. Se amplificó el ADN genómico mediante métodos PCR estándar utilizando iniciadores de oligonucleótidos degenerados.

Las plantillas para amplificaciones PCR eran elementos de una fuente, disponible en el mercado, de ADN genómico humano recombinante clonado en Cromosomas artificiales de levadura (es decir YACs). (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL, YAC Library Pools, catálogo n° 95011 B). Un vector YAC puede proveer insertos de 500-1000 pares kilobase. Inicialmente, se cribaron mezclas de ADN de clon YAC mediante PCR utilizando iniciadores específicos del gen que codifica CCCKR1. En particular, se presenta en SEQ ID NO:15 el iniciador de cadena sentido (correspondiente a la cadena sentido de CCCKR1). El iniciador CCCKR(2)-5' consistía en la secuencia 5'-CGTAAGCTTAGAGAAGCCGGGATGGGAA-3' donde los nucleotíidos subrayados son el codon de iniciación de traducción para CCCKR1. El iniciador de cadena anti-sentido era CCCKR3' (que corresponde a la cadena antisentido de CCCKR1) y su secuencia se presenta en SEQ ID NO:16. La secuencia de CCCKR-3', 5'-GCCTCTAGAGTCAGAGACCAGCA-GA-3', contiene el complemento de inversión del codon de iniciación de traducción de CCCKR1 (subrayado). Las mezclas/agrupaciones de ADN de clon YAC dan productos PCR detectables (p. ej. bandas de ADN tras electroforesis de gel) identificaron subagrupaciones (mezclas) adecuadas de clones YAC, sobre la base de un esquema de identificación patentado (Reseca Genetics, Inc, Huntsville, AL). Las reacciones PCR se iniciaron con una incubación a 94°C durante 4 minutos. Las amplificaciones de secuencia se consiguieron utilizando 33 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante un minuto y extensión a 72°C durante dos minutos.

Las subagrupaciones de ADN de clon YAC se sometieron entonces a una segunda tanda de reacciones PCR utilizando las condiciones y los iniciadores utilizados en la primera tanda de PCR. Los resultados de cribajes de subagrupaciones identificaron clones individuales capaces de soportar reacciones PCR con los iniciadores específicos de CCCKR. Un clon 881F10 contenía 640 kb de ADN genómico humano del cromosoma 3p21 inclusive los genes para CCCKR1 y CCCKR2, según lo determinado por PCR e hibridación. Un clon YAC superpuesto, 941A7, contenía 700 kb de ADN genómico humano y contenía también los genes para CCCKR1 y CCCKR2. Por consiguiente, se realizaron estudios ulteriores de cartografía (mapping) utilizando estos dos clones YAC. Los análisis Southern revelaron que CCCKR1 y CCCKR2 estaban situados dentro de aproximadamente 100 kb el uno del otro.

La estrecha proximidad de los genes CCCKR1 y CCCKR2 sugirió que unos genes afines nuevos podían estar ligados a CCCKR1 y CCCKR2. Utilizando ADN de levaduras que contienen clones YAC 881F10 y 941A7 como plantillas. Se realizaron reacciones PCR para amplificar los posibles genes receptores ligados. Se diseñaron como iniciadores PCR unos oligodeoxiribonucleótidos degenerados. Éstos correspondían a regiones que codifican el segundo lazo intracelular y el sexto dominio trans-membrana de receptores de quimioquina CC, según se deduce de las comparaciones de secuencia alineadas de CCCKR1, CCCKR2 y V28. Se utilizó V28 ya que es un receptor huérfano que presenta las características de un receptor de quimioquinas: se ha cartografiado también V28 en cromosoma humano 3. Rapport *et al.*, Gene 163:295-299 (1995). Hay que señalar además que las dos variantes splice (empalme) de CCCKR2, CCCKR2A y CCCKR2B son idénticas en el segundo lazo intracelular y las regiones del sexto dominio transmembrana utilizadas en el análisis. El iniciador 5', designado V28degf2, contiene una zona BamHI interna (véase mas abajo). Su secuencia se presenta en SEQ ID NO:5. La secuencia del iniciador V28degf2 corresponde al ADN que codifica el segundo lazo intracelular de la estructura de receptor canónico Véase Probsts *et al.*, véase más arriba. El iniciador 3' designado V28 degr2, contiene una zona HindII interna (ver abajo); su secuencia se presenta en SEQ ID NO: 6. La secuencia del iniciador V28degr2 corresponde a ADN que codifica el sexto dominio transmembrana de la estructura receptora canónica.

El ADN amplificado PCR se dirigió ulteriormente con BamHI y HindII para generar fragmentos de aprox. 390 bp, que concuerdan con el tamaño de fragmento previsto a partir de la inspección de la secuencia canónica. Tras la digestión de endonucleasa, estos fragmentos PCR se clonaron en pBcluescript (Stratagene In., LaJolla, CA). Se sometió un total de 54 fragmentos clonados análisis de secuencia de nucleótido automáticos. Además de las secuencias de CCCKR1 y CCCKR2, se identificaron secuencias de los dos genes nuevos de receptor de quimioquinas de la invención. Estos dos genes nuevos de receptor de quimioquinas se designaron 88-2B y 88C.

ES 2 255 716 T3

Se utilizó la cartografía y la hibridación de endonucleasa de restricción para cartografiar las posiciones relativas de los genes que codifican los receptores 88C, 88-2B, CCCKR1, y CCCKR2. Estos cuatro genes están estrechamente ligados, ya que el gen para 88C está aproximadamente a 18 KBP del gen CCCKR2 en el cromosoma humano 3p21.

5 Ejemplo 2

Se aislaron cADN de 88-2B y 88C de longitud normal de una biblioteca cADN de macrófagos utilizando el procedimiento siguiente. Inicialmente, se construyó una biblioteca de cADN, descrita en Tjoelker *et al.*, Nature 374:549-553 (1995) en pRc/CMV (Invitrogen Corp. San Diego, CA) a partir de mRNA macrófago humano. La biblioteca de cADN se cribó para comprobar la presencia de clones de cADN 88-2B y 88C por medio de PCR utilizando pares únicos de iniciador correspondientes a 88-2B o 88C. El protocolo PCR suponía una desnaturalización inicial a 94°C durante cuatro minutos. Se amplificaron luego los polinucleótidos utilizando tres ciclos de PCR en las condiciones siguientes: desnaturalización a 94°C durante un minuto, hibridación a 55°C durante un minuto y extensión a 72°C durante dos minutos. El primer iniciador específico de 88-2B fue el iniciador 88-2B f1, presentado en SEQ ID NO:11. Corresponde a la cadena sentido de SEQ ID NO:3 en los nucleótidos 844-863. El segundo iniciador PCR específico del gen que codifica 88-2B fue el iniciador 88-2B-r1, presentado en SEQ ID NO:12; la secuencia de 88-2B-r1 corresponde a la cadena antisentido de SEQ ID NO:3 en los nucleótidos 1023-1042. De forma similar se presenta en SEQ ID NO:13 la secuencia del primer iniciador específico del gen que codifica 88C, el iniciador 88C-f1, y corresponde a la cadena sentido del SEQ ID NO:1 en nucleótidos 453-471. El segundo iniciador específico del gen que codifica 88C es el iniciador 88C-r3, presentado en SEQ ID NO:14; la secuencia de 88C-r3 corresponde a la cadena antisentido de SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 744-763.

El cribaje identificó el clon 777, un clon de cADN de 88-2B. El clon 777 contenía un inserto de ADN de 1915 bp que incluía la secuencia de codificación de longitud normal de 88-2B según lo determinado por los siguientes criterios: El clon contenía un marco de lectura abierta largo que comenzaba con un codon ATG, presentaba una secuencia Kozak, y tenía corriente arriba un codon de terminación in-frame (dentro del marco). Las secuencias de ADN y de aminoácidos deducidos del inserto del clon 777 se presentan en SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, respectivamente. El transcripto 88-2B era relativamente raro en la biblioteca cADN macrófago. Durante el cribaje de la biblioteca sólo se identificaron tres clones 88-2B de un total estimado de 3 millones de clones.

El cribaje de clones cADN que codifican el receptor de quimioquinas 88C identificó clones 101 y 134 que parecían contener la totalidad de la región de codificación 88C, inclusive un codon de iniciación putativo. No obstante, estos clones carecían de la secuencia de final 5' necesaria para confirmar la identidad del codon de iniciación. El transcripto 88C era relativamente abundantemente en la biblioteca cADN macrófago. Durante el cribaje de la biblioteca, se estimó que 88C estaba presente en uno por cada 3000 transcriptos (en un total de aprox. 3 millones de clones en la biblioteca).

Se realizó RACE PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) (Amplificación rápida de extremos de cADN) para extender las secuencias de clones 88C existentes, facilitando de este modo la caracterización precisa del extremo 5' del cADN 88C. Se compró en Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA cADN listo para RACE 5' de bazo humano y se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. El cADN se había hecho "listo para 5'-RACE" ligando una secuencia de fijación a los extremos 5' de los fragmentos de cADN. La secuencia de fijación es complementaria a un iniciador de fijación suministrado por Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA. El polinucleótido dúplex secuencia-iniciador de fijación contiene una zona EcoRI. El cADN de bazo humano se eligió como ADN plantilla debido a que las transferencias Northern habían revelado que 88C estaba expresado en este tejido. Se iniciaron las reacciones PCR desnaturalizando muestras a 94°C durante 4 minutos. Ulteriormente, se amplificaron secuencias utilizando 35 ciclos que suponían la desnaturalización a 94°C durante un minuto, hibridación a 60°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante dos minutos. La primera tanda de PCR se realizó en mezclas de reacción que contenían 2 µl del cADN de bazo listo para 5'-RACE, 1 µl del iniciador de fijación y 1 µl del iniciador de 88c-r4 (100 ng/µl) en un volumen total de reacción de 50 µl. El iniciador específico de 88C, iniciador 88c-r4 (5'-GATAAGCCTCACAGCCCTGTG-3'), se presenta en SEQ ID NO:7. La secuencia del iniciador 88c-r4 corresponde a la cadena antisentido de SEQ ID NO: 1 en los nucleótidos 745-765. Se realizó una segunda tanda de PCR en mezclas de reacción que incluían 1 µl de la primera reacción de PCR con 1 µl de iniciador de fijación y 1 µl de iniciador 88C-rlb (100 ng/µl) que contenía la siguiente secuencia (5'-GCTAAGCTTGATG-ACTATCTTTAATGTC-3') que se presenta en SEQ ID NO:8. La secuencia del iniciador 88C-rlb contiene una zona de clonación interna HindIII (subrayada). La secuencia 3' de la zona HindIII corresponde a la cadena antisentido de SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 636-654. El producto PCR resultante se digirió con EcoRI y HindIII y se fraccionó en gel agarosa al 1%. El fragmento de aprox. 700 bp se aisló y clonó en pBluescript. Se secuenciaron los clones con los mayores insertos. Alternativamente, el producto PCR intacto se ligó en el vector pCR utilizando un kit de clonación TA comercial (Invitrogen Corp., San Diego, CA) para determinaciones posteriores de secuencias de nucleótidos.

Los cADN de 88-2B y 88C se secuenciaron utilizando el kit PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer Corp., Foster City, CA) y un secuenciador de ADN de Applied Biosystems 373A. El inserto del clon 777 proporcionó la plantilla de doble cadena para reacciones de secuenciación utilizadas para determinar la secuencia de cADN 88-2B. La secuencia de todo el inserto del clon 777 se determinó y se presentó como la secuencia de cADN 88-2B y se dedujo la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO:3. La secuencia tiene una longitud de 1915 bp, inclusive 361 bp de ADN 5' no traducido (correspondiente a SEQ ID NO:3 en los nucleótidos 1-361), una región de codificación de 1065 bp (correspondiente a SEQ ID NO:3 en los nucleótidos 362-1426) y 489 bp de ADN no traducido 3' (correspondiente a SEQ ID NO:3 en los nucleótidos 1427-1915). El ADN genómico 88-

ES 2 255 716 T3

2B, descrito en el ejemplo 1 anterior, corresponde a SEQ ID NO:3 en los nucleótidos 746-1128. La secuencia de cADN 88C y la secuencia de aminoácidos deducida se presenta en SEQ ID NO:1. La secuencia de cADN 88C es un compuesto de las secuencias obtenidas de cADN RACE-PCR, clon 134 y clon 101. El cADN RAE-PCR se utilizó como plantilla de secuenciación para determinar los nucleótidos 1-654 en SEQ ID NO:1, inclusive la identificación única de 9 bp de la secuencia de cADN no traducida 5' en SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 1-9. La secuencia obtenida de cADN RACE-PCR confirmó la posición del primer codon de metionina en los nucleótidos 55-57 en SEQ ID NO:1 y reforzó la conclusión de que el clon 134 y el clon 101 contenían copias de longitud normal de la región de codificación de 88C. El clon 134 contenía 45 bp de cADN no traducido 5' (correspondiente a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 10-54), la región de codificación de 1056 bp 88C (correspondiente a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 55-1110) y 492 bp de cADN no traducido 3' (correspondiente a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 1111-1602). El clon 101 contenía 25 bp de cADN no traducido 5' (correspondiente a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 30-54) la región de codificación de 88C de 1056 bp (correspondiente a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 55-1110) y 2273 bp de cADN no traducido 3' (correspondiente a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 1111-3383). El ADN genómico 88C descrito en el ejemplo 1 anterior corresponde a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 424-809.

Las secuencias deducidas de aminoácidos 88-2B y 88C revelaron perfiles de hidrofobicidad característicos de GPCRs, inclusive siete dominios hidrófobos correspondientes a dominios transmembrana GPCR. Las comparaciones de la secuencia con otros GPCRs también revelaron un grado de identidad. Notablemente, las secuencias de aminoácidos deducidas de 88-2B y 88C tenían el mayor grado de identidad con las secuencias de los receptores de quimioquinas. El cuadro 1 presenta los resultados de estas comparaciones de secuencias de aminoácidos.

CUADRO 1

Receptores de quimioquina	88-2B	88C
IL-8RA	30%	30%
IL-8RB	31%	30%
CCCKR1	62%	54%
CCCKR2A	46%	66%
CCCKR2B	50%	72%
88-2B	100%	50%
88-C	50%	100%

El cuadro 1 muestra que 88-2B es lo más similar a CCCKR1 (62% idéntico al nivel de aminoácidos) y 88C es lo más similar a CCCKR2 (72% idéntico al nivel de aminoácidos).

Las secuencias deducidas de aminoácidos de 88-2B y 88C también revelan los dominios intracelular y extracelular característicos de GPCRs. Los dominios extracelulares de 88-2B corresponden a la secuencia de aminoácidos ofrecida en SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4 en los residuos de aminoácidos 1-36, 93-107, 171-196 y 263-284. Los dominios extracelulares 88-2B son codificados por secuencias de polinucleótidos que corresponden a SEQ ID NO:3 en los nucleótidos 362-469, 638-682, 872-949 y 1148-1213. Los dominios extracelulares de 88C incluyen residuos de aminoácidos 1-32, 89-112, 166-191 y 259-280 en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. Los dominios extracelulares de 88C son codificados por secuencias de polinucleótidos que corresponden a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 55-150, 319-390, 550-627 y 829-894. Los dominios intracelulares de 88-2B incluyen aminoácidos 60-71, 131-151, 219-240 y 306-355 de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4. Estos dominios son codificados por secuencias de polinucleótidos que corresponden a SEQ ID NO:3 en los nucleótidos 539-574, 752-814, 1016-1018 y 1277-1426, respectivamente. Los dominios intracelulares de 88C incluyen residuos de aminoácidos 56-67, 125-145, 213-235 y 301-352 de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO: 2. Los dominios intracelulares de 88C son codificados por secuencias de polinucleótidos que corresponden a SEQ ID NO: 1 en los nucleótidos 220-255, 427-489, 691-759 y 955-1110.

Además, se amplificó un ADN de 88C de macaco por PCR a partir de ADN genómico de macaco utilizando iniciadores correspondientes a regiones de flanco 5' y 3' del cADN humano de 88C. El iniciador 5' correspondía a la región inmediatamente corriente arriba e incluía el codon de iniciación Met. El iniciador 3' era complementario de la región inmediatamente corriente abajo del codon de terminación. Los iniciadores incluían zonas de restricción para la clonación en vectores de expresión. La secuencia del iniciador 5' era GACAAGCTTCACAGGGTGGGAACAAGATG (con la zona HindIII subrayada) (SEQ ID NO:17) y la secuencia del iniciador 3' era GTCTCTAGACCACCTTGAGTCCCGTGTCA (con la zona XbaI subrayada) (SEQ ID NO:18). Las condiciones del amplificador PCR fueron 94°C durante ocho minutos luego 40 ciclos de 94°C durante un minuto, 55°C durante cuarenta y cinco segundos y 72°C durante un minuto. Los productos amplificados se clonaron en las zonas HindII y XbaI de pcADN3 y se obtuvo y se secuenció un clon. El cADN de macaco de longitud normal y la secuencia de aminoácidos deducida se presentan en SEQ ID NO:19 y 20 respectivamente. La secuencia de nucleótidos de 88C de macaco es 98% idéntica a la secuencia de 88C humano. Las secuencias de aminoácidos deducidas son 97% idénticas.

ES 2 255 716 T3

Ejemplo 3

Los modelos de expresión de mRNA de 88-2B y 88C se determinaron por análisis de transferencia Northern.

5 Las transferencias Northern que contienen ARN poli A⁺ inmovilizado de una variedad de tejidos humanos se adquirieron en Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA. En particular, se examinaron los siguientes tejidos: corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovarios, intestino delgado, colon y leucocitos de sangre periférica.

10 Se generó una sonda específica para secuencias de nucleótidos de 88-2B a partir de clon 478 de cADN. El inserto de cADN en el clon 478, contiene la secuencia correspondiente a SEQ ID NO:3, en los nucleótidos 641-1915. Para generar una sonda se digirió el clon 478 y el fragmento de ADN del inserto se aisló tras la electroforesis de gel. El fragmento de inserto aislado se radio marcó con nucleótidos marcados con ³²P, utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica.

15 Se generó una sonda específica de secuencias de nucleótidos de 88C aislado y radio marcando el fragmento de ADN del inserto hallado en el clon 493. El fragmento del inserto del clon 493 contiene una secuencia correspondiente a SEQ ID NO:1 en los nucleótidos 421-1359. Se utilizaron nuevamente técnicas convencionales que utilizaban nucleótidos marcados ³²P para generar la sonda.

20 Las transferencias Northern sondadas con 88-2B revelaron un mRNA de aproximadamente 1,8 kb en los leucocitos de la sangre periférica. Los Northern de 88C mostraron un mRNA de aprox. 4 kb en varios tejidos humanos, inclusive una fuerte señal al sondear el tejido del bazo o del timo y señales menos intensas al analizar mRNA de leucocitos de sangre periférica y de intestino delgado. Se detectó una señal relativamente débil para 88C en tejido de pulmón y ovario.

25 La expresión de 88C en células T humanas y en líneas celulares hematopoiéticas también se determinó por análisis de transferencia Northern. Los niveles de 88C en células T de CD4⁺ y CD8⁺ eran muy elevados. El transcrito estaba presente en niveles relativamente elevados en líneas celulares mieloides THP1 y HL-60 y también se encontró en la línea celular B Jijoye. Además, el cADN era un transcrito relativamente abundante en una biblioteca de cADN, macrófago humano basada en la amplificación PCR de subfracciones de biblioteca.

Ejemplo 4

35 Se expresaron los cADN de 88-2B y 88C mediante métodos recombinantes en células de mamífero.

40 Para experimentos de transfección transitoria se subclonó 88C en el vector de expresión de célula de mamífero pBJI (Ishi, K. *et al.*, J. Biol. Chem 270:16435-16440(1995)). El constructo incluía secuencias que codifican una secuencia señal de prolactina para la expresión eficiente de superficie celular y un epítipo FLAG en el término amino de 88C para facilitar la detección de la proteína expresada. El epítipo FLAG consiste en la secuencia "DYKDDDD". Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido de expresión 88C utilizando lipofectamina (Life Technology, Inc, Grand Island, NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 4 X 10⁴ células por pocillo y se dejaron en cultivo toda la noche. Las células se lavaron entonces con PBS y se añadió a cada pocillo 0,3 mg de ADN mezclado con 1,5 µl de lipofectamina en 0,25 ml de Opti-MEM. Después de 5 horas a 37°C, el medio se sustituyó por un medio que contenía 10% de FCS. La ELISA cuantitativa confirmó que se expresaba 88C en la superficie celular en células COS-7 transfectadas transitoriamente utilizando el anticuerpo M1 específico del epítipo FLAG (Eastman Co., New Haven, CT).

50 El receptor de 88C marcado FLAG se transfectó también de forma estable en células HEK-293, una línea celular de riñón embrionario humano, utilizando reactivo de transfección DOTAP (N-[1-[(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamoniometilsulfato, Boehringer-Mannheim, Inc., Indianápolis, IN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se eligieron líneas estables en presencia del fármaco G418. Las células HEK-293 transfectadas se evaluaron para la expresión de 88C en la superficie celular mediante ELISA utilizando el anticuerpo M1 para el epítipo FLAG. ELISA mostró que 88C rotulado con el epítipo FLAG se expresaba en la superficie celular de células HEK-293 transformadas de modo estable.

60 Se utilizaron los cADN 88-2B y 88C para fabricar transfectantes HEK-293 estables. El cADN del receptor 88-2B se clonó detrás del promotor de citomegalovirus en pRc/CMV (Invitrogen Corp. San Diego, CA) utilizando una estrategia basada en PCR. La plantilla para la reacción PCR era el inserto de cADN en el clon 777. Los iniciadores PCR fueron 88-2B-3 (que contenían una zona XbaI interna) y 88-2B-5 (que contenían una zona HindII interna). La secuencia de nucleótidos del iniciador 88-2B-3 se presenta en SEQ ID NO:9. La secuencia de nucleótidos del iniciador 88-2B-5 se presenta en SEQ ID NO:10. Se amplificó una región de cADN de 1104 bp. Tras la amplificación, se digirió ADN con XbaI y HindII y se clonó en pRc/CMV digerido de forma similar.

65 El plásmido resultante recibió el nombre de 777XP2 y contiene 18 bp de secuencia no traducida 5', la región de codificación entera de 88-2B y 3 bp de la secuencia no traducida 3'. Para la secuencia 88C, no se siguió modificando el inserto de cADN de longitud normal del clon 134 antes de transfectar células HEK-293.

ES 2 255 716 T3

Para crear líneas celulares transformadas de modo estable, se transfectaron los clones recombinantes pRc/CMV utilizando reactivo de transfección DOTAP (N-[1-[(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio]metilsulfato, Boehringer-Mannheim, Inc., Indianápolis, IN) siguiendo las recomendaciones del fabricante, en células HEK-293, una línea celular de riñón embrionario humano. Se eligieron líneas estables en presencia del fármaco G418. Se realizaron procedimientos de cribaje standard (es decir análisis de transferencia Northern) para identificar líneas celulares estables que expresaban los niveles más elevados de mRNA de 88-2B y 88C.

Ejemplo 5

10 A. Ensayos de flujo Ca^{++}

Para analizar la expresión de polipéptido, se empleó un ensayo funcional para la actividad del receptor de quimioquinas. Una característica común de la señalización por medio de los conocidos receptores de quimioquinas es que la transducción de señal está asociada con la liberación de cationes de calcio intracelular. Por ello, la concentración intracelular de Ca^{++} en las células HEK-293 transfectadas se comprobó para determinar si los receptores 88-2B ó 88C respondían a alguna de las quimioquinas conocidas.

Se dejaron en cultivo en matraces T75 a un 90% aprox. de confluencia en MEM + 10% de suero unas células HEK-293, transfectadas establemente con 88-2B, 88C (sin la secuencia del epítipo FLAG) o una región codificadora de control (que codifica IL8R o CCCKR2, véase más abajo) según lo descrito anteriormente. Las células se lavaron después, se cosecharon con versene (0,6 mM EDTA, 10 mM Na_2HPO_4 , 0,14 M NaCl, 3 mM KCl y 1 mM de glucosa) y se incubaron en MEM + 10% de suero - 1 μ M Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Fura-2 AM es un tinte sensible de Ca^{++} . Las células se volvieron a suspender en salino con tampón de fosfato de Dulbecco que contenía 0,9 mM $CaCl_2$ y 0,5 mM $MgCl_2$ (D-PBS) hasta una concentración de aprox. 10^7 células/ml y se controlaron los cambios de fluorescencia utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (Hitachi modelo F-4010). Se suspendieron aprox. 10^6 células en 1,8 ml de D-PBS en una cubeta mantenida a 37°C. Las longitudes de onda de excitación fueron alternándose entre 3340 y 380 nm a intervalos de 4 segundos; la longitud de onda de emisión era de 510 nm. Se añadieron composiciones de prueba a la cubeta a través de un orificio de inyección; se midió un flujo máximo de Ca^{++} tras la adición de ionomicina.

Se observaron respuestas positivas en células que expresan IL-8RA al estimularlas con IL-8 y también cuando se estimuló CCCKR2 con MCP-1 ó MCP-3. Sin embargo, las células HEK-293 que expresan 88-2B ó 88C dejaron de presentar un flujo en concentración de Ca^{++} intracelular al exponer a cualquiera de las quimioquinas siguientes: MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β , IL8, NAP-2, gro-MGSA, IP-10, ENA-78 ó PF-4, (Peprotech, Inc., Rocky, Hill, NJ).

Utilizando un ensayo más sensible, se observó microscópicamente una respuesta de flujo de Ca^{++} a RANTES en células cargadas de Fura-2 AM que expresan 88-2B. El ensayo incluyó células y reactivos preparados según lo descrito anteriormente. RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted) es una quimioquina CC que ha sido identificada en un quimioattractante y activador de eosinófilos. Véase Neote *et al.*, más arriba. Esta quimioquina también actúa de mediador en la liberación de histamina por medio de basófilos y se ha visto que funciona como quimioattractante para células T de memoria *in vitro*. Se considera por lo tanto que la modulación de actividades de receptores 88-2B resulta útil en la modulación de la activación de leucocitos.

Se expresó el receptor 88C rotulado FLAG en células HEK-293 y se comprobó las interacciones de la quimioquina en el ensayo de flujo Ca^{++} . La expresión de la superficie celular de 88C fue confirmada por ELISA y por el análisis FACSscan utilizando el anticuerpo M1. Las quimioquinas RANTES MIP-1 α , y MIP-1 β indujeron todas ellas un flujo de Ca^{++} en células transfectadas 88C al añadir a una concentración de 100 nM.

Se pueden diseñar también ensayos de flujo Ca^{++} para identificar moduladores de fijación de receptor de quimioquinas. Los ensayos fluorométricos microscópicos anteriores se realizan en presencia de compuestos de prueba. Si se incrementa el flujo Ca^{++} en presencia de un compuesto de prueba, dicho compuesto es un activador de la fijación del receptor de quimioquinas.

Por el contrario, un flujo Ca^{++} disminuido identifica el compuesto de prueba como inhibidor de la fijación de receptor de quimioquinas.

B. Hidrólisis de fosfoinositol

Otro ensayo para ligandos o moduladores hace intervenir el control de la actividad de fosfolipasa C, tal como se describe en Hung *et al.*, J. Biol. Chem. 116:827-832 (1992). Inicialmente, se cargan con 3H -inositol durante 24 horas células huéspedes que expresan un receptor de quimioquinas. Se añaden entonces a las células compuestos de prueba (es decir ligandos potenciales) y se incuban a 37°C durante 15 minutos. Las células se exponen entonces a 20 mM de ácido fórmico para solubilizar y extraer los metabolitos hidrolizados del metabolismo de fosfoinositol (es decir los productos de la hidrólisis mediada por fosfolipasa C). El extracto se somete a cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna de intercambio aniónico AG1X8 (molde de formato). Se eluyen fosfatos de inositol con 2 M de formato de amonio/0,1 M ácido fórmico y el 3H asociado con los compuestos se determina utilizando espectrografía por centelleo de líquido. El ensayo de fosfolipasa C también se puede aprovechar para identificar moduladores de

ES 2 255 716 T3

la actividad de receptores de quimioquinas. El ensayo antes citado se realiza en la forma descrita, pero añadiendo un modulador potencial. Los elevados niveles de rótulo detectable indicarían que el modulador es un activador, los niveles reducidos del rótulo indicarían que el modulador es un inhibidor de la actividad del receptor de quimioquinas.

5 El ensayo de fosfolipasa C se realizó para identificar ligandos de quimioquina del receptor 88C marcado FLAG. Aproximadamente 24 horas después de la transfección, se marcaron células COS-7 que expresan 88C durante 20-24 horas con myo-[2-³H] inositol (1 μ Ci/ml) en medio libre de inositol que contenía 10% de FCS dializado. Las células marcadas se lavaron DMEM libre de inositol que contenía 10 mM LiCl y se incubaron a 37°C durante 1 hora con DMEM libre de inositol que contenía 10 mM LiCl y una de las siguientes quimioquinas: RANTES, MIP-1 β , MIP-1 α ,
10 MCP-1, IL-8 o el homólogo JE de MCP-1 de murino. Se analizó la formación de fosfato de inositol (IP) en la forma descrita en el párrafo anterior. Tras la incubación con quimioquinas, se aspiró el medio y se lisaron células añadiendo 0,75 ml de 20 mM de ácido fórmico helado (30 minutos). Las fracciones sobrenadantes se cargaron sobre columnas AG1X8 Dowex (Biorad, Hercules, CA) seguido de la adición inmediata de 3 ml de 50 mM NH₄OH. Las columnas se lavaron entonces con 4 ml de 40 mM de formato de amonio, seguido de elución con 2 M de formato de amonio. Se
15 cuantificaron los fosfatos de inositol totales contando las emisiones beta.

Debido a que se ha visto que algunos receptores de quimioquinas como IL8RA Y IL8RB requieren la co-transfección con una proteína G exógena antes de poder detectar señales en células COS-7, el receptor 88C se co-expresó con la proteína G híbrida Gqi5 (Conklin *et al.*, *Nature* 363:274-276 (1993)). Gqi5 es una proteína G que tiene en el
20 terminal carboxi cinco aminoácidos de Gi (que interactúan con el receptor) empalmados en G α q. La co-transfección con Gqi5 potencia notablemente la señalización por parte de CCCKR1 y CCCKR2B. La co-transfección con Gqi5 reveló que 88C señalaba bien en respuesta a RANTES, MIP-1 β y MIP-1 α pero no en respuesta a MCP-1, IL-8 o el homólogo JE MCP-1 murino. Las curvas dosis-respuesta revelaron valores EC₅₀ de 1 nM para RANTES, 6 nM para MIP-1 β Y 22 nM para MIP-1 α .

25 88C es el primer receptor humano clonado con una respuesta de señal a MIP-1 β . Comparado con otras quimioquinas CC, MIP-1 β tiene claramente un modelo de activación celular único. Parece que activa las células T pero no monocitos (Baggiolini *et al.*, ver más arriba). Lo cual se corresponde con los estudios de estimulación de receptor. Por ejemplo, mientras MIP-1 β interactúa con CCCKR1, no induce flujo de calcio (Neote *et al.*, ver más arriba). En cambio
30 MIP-1 α y RANTES interactúan con y causan la señalización en CCCKR1, CCCKR5 (RANTES también causa la activación de CCCKR3). MIP-1 β parece ser por lo tanto mucho más selectivos que otras quimioquinas de la familia de quimioquinas CC. Esta selectividad tiene importancia terapéutica ya que se puede estimular una actividad beneficiosa específica (como la supresión de infección por HIV) sin estimular poblaciones de leucocitos múltiples que tiene por
35 lo general como resultado actividades pre-inflamatorias.

C. Ensayos de fijación

Otro ensayo para la interacción de receptor con quimioquinas fue la modificación del ensayo de fijación descrito por Ernst *et al.* *J. Immunol.* 152:3541-3540 (1994). MIP-1 β marcada utilizando el reactivo Bolton and Hunter (di-
40 yoduro, NEN, Wilmington, DE) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se separó yoduro no conjugado de proteína marcada por elución utilizando una columna PD-10 (Pharmacia) equilibrada con PBS y BSA (1% p/v). La actividad específica fue típicamente de 2200 Ci/mmol. La fijación de equilibrio se realizó añadiendo ligando ¹²⁵I-marcado con o sin un exceso de 100 veces ligando no marcado, a 5 X 10⁵ células HEK-293 transfectadas con 88C marcado con el epitopo FLAG en tubos de polipropileno en un volumen total de 300 μ l (50 mM HEPES pH 7, 4, 1 mM CaCl₂,
45 MgCl₂, 0,5% BSA) e incubando durante 90 minutos a 27°C, agitando a 150 rpm. Las células se cosecharon utilizando un cosechador celular Skatron (Skatron Instruments Inc., Sterling, VA) sobre filtros de fibra de vidrio pre-impregnados en 0,3% de polietilénmina y 0,2% de BSA. Después de lavar, se quitaron los filtros y se cuantificó el ligando fijado contándolas en misiones gamma. La fijación de ligando en competición con ligando no marcado se determinó por
50 incubación de 5 X 10⁵ células transfectadas (como arriba) con 1,5 nM de ligando radio marcado y las concentraciones indicadas de ligando no marcado. Las muestras se recogieron, se lavaron y contaron igual que arriba. Se analizaron los datos utilizando el prisma de programa de ajuste de curva (GraphPad Inc., San Diego, CA) y el programa de regresión no lineal iterativa, LIGAND (PM220).

En los ensayos de fijación de equilibrio, el receptor 88C ligó MIP-1 β radio marcado de forma específica y saturable.
55 El análisis de los datos de fijación utilizando el método de Scatchard reveló una constante de disociación (Kd) de 1,6 mM. Los ensayos de fijación de prueba utilizando MIP-1 β marcado revelaron una fijación de alta afinidad de MIP-1 β (IC₅₀ = 7,4 nM). RANTES (IC₅₀ = 6,9 nM) y MIP-1 α (IC₅₀ = 7,4 nM), lo cual se corresponde con los datos de señalización obtenidos en células COS-7 transfectadas de forma transitoria según lo indicado en el apartado B anterior.

60 Ejemplo 6

Como se ha visto, las quimioquinas MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES inhiben la replicación de HIV-1 y HIV-2 en células mononucleares de sangre periférica humana y células PM1 (Cocchi *et al.*, ver más arriba). A la vista de este
65 resultado y teniendo en cuenta los descritos en el ejemplo 5, la presente invención considera que la activación de o la fijación de ligando al receptor 88C puede desempeñar un papel protector en infección por HIV.

Recientemente, se ha señalado que el receptor acoplado con proteína G huérfana, fusina, puede actuar como co-receptor para entrada de HIV. La fusina/CXCR4 en combinación con CD4, el receptor primario HIV facilita aparente-

ES 2 255 716 T3

mente la infección por HIV de células T cultivadas (Feng, *et al.*, Science 272:872-877 (1996)). Basado en la homología de fusina con receptores de quimioquina y el perfil de fijación de quimioquina de 88C y debido a que 88C se expresa constitutivamente en células T y abundantemente macrófagos, es probable que 88C esté involucrado en infección viral y por HIV. La función de 88C y 88-2B como co-receptores de HIV se determinó transfectando células que expresan CD4 con 88C ó 88-2B y exponiendo las células co-transfectadas a HIV. Únicamente se infectaron las células que expresan tanto CD4 como un co-receptor funcional de HIV. La infección por HIV se puede determinar utilizando varios métodos. Los ELISA que comprueban la expresión de antígenos HIV se pueden obtener en el comercio, p. ej. ensayo antígeno Coulter HIV-1 p24 (Pat. US 4,886,742) Coulter Corp. 11800 SW 147th Ave., Miami, FL 33196. Alternativamente, las células de prueba se pueden diseñar para expresar un gen indicador como LACZ fijado al promotor HIV LTR [Kimpton *et al.*, J. Virol. 66: 2232-2239 (1992)]. En este método, se detectan por medio de ensayo colorimétrico las células infectadas por HIV.

Se transfectó de forma transitoria 88C en una línea celular de gato, CCC [Clapham, *et al.*, 181:703-715 (1991)] que había sido transformada de modo estable para expresar CD4 humano (CCC-CD4). Estas células son normalmente resistentes a la infección por cepas de HIV-1 ya que no expresan endogeniamente 88C. En estos experimentos, las células CCC/CD4 se transfectaron de modo transitorio con 88C clonado en el vector de expresión pcADN 3.1. (Invitrogen Corp., San Diego, CA) utilizando lipofectamina (Gibco BRL, Gaithersburg., MD). Dos días después de la transfección, se expusieron las células a HIV. A los 4 días de la incubación, las células se fijaron y tñieron para el antígeno p24 como medida de infección por HIV. La expresión de 88C por medio de estas células las hizo susceptibles a una infección por diversas cepas de HIV-1. Estas cepas comprendían 4 aislados HIV-1 primarios que no inducen syncytium (M23, E80, SL-23 y SF-162) que según se pudo comprobar utilizan solamente 88C como co-receptor pero no fusina. Diversas cepas primarias de HIV-1 que inducen syncytium (2006, M13, 2028 y 2076) utilizaron 88C o fusina como co-receptor. Asimismo, dos virus HIV-1 clonales establecidos (GUN-1 y 89.6) utilizaron 88C o fusina como co-receptor.

Se ha indicado que algunas cepas de HIV-2 pueden infectar ciertas líneas celulares CD4-negativas, lo cual implica una interacción directa de HIV-2 con un receptor distinto de CD4 [Clapham, *et al.*, J. Virol. 66:3531-3537 (1992)]. Para algunas cepas de HIV-2, esta infección se ve facilitada por la presencia de CD4 soluble (sCD4). Como 88-2B comparte una elevada semejanza de secuencia con otros receptores de quimioquina que actúan como co-receptores HIV (es decir 88C y fusina), se consideró que 88-2B era probablemente un co-receptor de HIV-2. El papel de 88-2B como co-receptor de HIV-2 se demostró utilizando cepa HIV-2 ROD/B. Se transfectaron con 88-2B células CCC de gato que no expresan endogeniamente CD4. En estos experimentos, se transfectaron células con pcADN3.1 que contenía 88-2B utilizando lipofectamina y se infectaron con HIV-2 48 horas después. Tres días después de la infección, se inmuno-tñieron las células para comprobar la presencia de glicoproteínas de envoltura de HIV-2. La presencia de sCD4 durante la exposición a HIV-2_{ROD/B} aumentó en 10 veces la infección de estas células. La entrada de HIV-2 en las células transfectadas 88-2B se pudo bloquear mediante la presencia de 400-800 ng/ml de eotaxina, uno de los ligandos de 88-2B. Los niveles de infectividad básica de CCC/88-2B (con CD4 no soluble) eran equivalente a la célula CCC que no habían sido transfectadas con 88-2B.

El papel de 88-2B y 88C como co-receptores de HIV se confirmó preparando y exponiendo líneas celulares transformadas establemente para expresar 88C o 88-2B a diversas cepas de HIV y SIV. Estos resultados se describen en el ejemplo 7.

Alternativamente, el papel de co-receptor de 88C y 88-2B se puede demostrar con un método experimental que no requiere la utilización de virus vivos. En este método, se mezclan líneas celulares que co-expresan 88C o 88-2B, CD4 y un gen indicador LACZ con una línea celular que co-expresa la glicoproteína de envoltura de HIV (ENV) y un factor de transcripción para el constructo del gen indicador (Nussbaum, *et al.*, 1994 J. Virol. 68:5411). Las células que expresan un co-receptor funcional para HIV se fundirán con las células que expresan ENV y permitirán de este modo la expresión del gen indicador. En este método, la detección del producto génico indicador por ensayo colorimétrico indica que 88C o 88-2B funcionan como co-receptor para HIV.

El mecanismo mediante el cual las quimioquinas inhiben la infección viral todavía no ha sido elucidado. Un posible mecanismo supone la activación del receptor mediante la fijación de una quimioquina. La fijación de la quimioquina conduce a eventos de transducción de señal en la célula que hace que sea resistente a infección viral y/o impiden la replicación del virus en la célula. De forma similar a la inducción de interferon, la célula puede diferenciar lo que es resistente a infección viral, o se establece en un estado antiviral. Alternativamente, un segundo mecanismo supone la interferencia directa con la entrada viral en células bloqueando el acceso de glicoproteínas de envoltura viral al co-receptor mediante fijación de quimioquinas. En este mecanismo, no se requiere señalización de G-proteína para supresión por quimioquina de infección por HIV.

Para distinguir entre dos mecanismos mediante los cuales 88C o 88-2B pueden funcionar como co-receptores para infección viral o por HIV, se desacopla la fijación de quimioquina al receptor de la transducción de señal y se determina el efecto de la quimioquina sobre la supresión de infección viral.

La fijación de ligandos se puede desacoplar de la transducción de señal añadiendo compuestos que inhiben la señalización mediada por proteína G. Estos compuestos comprenden p. ej. toxina *pertussis* y toxina de cólera. Además, se pueden inhibir polipéptidos efectos corriente abajo mediante otros compuestos como wortmannin. Si la señalización de proteína G está involucrada en la supresión de la infección viral, la adición de dichos compuestos podría prevenir

la supresión de la infección viral por la quimioquina. Alternativamente, se pueden alterar o borrar residuos claves o dominios receptores de receptor 88C o 88-2B necesario para el acoplamiento de proteína G de tal modo que el acoplamiento de proteína G quede alterado o destruido aunque no queda afectada la fijación de quimioquina.

5 En estas condiciones, si las quimioquinas no pueden suprimir la infección viral o por HIV, entonces se precisa señalización por proteína G para la supresión de infección viral o por HIV. No obstante, si las quimioquinas pueden suprimir la infección viral, entonces no se precisa señalización de proteína G para la supresión por quimioquina de infección viral y los efectos protectores de las quimioquinas pueden ser debidas a que la quimioquina bloquea la disponibilidad del receptor para el virus.

10 Otro enfoque supone la utilización de anticuerpos directamente contra 88C o 88-2B. Los anticuerpos que interactúan con 88C o 88-2B pueden que, según se puede ver no provocan señalización de proteína G, pueden bloquear el acceso a la quimioquina o a la zona de fijación viral del receptor. Si en presencia de anticuerpos de 88C o 88-2B, se suprime la infección viral, entonces el mecanismo de los efectos protectores de la quimioquina consiste en
15 bloquear el acceso viral a su receptor. Feng *et al.*, informa que unos anticuerpos del término amino del receptor de fusina suprimieron la infección por HIV (Feng, *et al.*, 1996).

Ejemplo 7

20 Se transformaron establemente líneas celulares con 88C o 88-2B para seguir aclarando el papel de 88C y 88-2B en infección por HIV. Kimpton y Emerman, "Detection of Replication-Competent and Pseudotyped Human Immunodeficiency Virus with a Sensitive Cell Line on the Basis of Activation of an integrated Beta-Galactosidase Gene", *J. Virol.* 66(5): 3026-3031 (1992) describieron con anterioridad una línea celular indicadora, identificada aquí como células HeLa-MA-GI. Las células HeLa-MAGI son células HeLa que han sido transformadas establemente para expresar
25 CD4 así como HIV-1 LTR integrado que estipula la expresión de un gen nuclear de β -galactosidasa localizado. La integración de un provirus HIV en las células conduce a la producción del transactivador viral, Tat, que inicia entonces la expresión el gen de β -galactosidasa. El número de células que colorean positivamente con X-gal para la actividad de β -galactosidasa *in situ* es directamente proporcional al de células infectadas.

30 Estas células HeLa-MAGI pueden detectar aislados labadaptados de HIV-1 pero solamente una minoría de aislados principales [Kimpton y Emerman, ver más arriba], y no pueden detectar la mayoría de los aislados SIV [Chackerion *et al.*, "Characterization of a CD4-Expressing Macaque Cell Line that can Detect Virus After A Single Replication Cycle and can be infected by Diverse Simian Immunodeficiency Virus Isolates" *Virology*, 213(2): 6499-6505 (1995)].

35 Además, Harrington and Geballe, "Co-Factor Requirement for Human Immunodeficiency Virus Type 1 into a CD4-Expressing Human Cell Line", *J. Virol.* 67:5939-5947 (1993) describieron una línea celular basada en células U373 que había sido diseñada para expresar CD4 y el mismo constructo LTR- β -galactosidasa. Se ha visto anteriormente que esta línea celular identificada aquí como U373-MAGI no podía estar infectada con ninguna cepa de HIV (M o T-tropic) pero podía hacerse susceptible de infección por fusión con células HeLa [Harrington and Geballe, ver más arriba].

40 Para construir líneas celulares indicadoras que puedan detectar virus trópicos de célula T o macrófagos se transfectó 88C ó 88-2B epítipo-marcado que codifica ADN en células HeLa-MAGI o U373-MAGI por infección por un vector retroviral para generar líneas celulares HeLa-MAGI-88C o U373-MAGI-88C, respectivamente. La expresión de los co-receptores sobre la superficie celular se demostró inmuno-tiñendo células vivas utilizando el anticuerpo anti-FLAG M1 y mediante RT-PCR.

45 Los genes 88C y 88-2B utilizados para construir HeLa-MAGI-88C y U373-MAGI-88C incluían secuencias que codificaban el péptido señal prolactina seguido de un epítipo FLAG tal como se describe en el ejemplo 4. Este gen se insertó en el vector retroviral pBare-Puro [Morgenstern and Land *Nucleic Acids Research*, 18(12):3587-3596 (1990)]. Se obtuvieron stocks de vectores retrovirales de alta valoración pseudotipados con la proteína VSV-G por medio de transfección transitoria según se describe en Bartx *et al.*, *J. Virol.* 70:2324-2331 (1996) y se utilizaron para infectar células HeLa-MAGI y U373-MAGI. Se guardaron en reserva/agruparon (pooled) células resistentes a
55 0,6 μ g/ml puromicina (HeLa) o 1 μ g/ml puromicina (U373). Cada grupo contenía por lo menos 1000 eventos de transducción independientes. Se utilizó un stock de pasada prematura (pasada 2) de las células originales HeLa-MAGI [Kimpton and Emerman, ver más arriba] para crear células HeLa-MAGI-88C.

60 Se realizaron infecciones de las líneas celulares indicadoras con HIV en placas de 12 pocillos con diluciones en serie (10 veces) de μ l de virus en presencia de 30 μ g/ml DEAE-Dextran según lo descrito [Kimpton and Emerman, ver más arriba].

Todas las cepas HIV-1 y SIV_{mac239} se obtuvieron del Programa de Reactivo y Referencia SIDA NIH. Se obtuvieron clones moleculares de HIV-2_{732A} primario [Gao *et al.*, "Genetic Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 2: Evidence for Distinct Sequence Subtypes with Differences in Virus Biology" *J. Virol.* 68(11): 7433-7447 (1992)] y SIVsmPbj1.9 [Dewhurst *et al.*, "Sequence Analysis and Acute Pathogenicity of Molecularly Cloned SIV_{sum}PBj14," *Nature*. 345:636-640 (1990)] B. Hahn (UAB). Todos los demás aislados SIV_{mne} se obtuvieron de Julie Overbaugh (U. Washington, Seattle). Los stocks de provirus clonados se hicieron por transfección transitoria de 293 células. Se

ES 2 255 716 T3

obtuvieron otros stocks virales haciendo pasar virus en células mononucleares de sangre periférica humana o en células CEMx174 (para stocks SIV). Los stocks virales se normalizaron mediante ELISA o p24^{gag} (Coulter Immunology) o p27^{gag} (Coulter Immunology) para HIV-1 y HIV-2/SIV respectivamente, utilizando estándares facilitados por el fabricante.

Las células U373-MAGI-88C y las células U373-MAGI (controles) se infectaron con diluciones limitadoras de una cepa T-tropical de HIV-1 (HIV_{LAL}), una cepa M-tropical (HIV_{YU-2}) y un aislado SIV, SIV_{MAC239}. la infectividad se midió contando el número de células azules por pocillo por volumen de virus (Cuadro 2).

CUADRO 2

Cepa de virus ^a	valor sobre línea celular (IU/ml) ^b	
	U373-MAGI	U373-MAGI-88C
HIV-1 _{LAL}	< 100	< 100
HIV-1 _{YU-2}	< 100	2,2 X 10 ⁶
SIV _{MAC239}	1,2 X 10 ³	4 X 10 ⁵

^a Virus derivados por transfección de clones moleculares en células 293.

^b unidades de infección (IU) por ml: número de células azules por pocillo multiplicado por la dilución de sobrenadante de virus y normalizado a 1 ml de volumen final.

Dos días después de la infección, se fijaron y tiñeron células para actividad de β -galactosidasa con X-gal. Las células MAGI derivadas de U373 se tiñeron durante 120 minutos a 37°C y las células MAGI derivadas de HeLa se tiñeron durante 50 minutos 37°C. El teñido de referencia de células no infectadas nunca fue superior a aprox. 3 células azules por pocillo. Únicamente se contaron las células azul oscuro y los syncytium con núcleos múltiples se contaron como una sola célula infectada. El valor infeccioso es el número de células azules por pocillo multiplicado por la dilución de virus y normalizado a 1 ml. El valor de HIV_{YU-2} en células U373-MAGI-88C fue de 2 x 10⁶. Como contraste, el valor de HIV-1_{LAL} fue inferior a 100 sobre U373-MAGI-88C. Por tanto, la especificidad de una cepa HIV particular para 88C varió en cuatro órdenes de magnitud.

Aunque la infección por SIV_{MAC239} se incrementó a 4 x 10⁵ en U373-MAGI-88C, infectó también claramente células de U373-MAGI (cuadro 2).

Luego, se analizó la aptitud para infectar líneas celulares indicadoras que expresan 88C de una serie de cepas HIV no clonadas primarias y cepas M-tropicales de HIV-1.

Según lo descrito anteriormente, las células HeLa-MA-GI y HeLa-MAGI-88C se infectaron con diluciones limitadoras de diversas cepas HIV. Los dos virus M-tropicales clonados, HIV_{JR-CSF} y HIV_{YU-2} infectaron ambas células de HeLa-MAGI-88C pero no células de HeLa-MAGI, mostrando de este modo que ambas cepas utilizan 88C como co-receptor (cuadro 3, ver nota c). Sin embargo se observó una gran disparidad en la aptitud de cada una de estas dos cepas virales para infectar células HeLa-MAGI-88C, 6,2 x 10⁵ IU/ml para HIV_{YU-2} y 1,2 x 10⁴ para HIV_{JR-CSF}. La infectividad del Sotck de virus (cuadro 3) es el número de unidades infecciosas por partícula física (representado aquí por la cantidad de proteína central viral). Además se observó que la infectividad de estas dos cepas virales clonadas difería en más de 50 veces en stocks virales preparados independientemente.

La variabilidad de la infectividad de aislados virales primarios se examinó luego analizando una colección de 12 stocks diferentes de virus no clonados de 3 clades diferentes (cuadro 3). Se utilizaron tres aislados primarios de clade A, tres aislados de clade E y tres aislados adicionales de clade B de orígenes geográficos diferentes. Con las nueve cepas, se pudieron detectar las cepas primarias de HIV en células HeLa-MAGI-88C pero no en células HeLa-MAGI (cuadro 3). No obstante, la eficacia de la infección varió de 5 unidades infecciosas por ng p24^{gag} hasta más de 100 unidades infecciosas por ng p24^{gag} (cuadro 3). Estos resultados indican que la infectividad absoluta de cepas M-tropicales varía considerablemente y es independiente del clade. Una hipótesis que puede explicar esta discrepancia puede suponer la afinidad del lazo V3 de cada cepa viral para 88C después de fijación CD4 [Trkola *et al.*, *Nature*, 384 (6605): 184-187 (1996); Wu *et al.*, *Nat.*, 384(6605):179-183 (1996)].

ES 2 255 716 T3

CUADRO 3

Cepa de virus ^a	Subtipo viral (origen) ^b	Valor (IU/ml) en HeLa-MAGI-88C	p24 ^{gag} ng/ml	Infectividad ^d
HIV-1 _{YU-2}	B (USA)	6,2 x 10 ⁵	2200	281
HIV-1 _{IR-CSF}	B (USA)	12000	2800	4,2
HIV-1 _{THO-20}	E (Tailandia)	4133	93	44
HIV-1 _{THO-21}	E (Tailandia)	4967	52	96
HIV-1 _{THO-22}	E (Tailandia)	200	15	13
HIV-1 _{US660}	B (USA)	2367	127	19
HIV-1 _{UG031}	A (Uganda)	1633	71	23
HIV-1 _{RW026}	A (Ruanda)	3333	158	21
HIV-1 _{RW026}	A (Ruanda)	739	143	5,2
HIV-1 _{US727}	B (USA)	14.067	289	49
HIV-1 _{US056}	B (USA)	5833	284	21
HIV-1 _{CA1}	B (Francia)	2,8 x 10 ⁵	167	1600

^a HIV-1_{YU-2} y HIV-1_{IR-CSF} fueron derivados por transfección de clones moleculares. Todos los demás fueron testados como sobrenadantes claro de stocks virales no clonados derivados de infección de células mononucleares de sangre periférica heteróloga.

^b Designación de Clade según Myers *et al.*, 1995, para el gen *env*: País de origen se refiere al país de residencia de la persona HIV positiva de la que se obtuvo la sangre para aislamiento viral (Organización Mundial de la Salud Programa de Aislado Viral).

^c unidades infecciosas (IU) por ml es el número de células azules por pocillo multiplicado por la dilución de sobrenadante de virus y normalizado a 1 ml de volumen final. Todos los virus, salvo HIV-1_{LAI} tenían menos de 10 IU/ml al realizar el test sobre células HeLa-MAGI sin 88C. HIV-1_{LAI}, una cepa T trópica tiene un valor de 2,8 x 10⁵ en células HeLa-MAGI con o sin 88C.

^d infectividad es el número de unidades infecciosas por ng P24^{gag} (columna 4 dividido por columna 5).

También se determinó la aptitud de las células HeLa-MAGI-88C para detectar HIV-2 y otras cepas de SIV. Se ha comunicado que HIV-2_{ROD} utiliza fusina como receptor incluso en ausencia de CD4 [Endres *et al.*, Cell 87(4):745-756 (1996)]. HIV-2_{ROD} puede infectar células HeLa-MAGI. No obstante, su infectividad se potencia por lo menos 10 veces en HeLa-MAGI-88C (cuadro 4). Las células HeLa expresan endógenamente fusina. Por consiguiente, el clon molecular de HIV-2_{ROD} es trópico dual y puede utilizar 88C como uno de co-receptores además de CXCR4. De forma similar, una cepa primaria de HIV-2_{7312A} infectó células de HeLa-MAGI-88C y no células de HeLa-MAGI, indicando así que al igual que la cepa primaria de HIV-1 utiliza 88C como receptor.

CUADRO 4

Cepa de virus ^a	Referencia	Valor (IU/ml) en HeLa-MAGI ^b	Valor (IU/ml) sobre HeLa-MAGI	Infectividad en HeLa-MAGI-88C ^c
HIV-2 _{ROD}	(Guyader <i>et al.</i> , 1987)	967	5900	13
HIV-2 _{TM0A}	(Gao <i>et al.</i> , 1994)	< 30	6500	17
SIV _{MAO239}	(Naidu <i>et al.</i> , 1988)	<30	20900	90
SIV _{NANE 18}	(Overbaugh <i>et al.</i> , 1991)	<30	15700	19
SIV _{NANE 170}	(Rudensey <i>et al.</i> , 1995)	<30	10700	27
SIV _{SM PBJ.9}	(Dewhurst <i>et al.</i> , 1990)	<30	776	ND ^d
SIV _{AGM 9063}	(Hirsch <i>et al.</i> , 1995)	<30	50	<1

^a Se testaron directamente después stocks HIV-2, SIV_{SM}Pbj1,9, y SIV_{AGM}9063 mediante transfección de clones moleculares en 293 células. Todas las demás se derivaron de transfección de clones moleculares y se amplificaron ulteriormente en células CEMx174.

^b Unidades infecciosas (IU) por ml: es el número de células azules por pocillo multiplicado por la dilución de sobrenadante de virus y normalizado a 1 ml de volumen final. Todos los virus en este panel fueron también negativos en HeLa-MAGI-88-2B.

^c Infectividad: número de unidades infecciosas (en células que expresan 88C) por ng P27^{gag} determinado por ELISA.

^d ND, no determinado

ES 2 255 716 T3

Ninguna de las cepas SIV testadas infectaron las células HeLa-MAGI (cuadro 4) y ninguna infectó células HeLa-MA-GI que expresa 88-2B. Esto indica que un co-receptor alternativo utilizado por SIV en células U373 no se expresa en células HeLa- y no es 88-2B. Todas las cepas SIV testadas infectaron a las células HeLa-MAGI-88C en cierta medida (cuadro 3) lo que indica que todas las cepas HIV testadas utilizan por lo menos 88C como uno de sus co-receptores.

La clasificación de cepas M-trópicas y T-trópicas de HIV en el pasado se ha relacionado muchas veces con otra designación “non syncytium inducing” (NSI) (no inductor de sincitio) y “syncytium inducing” (SI) (inductor de sincitio), respectivamente. Los ensayos basados en las líneas celulares descritas aquí son sensibles a la formación de sincitio. Las células infectadas pueden formar focos, grandes y pequeños de infección que contienen múltiples núcleos [Kimpton and Emerman, ver más arriba].

Los experimentos utilizando múltiples cepas virales diferentes y U373-MAGI-88C o HeLa-MAGI-88C indican que la designación SI/NSI no es significativa ya que todas las cepas virales formaron sincitios si se encontraba presente el co-receptor correcto. Estos experimentos muestran que la formación de sincitio es más probablemente un marcador de la presencia de un co-receptor adecuado en la célula infectada, más que una indicación de tropismo. La infección de las células HeLa-MAGI-88C con cepas SIV comunicadas en la literatura como cepas no formadoras de sincitio, en particular SIV_{MAC}239, SIV_{MNE}c18 y SIV_{MNE}170 era notable debido a que el tamaño de los sincitios inducidos en la monocapa era mucho mayor que los inducidos por cualquier otra cepa HIV.

Ejemplo 8

Se prepararon anticuerpos monoclonales de ratón que reconocen específicamente 88C. Los anticuerpos se produjeron inmunizando ratones con un péptido correspondiente a los 20 aminoácidos amino terminales de 88C. El péptido se conjugó a Keyhole Limpet Cyanin (KLH), siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce, Imject maleimide activated KLH), se emulsionó en adyuvante completo de Freund y se inyectó en 5 ratones. Se realizaron dos inyecciones adicionales de péptido conjugado en adyuvante incompleto de Freund a intervalos de 3 semanas. Diez después de la inyección final, se comprobó la inmunoreactividad del suero de cada uno de los cinco ratones con los 20 péptidos aminoácidos mediante ELISA. Además, la inmunoreactividad de los sueros se comprobaron contra receptor intacto 88C expresado sobre la superficie de 293 células por selección celular activada por fluorescencia (FACS). El ratón con la mejor actividad anti-88C fue elegido para la fusión de célula de bazo y la producción de anticuerpos monoclonales utilizando métodos de laboratorio standard. Se establecieron cinco líneas celulares monoclonales (227K, 227M, 227N, 227P, 227R) que produjeron anticuerpos que reconocieron el péptido por ELISA y la proteína 88C en 293 células por FACS. Se vio que cada anticuerpo reaccionara solamente con 293 células que expresaban 88C pero no con 293 células que expresaban el receptor MCP estrechamente relacionado (CCCKR-2). Se vio también que cada anticuerpo reconocía 88C expresado de forma transitoria en células COS.

También se generaron anticuerpos policlonales de conejo contra 88C. Se inyectó a dos conejos amino terminal conjugado según se describe anteriormente. Los conejos se inmunizaron mediante cuatro inyecciones adicionales del péptido conjugado amino-terminal. Se sometió a prueba mediante FACS de 293 células que expresan 88C el suero de cada uno de los conejos (2337) y 2470J). Los sueros reconocieron específicamente 88C sobre la superficie de 293 células.

Se comprobó la aptitud de los cinco anticuerpos monoclonales anti-88C para bloquear infección de células por SIV, el virus de inmunodeficiencia simia estrechamente relacionado con HIV [Lehner *et al.*, *Nature Medicine*, 2:767 (1996)]. Unas células T de CD4⁺ de simio, normalmente susceptibles de infección por SIV, se incubaron el clon SVI_{mac} 32HJ5 en presencia de los sobrenadantes de anticuerpo monoclonal anti-88C diluidos 1:5. Se midió la infección por SIV determinando la actividad de transcriptasa inversa (RT) el noveno día utilizando la detección RT y el método de cuantificación (kit de ensayo Quan-T-RT, Amersham, Arlington Heights, IL). Cuatro de los anticuerpos pudieron bloquear la infección por SIV: el anticuerpo 227K bloqueó en un 53%, 227M en 59%, 227N en 47% y 227P en 81%. El anticuerpo 227R no bloqueó la infección por SIV.

Los cinco anticuerpos monoclonales producidos contra péptido humano 88C amino terminal también se testaron para comprobar la reactividad contra 88C de macaco (SEQ ID NO:X) (que tiene diferencias de dos aminoácidos respecto de 88C humano dentro de la región peptídica amino terminal. Las regiones de modificación de 88C humano y 88C de macaco se clonaron en el vector de expresión pcADN3 (Invitrogen). Estos plásmidos de expresión se utilizaron para transfectar células COS utilizando DEAE. Se utilizó el vector vacío como control negativo. Tres días después de la transfección, se cosecharon células y se incubaron con los cinco anticuerpos monoclonales anti-88C y se prepararon para FACS. Los resultados mostraron que cuatro de los cinco anticuerpos (227K, 227M, 227N, 227P) reconocieron 88C de macaco mientras que uno (227R) no lo hizo. Los cinco anticuerpos reconocieron que 88C humano transfectado y ninguno reaccionó con células transfectadas con vector sólo.

Ejemplo 9

Se pueden utilizar métodos adicionales para identificar ligandos y moduladores de los receptores de quimioquinas de la invención.

En una realización, la invención comprende un ensayo directo para ligandos. Se exponen compuestos de prueba marcados de forma detectable a preparaciones de membrana que presentan receptores de quimioquinas en una conformación funcional. Por ejemplo, se transfectaron células HEK-293 o células de cultivo de tejido con un vehículo de expresión que codifica un receptor de quimioquinas. Se realiza entonces una preparación de membrana a partir de las células transfectadas que expresan el receptor de quimioquinas. La preparación de membrana se expone a compuestos de prueba ¹²⁵I-marcados (p. ej. quimioquina) y se incuba en condiciones adecuadas (p. ej. 10 minutos a 37°C). Las membranas con compuestos de prueba ligados, se recogen entonces en un filtro por filtración bajo vacío y se lavan para eliminar los compuestos de prueba no ligados. La radiactividad asociada al compuesto de prueba ligado se cuantifica entonces sometiendo los filtros a espectrofotometría por centelleo de líquido. La especificidad de fijación del compuesto de prueba se puede confirmar repitiendo el ensayo en presencia de cantidades cada vez mayores de compuesto de prueba no marcado y anotando el nivel de competición para la fijación al receptor. Estos ensayos de fijación pueden identificar también moduladores de fijación de receptores de quimioquinas. El ensayo de fijación descrito anteriormente se puede realizar con las siguientes modificaciones. Además de compuesto de prueba marcado de forma detectable, se expone un modulador potencial a la preparación de membrana. Un nivel incrementado de marca asociada a la membrana indica que el modulador potencial es un activador; un nivel reducido de marca asociada a la membrana, que el modulador potencial es un inhibidor de la fijación de receptor de quimioquinas.

En otra realización, la invención comprende ensayos indirectos para identificar ligandos receptores que explotan el acoplamiento de receptores de quimioquinas a proteínas G. Según el estudio de Linder *et al.*, *Sci. Am.*, 267:56-65 (1992), durante la transducción de señal, un receptor activado interactúa con una proteína G, que a su vez activa la proteína G. La proteína G es activada al intercambiar GDP y GTP. La hidrólisis subsiguiente del GTP ligado a la proteína G desactiva la proteína G. Un ensayo sobre la actividad de la proteína G controla por lo tanto la liberación de ³²P de [γ -³²P]-GTP. Por ejemplo, se cultivan en MEM + 10% FCS aprox. 5×10^7 células HEK-293 que albergan plásmidos de la invención. El medio de crecimiento se suplementa con 5 mCi/ml de fosfato sódico [³²P] durante dos horas para rotular de modo uniforme grupo de nucleótidos. Las células se lavan ulteriormente en un tampón isotónico bajo en fosfato. Una parte de las células lavadas se exponen entonces a un compuesto de prueba mientras una segunda parte de células se trata de forma similar, pero sin exponer al compuesto de prueba. Tras un período de incubación (p. ej. 10 minutos) las células se granulan, se lisan y se fraccionan compuestos de nucleótidos utilizando cromatografía de capa fina desarrollada/revelada con 1 M LiCl. Los GTP y los GDP marcados se identifican co-desarrollando estándares conocidos. Los GTP y los GDP marcados se cuantifican entonces con técnicas autorradiográficas standard en el estado de la técnica. Unos niveles relativamente elevados de GDP marcado [³²P] identifican compuestos de prueba como ligandos. Este tipo de ensayo de hidrólisis GTP resulta también útil para la identificación de moduladores de fijación de receptores de quimioquinas. El ensayo antes citado se realiza en presencia de un modulador potencial. Una señal intensificada que resulta de un incremento relativo en hidrólisis GTP que produce GDP marcado ³²P, indica un aumento relativo en la actividad del receptor. La señal intensificada identifica por lo tanto el modulador potencial como activador. Por el contrario, una señal relativa disminuida para GDP marcado ³²P, indicativa de una reducción en la actividad del receptor, identifica el modulador potencial como inhibidor de fijación de receptor de quimioquinas.

Las actividades de moléculas efectores de proteína G (p. ej. adenilil ciclasa, fosfolipasa C, canales iónicos y fosfodiesterasas) son también aptas para el ensayo. Se han descrito con anterioridad ensayos relativos a las actividades de estas moléculas efectores. Por ejemplo la adenilil ciclasa, que cataliza la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) se activa mediante proteínas G. Por consiguiente, la fijación de ligando a un receptor de quimioquinas que activa una proteína G, que a su vez activa la adenilil ciclasa, se puede detectar controlando los niveles de cAMP en una célula huésped recombinante de la invención. Realizando controles adecuados, entendidos en el estado de la técnica, un nivel elevado de cAMP intracelular se puede atribuir a un aumento, inducido por ligando, en la actividad del receptor, identificando de este modo a un ligando. Utilizando nuevamente controles comprendidos en el estado de la técnica, una reducción relativa en la concentración de cAMP identificaría inmediatamente un inhibidor de la actividad del receptor. La concentración de cAMP se puede medir mediante un inmunoensayo enzimático comercial. Por ejemplo, el kit BioTrak proporciona reactivos para un inmunoensayo competitivo (Amersham, Inc., Arlington Heights, IL). Utilizando este kit siguiendo las recomendaciones de los fabricantes, se diseña una reacción que hace intervenir cAMP no marcado competitivo con cAMP conjugado a una peroxidasa de rábano picante. El cAMP no marcado se puede obtener p. ej. de células activadas que expresan los receptores de quimioquinas de la invención. Los dos compuestos compiten para interactuar con un anticuerpo anti-cAMP inmovilizado. Tras la reacción de competición, el conjugado cAMP peroxidasa de rábano picante inmovilizado se cuantifica mediante ensayo enzimático utilizando un sustrato de un solo pot tetrametil bencidina/H₂O₂ con detección de productos de reacción de color que aparecen a 450 nm. Los resultados ofrecen una base para calcular el nivel de cAMP no marcado, utilizando técnicas standard en el estado de la técnica. Además de identificar la fijación de ligandos a receptores de quimioquinas, el ensayo cAMP se puede utilizar también para identificar moduladores de fijación de receptores de quimioquinas. Utilizando células huéspedes recombinantes de la invención, el ensayo se realiza en la forma descrita anteriormente, con la adición de un modulador potencial de la actividad de receptores de quimioquinas. Utilizando controles conocidos en el estado de la técnica, un aumento o disminución relativa en los niveles de cAMP intracelular refleja la activación o inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa. El nivel de actividad de la adenilil ciclasa a su vez, refleja la actividad relativa del receptor de quimioquinas de interés. Un nivel relativamente elevado de actividad de receptores de quimioquinas identifica un activador; un nivel relativamente reducido de la actividad del receptor identifica un inhibidor de la actividad de receptores de quimioquinas.

ES 2 255 716 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido purificado y aislado, que codifica la secuencia de aminoácidos del receptor de quimioquinas 88C que aparece en SEQ ID NO:2.
2. Polinucleótido purificado y aislado, que codifica la secuencia de aminoácidos del receptor de quimioquinas de macaco 88C, que aparece en SEQ ID NO:20.
- 10 3. Polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2, donde el polinucleótido es ADN.
4. Polinucleótido según la reivindicación 3, donde el polinucleótido es ADN genómico, cADN o un ADN total o parcialmente sintetizado químicamente.
- 15 5. Un cADN según la reivindicación 4, que comprende el ADN de SEQ ID NO:1.
6. Un cADN según la reivindicación 4, que comprende el ADN de SEQ ID NO:19.
- 20 7. Un vector ADN biológicamente funcional, que comprende un ADN según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
8. Un vector según la reivindicación 7, donde dicho ADN está operativamente ligado a una secuencia de control de expresión de ADN.
- 25 9. Una célula huésped establemente transformada o transfectada con un ADN según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, de modo que permita la expresión del citado ADN.
10. Método para producir un polipéptido 88C o un polipéptido de macaco 88C que comprende las etapas de cultivar una célula huésped adecuada según la reivindicación 9 en un medio adecuadamente nutritivo y aislar dicho polipéptido de la citada célula o medio.
- 30 11. Un transcripto ARN del polinucleótido de la reivindicación 3 o 4.
12. Un polinucleótido que codifica un polipéptido 88C, donde dicho polipéptido se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas en el polinucleótido de SEQ ID NO:1.
- 35 13. Un polipéptido purificado y aislado, que comprende la secuencia de aminoácidos 88C de receptor de quimioquinas que aparece en SEQ ID NO:2.
- 40 14. Un polinucleótido que codifica un polipéptido 88C de macaco, donde dicho polinucleótido se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas en el polinucleótido de SEQ ID NO:19.
15. Un polipéptido purificado y aislado, que comprende la secuencia de aminoácidos 88C de receptores de quimioquinas de macaco que aparece en SEQ ID NO:20.
- 45 16. Un producto anticuerpo que liga específicamente un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 88C que aparece en SEQ ID NO:2.
17. Un producto anticuerpo que liga específicamente un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 88C de macaco, que aparece en SEQ ID NO:20.
- 50 18. Un hibridoma que produce un producto anticuerpo según la reivindicación 16 o 17.
19. Línea celular de hibridoma 227M.
- 55 20. Línea celular de hibridoma 227P.
21. Línea celular de hibridoma 227R.
- 60 22. Un producto anticuerpo según la reivindicación 16 o 17 que se utiliza en terapia.
23. Un producto anticuerpo según la reivindicación 16 o 17 para el tratamiento de la infección por HIV y de estados patológicos relacionados con HIV.
- 65 24. Utilización de un producto anticuerpo según la reivindicación 16 o 17 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección por HIV y de estados patológicos relacionados con HIV.

ES 2 255 716 T3

25. Método *in vitro* de cribaje de un modulador de infección por HIV que comprende las siguientes etapas:

5 (a) poner en contacto una primera composición que comprende un receptor 88C de mamífero de la SEQ ID NO:2 o 20 o codificado por el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 12 o 14, con una segunda composición que comprende una proteína envoltura de virus de inmunodeficiencia humana (HIV) en presencia y en ausencia de un compuesto;

10 (b) medir la interacción del receptor 88C de mamífero con la proteína envoltura HIV en presencia y en ausencia del compuesto; y

(c) cribaje de un modulador de infección por HIV, donde la interacción reducida o incrementada del receptor 88C de mamífero con el HIV, en presencia del compuesto con respecto a lo que ocurre en ausencia del compuesto, es indicadora de que el compuesto es un modulador de infección por HIV.

15 26. Método según la reivindicación 25, donde el receptor 88C de mamífero comprende 88C humano que tiene la secuencia de aminoácido que aparece en SEQ ID NO:2.

20 27. Método según la reivindicación 25 o 26, donde la primera composición comprende una célula que ha sido modificada recombinantemente para expresar el receptor 88C de mamífero en su superficie.

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, donde la segunda composición comprende un virus de inmunodeficiencia humana.

25 29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, donde la etapa de medida comprende la medida de la infección por HIV de la célula.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 255 716 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: ICOS CORPORATION
22021 20th Avenue S.E.
Bothell, WA 98201
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: MATERIALES RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS Y MÉTODOS
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 20
- (iv) DOMICILIO POSTAL:
- 15 (A) DESTINATARIO: MARSHALL O'TOOLE, GERSTEIN, MURRAY & BORUN
(B) CALLE: 6300 SEARS TOWER, 233 S. WACKER DRIVE
(C) CIUDAD: CHICAGO
(D) ESTADO: ILLINOIS
20 (E) PAIS: EE.UU
(F) CÓDIGO POSTAL 60606
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: DISQUETE
(B) ORDENADOR: IBM PC COMPATIBLE
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) SOFTWARE: PATENTIN RELEASE # 1.0 VERSION # 1,30
- (vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL
- 35 (A) N°. DE SOLICITUD
(B) FECHA DE DEPÓSITO
(C) CLASIFICACION
- (viii) DATOS DEL AGENTE
- 40 (A) NOMBRE: NOLAND, GRETA E.
(B) REFERENCIA/N°. :35.302
- (ix) DATOS DE TELECOMUNICACIÓN:
- 45 (A) TELÉFONO: 312-474-6300
(B) TELEFAX: 312-474-0448
- ### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1
- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 3383 PARES DE BASES
(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO
(C) CADENA: ÚNICA
55 (D) TIPOLOGIA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:cADN
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- 60 (A) NOMBRE/CLAVE; CDS
(B) UBICACIÓN: 55..1110
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 65 (A) NOMBRE/CLAVE: misc_feature
(D) OTRA INFORMACIÓN: SECUENCIAS DE POLINUCLEÓTIDOS 88C Y AMINOÁCIDOS.

ES 2 255 716 T3

```

TTCAATAAGC ATCAAACCTCT TAGTTACTCA TTCAGGGATA GCACTBAGCA AAGCATTGAG      2610
CAAAGGGGGTC CCATATAGGT GAGGGPAGCC TGAAAAACTA AGATGCTGCC TGCCCGAGTC      2670
5 ACACAAGTGT AGGTATCATT TTCTGCATTT AACCGTCAAT AGGCAAGGGG GGGAAAGGGAC      2730
ATATTCATTT GGAARTAAGC TGCCTTGAGC CTFAAAACCC ACAAAGTAC AATTTACCAG      2790
CCTCCGTATT TCAGACTGAA TGGGGGTGGG GGGGGCGCCT TAGGTACTTA TTCCAGATGC      2850
10 CTTCTCCAGA CAAACCAGAA GCAACAGAAA AAATCGTCTC TCCCTCCCTT TGAATGAAT      2910
ATACCCCTTA GTGTTTGGGT ATATTCATTT CAAAGGGAGA GAGAGAGGTT TTTTCTGTT      2970
15 CTTTCTCATA TGATTGTGCA CATACTTGAG ACTGTTTTGA ATTTGGGGGA TGGCTAAAAC      3030
CATCATAGTA CAGGTAAGGT GAGGGAATAG TAAGTGGTGA GAACACTCA GGGAAATGAAG      3090
GTGTCAGAAT AATAAGAGGT GCTACTGACT TTCTCAGCCT CTGAATATGA ACGGTGAGCA      3150
20 TTGEGGCTGT CAGCAGGAAG CAACGAAGGG AAATGTCTTT CCTTTTGCTC TTAAGTTGTG      3210
GAGAGTGCAA CAGTAGCATA GGACCCTACC CTCTGGGCCA AGTCAAGAC ATTCTGACAT      3270
25 CTTAGTATTT GCATATTCTT ATGTATGTGA AAGTTACAAA TTGCTTGAAA GAAATATGC      3330
ATCTAATAAA AAACACCTTC TAAATPAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA      3333

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2

```

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
      (A) LONGITUD: 352 AMINOACIDOS
      (B) TIPO: AMINOÁCIDO
35      (D) TOPOLOGIA: LINEAL
      (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA
      (ix) CARACTERÍSTICA:
40      (A) NOMBRE/CLAVE: misc_feature
      (D) OTRA INFORMACIÓN: /= "SECUENCIA AMINO ÁCIDO 88C"
      (xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 2
45      Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
          1                    5                    10                    15
      Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
          20                    25                    30
50      Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
          35                    40                    45
      Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
          50                    55                    60
      Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
          65                    70                    75                    80
60      Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
          85                    90                    95
      Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
          100                   105                   110
65      Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
          115                   120                   125

```

ES 2 255 716 T3

	Ala	Val	Val	His	Ala	Val	Phe	Ala	Leu	Lys	Ala	Arg	Thr	Val	Thr	Phe
		130					135					140				
5	Gly	Val	Val	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Trp	Val	Val	Ala	Val	Phe	Ala	Ser
	145					150					155					160
	Leu	Pro	Gly	Ile	Ile	Phe	Thr	Arg	Ser	Gln	Lys	Glu	Gly	Leu	His	Tyr
				165						170					175	
10	Thr	Cys	Ser	Ser	His	Phe	Pro	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Gln	Phe	Trp	Lys	Asn
				180					185					190		
	Phe	Gln	Thr	Leu	Lys	Ile	Val	Ile	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	Leu	Leu
15			195					200					205			
	Val	Met	Val	Ile	Cys	Tyr	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Arg	Cys
	210						215					220				
20	Arg	Asn	Glu	Lys	Lys	Arg	His	Arg	Ala	Val	Arg	Leu	Ile	Phe	Thr	Ile
	225					230					235					240
	Met	Ile	Val	Tyr	Phe	Leu	Phe	Trp	Ala	Pro	Tyr	Asn	Ile	Val	Leu	Leu
					245					250					255	
25	Leu	Asn	Thr	Phe	Gln	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Asn	Asn	Cys	Ser	Ser	Ser
				260					265					270		
	Asn	Arg	Leu	Asp	Gln	Ala	Met	Gln	Val	Thr	Glu	Thr	Leu	Gly	Met	Thr
			275					280					285			
30	His	Cys	Cys	Ile	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Ala	Phe	Val	Gly	Glu	Lys	Phe
		290					295					300				
	Arg	Asn	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Phe	Gln	Lys	His	Ile	Ala	Lys	Arg	Phe
35		305				310					315					320
	Cys	Lys	Cys	Cys	Ser	Ile	Phe	Gln	Gln	Glu	Ala	Pro	Glu	Arg	Ala	Ser
					325					330					335	
40	Ser	Val	Tyr	Thr	Arg	Ser	Thr	Gly	Glu	Gln	Glu	Ile	Ser	Val	Gly	Leu
				340					345					350		

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 1915 PARES DE BASE
 - (B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO
 - (C) CADENA: UNICA
 - 50 (D) TOPOLOGIA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
 - 55 (A) NOMBRE/CLAVE; CDS
 - (B) UBICACIÓN: 362..1426
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - 60 (A) NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 - (D) OTRA INFORMACIÓN: /= "POLINUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS 88-2B"
- (xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 3

65

ES 2 255 716 T3

	CTC	ATT	TTT	GTC	ATC	ATG	GCG	GTG	TTT	TTC	ATT	TTC	TGG	ACA	CCC	TAC	1126
	Leu	Ile	Phe	Val	Ile	Met	Ala	Val	Phe	Phe	Ile	Phe	Trp	Thr	Pro	Tyr	
	240					245					250					255	
5	AAT	GTG	GCT	ATC	CTT	CTC	TCT	TCC	TAT	CAA	TCC	ATC	TTA	TTT	GGA	AAT	1174
	Asn	Val	Ala	Ile	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ile	Leu	Phe	Gly	Asn	
					260					265					270		
10	GAC	TGT	GAG	CGG	AGC	AAG	CAT	CTG	GAC	CTG	GTC	ATG	CTG	GTG	ACA	GAG	1222
	Asp	Cys	Glu	Arg	Ser	Lys	His	Leu	Asp	Leu	Val	Met	Leu	Val	Thr	Glu	
				275					280					285			
15	GTG	ATC	GCC	TAC	TCC	CAC	TGC	TGC	ATG	AAC	CCG	GTG	ATC	TAC	GCC	TTT	1270
	Val	Ile	Ala	Tyr	Ser	His	Cys	Cys	Met	Asn	Pro	Val	Ile	Tyr	Ala	Phe	
			290					295					300				
20	GTT	GGA	GAG	AGG	TTC	CGG	AAG	TAC	CTG	CGC	CAC	TTC	TTC	CAC	AGG	CAC	1318
	Val	Gly	Glu	Arg	Phe	Arg	Lys	Tyr	Leu	Arg	His	Phe	Phe	His	Arg	His	
	305					310					315						
25	TTG	CTC	ATG	CAC	CTG	GGC	AGA	TAC	ATC	CCA	TTC	CTT	CCT	AGT	GAG	AAG	1366
	Leu	Leu	Met	His	Leu	Gly	Arg	Tyr	Ile	Pro	Phe	Leu	Pro	Ser	Glu	Lys	
	320				325					330					335		
30	CTG	GAA	AGA	ACC	AGC	TCT	GTC	TCT	CCA	TCC	ACA	GCA	GAG	CCG	GAA	CTC	1414
	Leu	Glu	Arg	Thr	Ser	Ser	Val	Ser	Pro	Ser	Thr	Ala	Glu	Pro	Glu	Leu	
					340				345						350		
35	TCT	ATT	GTG	TTT	TAGGTCAGAT GCAGAAAATT GCCTAAAGAG GAAGGACCAA											1465	
	Ser	Ile	Val	Phe													
				355													
40	GGAGATGTAAG	CAAACACATT	AAGCCTTCCA	CACTCACCTC	TAAACAGTC	CTTCAAACCT	1525										
45	CCASTGCAAC	ACTGAAGCTC	TTGAAGACAC	TGAAATATAC	ACACAGCAGT	AGCAGTAGAT	1585										
50	GCATGTACCC	TAAGGTCATT	ACCACAGGCC	AGGGGCTGGG	CAGCGTACTC	ATCATCAACC	1645										
55	CTAAAAAGCA	GAGCTTTGCT	TCTCTCTCTA	AAATGAGTTA	CCTACATTTT	AATGCACCTG	1705										
60	AATGTTAGAT	AGTTACTATA	TGCCGCTACA	AAAAGGTAAA	ACTTTTTATA	TTTTAFACAT	1765										
65	TAACTTCAGC	CAGCTATTGA	TATAAATAAA	ACATTTTCAC	ACAATACAAT	AAGTTAACTA	1825										
70	TTTTATTTTC	TAATGTGCCT	AGTTCCTTCC	CTGCTTAATG	AAAAGCTTGT	TTTTTCAGTG	1885										
75	TGAATRAATA	ATCGTAAGCA	ACAAAAAAA				1915										

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 4

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 355 AMINOACIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_feature

60 (D) OTRA INFORMACIÓN: /= "SECUENCIA AMINO ÁCIDO 88-2B"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 4

	Met	Thr	Thr	Ser	Leu	Asp	Thr	Val	Glu	Thr	Phe	Gly	Thr	Thr	Ser	Tyr		
65	1				5				10						15			

ES 2 255 716 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "V28degf2"

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 5

GACGATCC TYGAYAGRTA CCTGG CYATY GTCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "V28degf2"

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 6

GCTAAGCTTT TRTAGGGDGT CCAYAAGAGY AA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "88C-r4"

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 7

GATAAGCCTC ACAGCCCTGT G

ES 2 255 716 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 PARES DE BASE

(B) TIPO: ACIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "88c-rlb"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 8

GCTAAGCTTG ATGACTATCT TTAATGTC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 PARES DE BASE

(B) TIPO: ACIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "88-2B-3"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 9

CCCTCTAGAC TAAAACACAA TAGAGAG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 PARES DE BASE

(B) TIPO: ACIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "88-2B-5"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 10

GCTAAGCTTA TCACAGGGAC AAGTGAAATC

ES 2 255 716 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "88-2B-fl"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 11

AGTGCTAGCA GCTCTTCCTG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "88-2b-rl"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 12

CAGCAGCGTT TTGAATGAATTC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 13

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "88C-fl"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:13

TGTGTTTGCT TTAAAGCC

ES 2 255 716 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 14

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "88C-r3"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:14

TAAGCCTCAC AGCCCTG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "CCCKR1 (2) - 5 PRIMER"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:15

CGTAAGCTTA GAGAAGCCGG GATGGGAA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 16

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iv) ANTISENTIDO: SI

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; misc_feature

(D) OTRA INFORMACIÓN: /= "CCCKR-3 PRIMER"

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:16

GCCTCTAGAG TCAGAGACCA GCAGA

ES 2 255 716 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 17

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (GENÓMICO)

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:17

GACAAGCTTC ACAGGGTGGG ACAAGATG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 18

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLÉICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (GENÓMICO)

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:18

GTCTTCTAGAC CACTTGAGTC CGTGTCA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 19

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 1059 PARES DE BASE

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) CADENA: UNICA

(D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE; CDS

(B) UBICACIÓN: 1..1056

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 19

ES 2 255 716 T3

5	ATG GAC TAT CAA GTG TCA AGT CCA ACC TAT GAC ATC GAT TAT TAT ACA Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Thr Tyr Asp Ile Asp Tyr Tyr Thr 1 5 10 15	48
10	TCG GAA CCC TGC CAA AAA ATC AAT GTG AAA CAA ATC GCA GCC CGC CTC Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu 20 25 30	96
15	CTG CCT CCG CTC TAC TCA CTG GTG TTC ATC TTT GGT TTT GTG GGC AAC Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn 35 40 45	144
20	ATA CTG GTC GTC CTC ATC CTG ATA AAC TGC AAA AGG CTG AAA AGC ATG Ile Leu Val Val Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met 50 55 60	192
25	ACT GAC ATC TAC CTG CTC AAT CTG GCC ATC TCT GAC CTG CTT TTC CTT Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu 65 70 75 80	240
30	CTT ACT GTC CCC TTC TGG GCT CAC TAT GCT GCT GCC CAG TGG GAC TTT Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe 85 90 95	288
35	GGA AAT ACA ATG TGT CAA CTC TTG ACA GGG CTC TAT TTT ATA GGC TTC Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe 100 105 110	336
40	TTC TCT GGA ATC TTC TTC ATC ATC CTC CTG ACA ATC GAT AGG TAC CTG Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu 115 120 125	384
45	GCT ATC GTC CAT GCT GTC TTT GCT TTA AAA GGC AGG ACA GTC ACC TTT Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe 130 135 140	432
50	GGG GTG GTG ACA AGT GTG ATC ACT TGG GTG GTG GCT GTG TTT GCC TCT Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser 145 150 155 160	480
55	CTC CCA GGA ATC ATC TTT ACC AGA TCT CAG AGA GAA GGT CTT CAT TAC Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Arg Glu Gly Leu His Tyr 165 170 175	528
60	ACC TGC AGC TCT CAT TTT CCA TAC AGT CAG TAT CAA TTC TGG AAG AAT Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn 180 185 190	576
65	TTT CAG ACA TTA AAG ATG GTC ATC TTG GGG CTG GTC CTG CCG CTG CTT Phe Gln Thr Leu Lys Met Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu 195 200 205	624
70	GTC ATG GTC ATC TGC TAC TCG GGA ATC CTG AAA ACT CTG CTT CCG TGT Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys 210 215 220	672
75	CGA AAC GAG AAG AAG AGG CAC AGG GCT GTG AGG CTT ATC TTC ACC ATC Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile 225 230 235 240	720
80	ATG ATT GTT TAT TTT CTC TTG TGG GCT CCC TAC AAC ATT CTC CTT CTC Met Ile Val Tyr Phe Leu Leu Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu 245 250 255	768
85	CTG AAC ACC TTC CAG GAA TTC TTT GGC CTG AAT AAT TGC AAT AGC TCT Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser 260 265 270	816

ES 2 255 716 T3

	AAC AGG TTG GAC CAA GCC ATG CAG GTG ACA GAG ACT CTT GGG ATG ACA Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr 275 280 285	864
5	CAC TGC TGC ATC AAC CCC ATC ATC TAT GCC TTT GTC GGG GAG AAG TTC His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe 290 295 300	912
10	AGA AAC TAC CTC TTA GTC TTC TTC CAA AAG CAC ATT GCC AAA CGC TTC Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe 305 310 315 320	960
15	TGC AAA TGC TGT TCC ATT TTC CAG CAA GAG GCT CCC GAG CGA GCA AGT Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser 325 330 335	1008
20	TCA GTT TAC ACC CGA TCC ACT GGG GAG CAG GAA ATA TCT GTG GGC TTG Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu 340 345 350	1056
	TGA	1059

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 20

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 352 AMINOACIDOS

(B) TIPO: AMINOACIDO

30 (D) TOPOLOGIA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEINA

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 20

35	Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Thr Tyr Asp Ile Asp Tyr Tyr Thr 1 5 10 15
40	Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu 20 25 30
45	Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn 35 40 45
50	Ile Leu Val Val Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met 50 55 60
55	Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu 65 70 75 80
60	Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe 85 90 95
65	Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe 100 105 110
70	Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu 115 120 125
75	Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe 130 135 140
80	Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser 145 150 155 160
85	Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Arg Glu Gly Leu His Tyr 165 170 175

ES 2 255 716 T3

	Thr	Cys	Ser	Ser	His	Phe	Pro	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Gln	Phe	Trp	Lys	Asn
				190					185					190		
5	Phe	Gln	Thr	Leu	Lys	Met	Val	Ile	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	Leu	Leu
			195					200					205			
	Val	Met	Val	Ile	Cys	Tyr	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Arg	Cys
		210					215					220				
10	Arg	Asn	Glu	Lys	Lys	Arg	His	Arg	Ala	Val	Arg	Leu	Ile	Phe	Thr	Ile
	225					230					235					240
	Met	Ile	Val	Tyr	Phe	Leu	Leu	Trp	Ala	Pro	Tyr	Asn	Ile	Val	Leu	Leu
15					245					250					255	
	Leu	Asn	Thr	Phe	Gln	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Asn	Asn	Cys	Ser	Ser	Ser
				260					265					270		
20	Asn	Arg	Leu	Asp	Gln	Ala	Met	Gln	Val	Thr	Glu	Thr	Leu	Gly	Met	Thr
			275					280					285			
	His	Cys	Cys	Ile	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Ala	Phe	Val	Gly	Glu	Lys	Phe
		290					295					300				
25	Arg	Asn	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Phe	Gln	Lys	His	Ile	Ala	Lys	Arg	Phe
	305					310					315					320
	Cys	Lys	Cys	Cys	Ser	Ile	Phe	Gln	Gln	Glu	Ala	Pro	Glu	Arg	Ala	Ser
					325					330					335	
30	Ser	Val	Tyr	Thr	Arg	Ser	Thr	Gly	Glu	Gln	Glu	Ile	Ser	Val	Gly	Leu
				340					345					350		
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																