



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 487**

51 Int. Cl.:
C07K 14/135 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01987765 .3**
96 Fecha de presentación : **18.10.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1334119**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2003**

54 Título: **Composiciones y métodos para modular la inmunidad e infección de RSV.**

30 Prioridad: **18.10.2000 US 241521 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES**
Office of Technology Transfer, Mail Stop E-67 Suite 1103, Executive Park, Building 4 Atlanta, Georgia 30333, US

72 Inventor/es: **Tripp, Ralph, A.; Jones, Les y Anderson, Larry, J.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 316 487 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para modular la inmunidad e infección de RSV.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en líneas generales a los campos de la inmunología y virología y se refiere más particularmente a métodos y composiciones para modular o prevenir la infección por el virus respiratorio sincitial.

10 **Antecedentes de la invención**

El virus respiratorio sincitial (RSV) se ha reconocido desde hace mucho tiempo como el patógeno viral más importante del tracto respiratorio inferior de los bebés. El mismo se ha visto implicado también en la enfermedad del tracto respiratorio inferior de los adultos, especialmente los ancianos y las personas inmunodeficientes. RSV constituye una prioridad alta para el desarrollo de vacunas, pero los esfuerzos para desarrollar una vacuna han fracasado hasta ahora. El fracaso en el desarrollo de una vacuna ha conducido a un interés renovado en la patogénesis de la enfermedad y los mecanismos inmunitarios que envuelven la protección.

El RSV fue identificado por primera vez como el agente que causa la coriza de los chimpancés en 1956 y fue aislado posteriormente de niños con enfermedad pulmonar. Hoy en día, de acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO), un tercio de los 12,2 millones de fallecimientos anuales en los niños de edad inferior a 5 años son debidos a infecciones agudas del tracto respiratorio inferior. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, y RSV son los patógenos predominantes que causan estas infecciones. De estos patógenos, RSV se ha descrito como la única y más importante causa de infecciones graves del tracto respiratorio en los bebés y los niños pequeños.

Las epidemias de RSV son estacionales, aunque el virus persiste probablemente en el seno de las comunidades. Las tasas de infección máximas aparecen durante las estaciones frías en los climas templados. El virus afecta aproximadamente al 90% de los bebés y los niños pequeños hasta la edad de 2 años. En la mayoría de los casos, la infección aparece en los bebés entre las edades de 6 semanas y 6 meses, con la máxima incidencia en los niños de menos de 3 meses de edad. La infección previa no evita infecciones repetidas, que son comunes en todos los grupos de edad. Por ejemplo, en un estudio realizado en Houston, Texas, las tasas de fusión fueron 68,8 por 100 niños-año en la infancia, y 82,6% niños-año en el segundo año de vida. En un estudio realizado en Suecia, se producían anticuerpos para RSV en el 87% de los niños de 18 meses de edad, y prácticamente en todos los niños de 3 años.

El RSV puede ser también la causa de hasta el 5% de las infecciones del tracto respiratorio inferior adquiridas en la comunidad en los adultos. En los ancianos, la infección por RSV puede ser especialmente grave, conduciendo a la muerte hasta el 10% de los casos hospitalizados.

RSV causa muy frecuentemente una infección del tracto respiratorio superior. Tales infecciones se caracterizan por rinitis, tos, y a veces fiebre. Hasta un tercio de los niños con enfermedad RSV sufren otitis media aguda. Tanto RSV como patógenos bacterianos han sido aislados de los oídos medios de los niños con RSV. RSV causa también crup, pero las manifestaciones graves más comunes de la infección son bronquiolitis y neumonía en los niños. Los signos de implicación del tracto respiratorio superior preceden comúnmente a los del tracto respiratorio inferior (bronquiolitis y neumonía), durante unos cuantos días, y la fiebre, cuando está presente, es usualmente de bajo nivel. La muerte puede producirse en aproximadamente el 1% de los niños hospitalizados con infección por RSV, apareciendo el mayor riesgo de complicaciones graves de la infección en los niños (y los adultos) con función cardíaca, pulmonar, o inmunitaria deficiente. En los adultos, el RSV puede causar la exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica e insuficiencia cardíaca congestiva.

El genoma del RSV comprende una sola cadena de RNA de sentido negativo que tiene una longitud de 15.222 nucleótidos y produce 11 proteínas principales. (Falsey, A.R., y E.E. Walsh, 2000, Respiratory syncytial virus infection in adults, *Clinical Microbiological Reviews*, 13:371-84.) Dos de estas proteínas, las glicoproteínas F (fusión) y G (fijación) son las proteínas principales de la superficie y las más importantes en la inducción de inmunidad protectora. La proteína SH (hidrófoba pequeña), la proteína M (matriz), y la proteína M2 (22 kDa) están asociadas con la envoltura viral, pero no inducen una respuesta protectora inmune. Las proteínas N (proteína principal asociada con la nucleocápsida), P (fosfoproteína), y L (proteína principal de polimerasa) se encuentran asociadas con el RNA del virión. Las dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2, participan supuestamente en la replicación viral, pero no están presentes en los viriones infecciosos.

RSV infecta a lo largo del tracto respiratorio superior (particularmente la nasofaringe) y los ojos. El virus tiene un periodo de incubación de aproximadamente 3 a 5 días. Las infecciones con RSV se producen anualmente en los primeros años de la vida. Por ello, la respuesta inmunológica protectora es incompleta. Se cree que la IgA secretora local contribuye a la resistencia a la infección en el tracto respiratorio superior. La protección del tracto respiratorio inferior está mediada parcialmente por la IgG del suero. Las lipoproteínas F y G de la superficie son las únicas proteínas de RSV que se sabe inducen anticuerpos protectores neutralizantes. La glicoproteína G parece jugar un papel tanto en la inducción de la inmunidad protectora como en la patogénesis de la enfermedad. Por ejemplo, estudios realizados en ratones han demostrado que la glicoproteína G ceba una respuesta de las células T Th2 CD4⁺, caracterizada por la

producción de IL-4, IL-5, IL-13 y eosinofilia pulmonar. El reclutamiento y la activación de eosinófilos son promovidos por varios factores, tales como IL-4 e IL-5. La eosinofilia pulmonar está asociada con patología pulmonar importante a grave y está mediada supuestamente, en parte, por células Th2 CD4⁺ inducidas por la glicoproteína G del RSV. La expresión de la glicoproteína G durante la infección aguda en los ratones se ha asociado con una respuesta inmune innata modificada caracterizada por la expresión reducida de citoquinas Th1 (v.g., IL-2 e interferón gamma), expresión alterada de mRNA de quimioquinas (v.g., MIP-1 alfa, MIP-1 beta, MIP-2, IP-10, MCF-1), y tráfico reducido de células NK al pulmón infectado.

Las cepas de RSV humanas se han clasificado en dos grupos principales, A y B. Se ha demostrado que la glicoproteína G es la más divergente entre las proteínas del RSV. Se cree que la variabilidad de la glicoproteína G del RSV entre y dentro de los dos grupos de RSV es importante en relación con la capacidad del RSV para causar brotes anuales de la enfermedad. La glicoproteína G comprende 289-299 aminoácidos (dependiendo de la cepa del RSV), y tiene una estructura de tallo intracelular, transmembranal, y altamente glicosilada de 90 kDa, así como dominios de fijación de heparina. La glicoproteína existe en formas secretada y fijada a la membrana.

La inmunidad celular parece jugar un papel prominente en la recuperación de la infección por RSV. Así, los individuos con inmunodeficiencia celular (heredada o adquirida) sufren infecciones por RSV más graves y de mayor duración que los individuos normales. Después de la infección por RSV, los niños normales presentan una proliferación de linfocitos específica de RSV, lo que sugiere la estimulación de las células T. Se ha descrito también una respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos de RSV y es probablemente importante para la recuperación de la enfermedad. Están implicados tanto subconjuntos de linfocitos T CD4 como CD8 en la terminación de la replicación del RSV durante la infección. La misma respuesta de linfocitos T citotóxicos puede exacerbar o aumentar también la enfermedad clínica asociada con la infección por RSV. Esta hipótesis se ha utilizado para explicar la enfermedad más grave observada con la vacuna del RSV desactivada con formalina testada a principios de los años 1960.

Actualmente no se dispone de métodos eficaces de tratamiento de la infección por RSV. La infección del tracto respiratorio inferior con RSV es una condición autolimitante en la mayoría de los casos. No existen directrices o criterios definitivos en cuanto al modo de tratar o al momento de ingresar o rechazar los bebés y los niños que padecen la enfermedad. La hipoxia, que puede presentarse en asociación con la infección por RSV, puede tratarse con oxígeno por medio de una cánula nasal. La ventilación mecánica para los niños con insuficiencia respiratoria, choque, o apnea recurrente puede disminuir la mortalidad. Algunos médicos prescriben esteroides. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la terapia con esteroides no afecta a la evolución clínica de los bebés y los niños ingresados en el hospital con bronquiolititis. Así pues, los corticosteroides, solos o en combinación con broncodilatadores, pueden ser inútiles en el tratamiento de la bronquiolititis en pacientes no ventilados sanos en otros aspectos. Se han utilizado también esteroides en los bebés y los niños con enfermedades cardiopulmonares subyacentes, tales como disfasia broncopulmonar y asma.

La ribavirina, un análogo de guanosina con actividad antiviral, ha sido utilizada para tratar bebés y niños con bronquiolititis por RSV desde mediados de los años 1980, pero muchos estudios de evaluación de su utilización han presentado resultados conflictivos. En la mayoría de los centros, el uso de ribavirina está restringido actualmente a los pacientes con inmunodeficiencia y a aquellos que están gravemente enfermos.

La gravedad de la bronquiolititis por RSV se ha asociado a concentraciones bajas de retinol en suero, pero pruebas realizadas en niños hospitalizados con bronquiolititis por RSV han demostrado que el suplemento vitamina A no proporciona efecto beneficioso alguno. Pruebas terapéuticas de 1500 mg/kg de inmunoglobulina de RSV intravenosa o 100 mg/kg de inmunoglobulina inhalada para la infección por RSV en el tracto respiratorio inferior no han logrado tampoco demostrar efectos beneficiosos sustanciales.

En los países desarrollados, el tratamiento de la infección del tracto respiratorio inferior por RSV se limita generalmente a terapia sintomática. La terapia antiviral está limitada usualmente a situaciones que constituyen una amenaza para la vida debido a su alto coste y a la falta de consenso en cuanto a su eficacia. En los países en desarrollo, la principal terapia es el oxígeno (cuando está disponible), y la única vía para reducir la mortalidad es mediante prevención.

La vacunación contra el RSV es, por consiguiente, el método preferido para reducir la morbilidad relacionada con el RSV. En los años 1960, se encontró que una vacuna de RSV testada desactivada con formalina, era inmunógena, con tasas elevadas de seroconversión. Sin embargo, se encontró que los niños vacunados carecían de protección contra la infección por RSV subsiguiente. Adicionalmente, los bebés naíf de RSV que recibían la vacuna de RSV desactivada con formalina, y que se infectaron naturalmente con RSV más tarde, desarrollaron una enfermedad más grave que un grupo de control inmunizado con una vacuna trivalente contra la parainfluenza. Esta experiencia ha exigido un enfoque muy cuidadoso para testar vacunas de virus no vivos en los bebés naíf de RSV.

Sin embargo, la vacuna de RSV desactivada con formalina no logró causar una enfermedad más leve en los niños de mayor edad infectados previamente. Además, estudios realizados en ratones BALB/c sugieren que la infección previa con virus vivos predispone a un individuo para una respuesta inmunitaria segura para vacunas no vivas. Por consiguiente, se están testando vacunas no vivas en niños de mayor edad y en adultos infectados previamente con RSV. Las vacunas no vivas testadas hasta ahora parecen ser seguras en los niños de mayor edad y los adultos, pero se desconoce su eficacia. Es de esperar que, con nuevas herramientas inmunológicas, los investigadores puedan llegar a

entender la patogénesis de la enfermedad mejorada y utilizar esta información para diseñar vacunas de virus no vivos que sean seguras en el individuo naïf frente al RSV.

Los esfuerzos hacia el desarrollo de una vacuna para bebés y niños pequeños están enfocados actualmente en vacunas de virus vivos. Cierta número de vacunas candidato han sido testadas en humanos, pero ninguna de ellas ha demostrado ser suficientemente segura para poder considerarse como una vacuna viable para administración a niños pequeños.

Por tanto, existe necesidad de vacunas seguras y eficaces contra RSV, especialmente para bebés y niños. Existe también necesidad de agentes terapéuticos y métodos para tratamiento de la infección por RSV en todas las edades y en individuos inmunodeficientes. Existe asimismo necesidad de métodos científicos para caracterizar la respuesta protectora inmune para RSV de tal modo que pueda estudiarse la patogénesis de la enfermedad, y pueda facilitarse el cribado de agentes terapéuticos y vacunas. La presente invención resuelve los inconvenientes previos en la técnica proporcionando métodos y composiciones eficaces para modular o prevenir la infección por RSV.

Sumario de la invención

Se proporcionan composiciones para el tratamiento o la prevención de la enfermedad RSV por modulación de la infección por RSV y la inmunidad. En particular, se identifican en esta memoria secuencias de aminoácidos en la glicoproteína G del RSV que son esenciales para causar la infección por RSV y la enfermedad. Estas secuencias de aminoácidos contienen un motivo de quimioquina, definido como C-X-X-X-C (o CX3C), que es a la vez biológicamente activo (es decir, actúa como una quimioquina CX3C) y participa en la fijación del virus a las células susceptibles y la infección de las mismas. En este motivo, C es un residuo cisteína y X es cualquier residuo de aminoácido. Cada uno de los tres residuos X puede ser un aminoácido diferente o el mismo aminoácido, pero no cisteína. El motivo quimioquina se encuentra en las posiciones de los aminoácidos 182-186 de la glicoproteína G nativa del RSV. El motivo CX3C se fija al receptor de CX3C (CX3CR1) en la superficie de las células humanas y animales.

Las composiciones proporcionadas en esta memoria utilizan el conocimiento recién adquirido de la importancia biológica y estructural del motivo CX3C para infectar las células, modificar la inmunidad, y causar la enfermedad, a fin de prevenir o inhibir la enfermedad del RSV. Básicamente, la inmunidad y el tratamiento se consiguen por 1) alteración del motivo CX3C en un virus de tipo salvaje de tal modo que el virus no puede utilizar el mismo para fijarse a las células e infectar éstas, o modular la respuesta del hospedador a la infección viral, y utilizar el virus que contiene el motivo alterado como una vacuna de virus vivo; 2) mejora de la inducción de anticuerpos que bloquean la fijación de la glicoproteína G del RSV a CX3CR1 o la actividad biológica asociada con la fijación de la glicoproteína G del RSV a CX3CR1 por una vacuna de virus no vivo; 3) bloqueo de la actividad del motivo CX3C por fijación de fármacos, anticuerpos, péptidos, polipéptidos u otras moléculas bloqueantes al motivo de un virus infectante; 4) desactivación del sitio CX3C por fijación de fármacos, anticuerpos, péptidos, polipéptidos u otras moléculas bloqueantes proximales al motivo CX3C de un virus infectante (preferiblemente la fijación de las moléculas bloqueantes proximales al motivo ocurre en regiones que alteran la estructura secundaria del motivo, cambiando con ello la actividad biológica, o que previenen estéricamente la fijación de la glicoproteína G del RSV a CX3CR1 o la actividad biológica asociada con la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 por una vacuna de virus no vivo); y/o 5) utilización de ensayos que detectan el bloqueo de la fijación de la glicoproteína G de RSV al receptor de CX3C (CX3CR1) o que detectan el bloqueo de la actividad iniciada por la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 *in vitro* para identificar fármacos, anticuerpos, péptidos, polipéptidos u otras moléculas bloqueantes, anticuerpos que pueden utilizarse como antivirales del RSV o vacunas que pueden ser seguras y eficaces para prevenir la enfermedad RSV.

En la presente invención, se producen vacunas RSV vivas por modificación del motivo CX3C de la glicoproteína G del RSV haciéndolo no funcional para la fijación viral e infección de las células hospedadoras. Las vacunas RSV preferidas se modifican por ingeniería genética causando mutaciones de delección o inserción en el motivo CX3C en un virus de RSV vivo.

Otro aspecto de esta invención proporciona vacunas de RSV vivas o no vivas que se producen, o vacunas de RSV vivas o no vivas existentes mejoradas, por modificación del motivo CX3C de la glicoproteína G de RSV o regiones proximales del mismo de tal manera que, cuando se administran las vacunas a un humano o animal, se producen títulos mayores de anticuerpos que bloquean la función biológica del motivo CX3C en las glicoproteínas G de virus RSV posteriormente infectantes.

En otro aspecto de esta invención, se proporcionan vacunas de RSV vivas y no vivas que, cuando se administran a un humano o animal, inducen la producción de anticuerpos que bloquean la función biológica del motivo CX3C en la glicoproteína G de virus RSV infectantes ulteriormente. De modo alternativo, la vacuna comprende uno o más péptidos o polipéptidos de la glicoproteína G de cepas RSV diferentes que tienen la propiedad que antecede.

Se proporciona también un método para mejorar o identificar *in vitro* fármacos, anticuerpos, péptidos, polipéptidos u otras moléculas bloqueantes que pueden utilizarse para tratar la enfermedad del RSV y/o como vacunas para prevenir la enfermedad del RSV.

La inmunización se consigue por administración a un humano o animal de una cantidad inmunógena de una o más de las composiciones de vacuna de esta invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El tratamiento del

RSV se proporciona por administración de una cantidad eficaz de una molécula bloqueante de CX3C en un vehículo farmacéuticamente aceptable a un humano o animal infectado por el RSV. Por “farmacéuticamente aceptable” se entiende un material que no es indeseable biológicamente o por cualquier otro motivo, es decir, que el material puede administrarse a un individuo junto con el agente seleccionado sin causar efectos biológicos indeseables de ningún tipo o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. Una molécula bloqueante se define en esta memoria como un fármaco, compuesto químico, anticuerpo, péptido, polipéptido u otra molécula que bloquea la actividad biológica del motivo CX3C, o bloquea la fijación de la glicoproteína G de CX3C al receptor de la glicoproteína G de CX3C, que puede ser el receptor CX3CR1.

Anticuerpos monoclonales que son específicos para el motivo CX3C de la glicoproteína G del RSV o para el receptor al que se fija el motivo CX3C (particularmente el receptor CX3CR1), o que puede demostrarse que bloquean la fijación o la actividad asociada con la fijación al receptor CX3CR1 de muchas o la totalidad de las cepas RSV son útiles para el tratamiento de pacientes infectados con RSV. Estos anticuerpos se utilizan también profilácticamente para prevenir a los pacientes que se hallan en riesgo de adquirir el RSV.

Los anticuerpos policlonales, suero concentrados o preparaciones de inmunoglobulina que contienen títulos elevados de anticuerpos específicos para el motivo CX3C de la glicoproteína G de RSV o para el receptor al que se fija el motivo CX3C o que puede demostrarse bloquean la fijación o la actividad asociada con la fijación al receptor CX3CR1 de muchas o todas las cepas de RSV, son también útiles para el tratamiento o la prevención de la enfermedad RSV.

La administración de anticuerpos, péptidos, polipéptidos o moléculas afines que bloquean los efectos semejantes a quimioquinas del motivo CX3C de la glicoproteína G sobre la migración o activación celular es útil también para el tratamiento de la infección por RSV.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar vacunas y otras composiciones farmacéuticas para la prevención, reducción y tratamiento de la enfermedad RSV, en donde las composiciones interfieren con la actividad biológica del motivo CX3C de la glicoproteína G del RSV o la fijación del motivo a su receptor en las células hospedadoras.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición para el tratamiento o prevención de la infección por RSV.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición para tratamiento o la prevención de la bronquiolitis, una infección del tracto respiratorio superior o una infección del tracto respiratorio inferior causada por infección con RSV.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una vacuna segura y eficaz contra RSV, especialmente adecuada para uso en bebés y ancianos y otros grupos de riesgo frente a la enfermedad del RSV.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar ensayos *in vitro* que pueden utilizarse para cribar vacunas o antivirales candidato a fin de identificar aquéllos que sean probablemente seguros y eficaces en el tratamiento y/o la prevención de la infección por RSV.

Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes después de una revisión de la descripción detallada que sigue de las realizaciones descritas y las reivindicaciones del apéndice.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-L muestran la fijación de glicoproteína G (G), glicoproteína G recombinante de polihistidina (G_{HIS}) y Fkn a células 293-CX3CR1 y 293 en presencia y ausencia de los péptidos de glicoproteína G RT32, RT33, RT34, $\bullet+1$ y $\bullet-1$ y anticuerpos monoclonales anti-glicoproteína G (131-2G) y anti-glicoproteína F (131-2A), como se determina por citometría de flujo. Se muestran perfiles de histogramas para la fijación de la glicoproteína G 10 nM, G_{HIS} o Fkn a las células CX3CR1-293 y 293. Los histogramas oscuros representan células teñidas con un anticuerpo de control. Los histogramas claros representan células teñidas con un cóctel biotinilado anti-glicoproteína G (130-2G, 131-2G) o anticuerpo anti-Fkn (51637.11). Se muestra el porcentaje de tinción positiva de Fkn o glicoproteína G para un experimento representativo: A) 88% de tinción de Fkn de células CX3CR1-293; B) 8% de tinción de Fkn de células 293; C) 84% de tinción de glicoproteína G de células CX3CR1-293; D) 16% de tinción de glicoproteína G de células 293; E) 72% de tinción de glicoproteína G en presencia del péptido RT32 y 74% de tinción en presencia del péptido RT34 de células CX3CR1-293; F) 48% de tinción de glicoproteína G en presencia del péptido RT33 de células CX3CR1-293; G) 65% de tinción de glicoproteína G en presencia del péptido $\bullet+1$; H) 73% de tinción de glicoproteína G en presencia del péptido $\bullet-1$; I) 68% de tinción de G_{HIS} de células CX3CR1-293; J) 12% de tinción de G_{HIS} de células 293; K) 10% de tinción de G_{HIS} de células CX3CR1-293 en presencia de anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G (131-2G); y L) 60% de tinción de G_{HIS} de células CX3CR1-293 en presencia de anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína F (131-2A).

Las Figuras 2A-B muestran células 293-CX3CR1 y 293 que se incubaron con ^{125}I -fractalquino 1 nM que comprende el dominio de 76 aminoácidos de la quimioquina CX3C, en presencia de cantidades crecientes de Fkn o glicoproteína G sin marcar durante 2 h a 37°C en presencia de azida. Se determinó la radiactividad asociada a las células: A) los

datos son el valor medio \pm SE de medidas triplicadas ajustadas a las células 293 representativas de tres experimentos separados; B) análisis Scatchard de los datos de fijación. En los tres experimentos, los valores medios \pm SD de los parámetros de fijación eran: K_d (Fkn) = $5,8 \pm 1,4$ nM y K_d (glicoproteína G) = $2,1 \pm 1,6$ nM. La fijación inespecífica de 125 I-fractalquino a las células 293 se define como la cantidad total de radiactividad asociada a las células en presencia de un exceso de 1000 veces de Fkn sin marcar, y era $\leq 5\%$ de la fijación total a las concentraciones examinadas.

La Figura 3 muestra los resultados de los experimentos de quimiotaxis. El índice de quimiotaxis se determinó a partir del aumento expresado en número de veces de la migración de las células leucocitarias de bazo murino hacia el quimioatrayente (v.g., Fkn o glicoproteína G) respecto a la migración de los leucocitos hacia un control de medio solo, utilizando cámaras Boyden modificadas. Se añadieron Fkn, glicoproteína G, glicoproteína G recombinante marcada con polihistidina (GHIS), anticuerpo monoclonal anti-CX3CR1 (2A9-1), suero normal de conejo, suero de conejo anti-CX3CR1, anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G (131-2G) o anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína F (131-2A) a la cámara superior para examinar el antagonismo de la migración celular hacia el quimioatrayente en la cámara inferior.

Las Figuras 4A-E muestran la caracterización de las preparaciones de glicoproteína G: A) una SDS-PAGE teñida con plata y no reducida de la preparación de glicoproteína G de un lisado de células Vero infectadas con RSV purificado de lectina de germen de trigo (Pista 1); (B), (C) análisis por transferencia Western de las fracciones secuenciales recogidas durante el procedimiento de purificación y sondadas con anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G (131-2A) o anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína F (131-2A): Pista 1 = lisado de células Vero infectadas con RSV sin purificar, Pista 2 = material eluido de la columna de lectina de germen de trigo, Pista 3 = flujo directo de la columna Q, Pista 4 = material eluido de la columna Q con NaCl 100 mM, Pista 5 = material eluido de la columna Q con NaCl 200 mM, Pista 6 = material eluido de la columna Q con NaCl 300 mM; D) una SDS-PAGE teñida con plata y no reducida de la preparación de glicoproteína G recombinante marcada con polihistidina (G_{HIS}): Pista 1 = material eluido G_{HIS} de la columna de afinidad Ni-NTA concentrado; E) un análisis por transferencia Western de la preparación G_{HIS} : Pista 1 = preparación de glicoproteína G de células Vero infectadas con RSV purificado con lectina de germen de trigo, Pista 2 = lisado G_{HIS} de células Vero transfectadas establemente con pcDNA codificante de G_{HIS} , Pista 3 = flujo directo de la columna de afinidad NI-NTA, Pista 4 = G_{HIS} purificada en el material eluido de la columna de afinidad NI-NTA. MW = marcadores de peso molecular. Para el análisis SDS-PAGE teñido con plata y no reducido, una flecha indica la glicoproteína G predicha.

La figura 5A es un gráfico de barras que muestra la quimiotaxis de los leucocitos hacia la glicoproteína G o el fractalquino (Fkn) en presencia o ausencia de anticuerpo anti-CX3CR1 o suero normal de conejo. El índice de quimiotaxis determinado a partir del aumento expresado en número de veces de la migración de los leucocitos de murino hacia el quimioatrayente (v.g., Fkn o glicoproteína G) sobre la migración de los leucocitos hacia el control de medio solo utilizando cámaras Boyden modificadas. Se añadieron Fkn, glicoproteína G, anticuerpo anti-CX3CR1 ($10 \mu\text{g}$) o suero normal de conejo ($10 \mu\text{g}$) a la cámara superior para examinar el antagonismo de la migración celular hacia el quimioatrayente en la cámara inferior. La Figura 5B es un gráfico de barras que muestra el tráfico de células hacia el pulmón de ratones naïf BALB/c tratados por vía intranasal con glicoproteína G, fractalquino o los péptidos RT32, RT33 o RT34 de glicoproteína G. Se fijaron células BAL y se tiñeron con H&E. Se determinaron subconjuntos de células como porcentaje de las células BAL totales contado a partir de > 200 células/portaobjetos contando dos portaobjetos para cada experimento. El tipo porcentual de células representa la mediana \pm SE de tres experimentos separados. * indica diferencia significativa comparada con el medio de cultivo de tejido solo ($p < 0,05$). Los ratones BALB/c naïf se trataron por vía i.n. con glicoproteína G $1 \mu\text{M}$ o fractalquino o con péptidos de glicoproteína G $1 \mu\text{M}$. Las células BAL se recogieron dos días después del tratamiento para análisis.

La Figura 6 es una representación generada por ordenador de un gel electroforético que muestra el Análisis de Protección de RNA (RPA) de mRNA de células Vero de células infectadas con RSV/A2 (pista A) y células CX3CR1-293 (Pista B). El mRNA se sondó respecto al receptor-2 de la quimioquina CXC (CXCR2), el receptor-4 de la quimioquina CXC (CXCR4), CX3CR1 y los genes propios L32 y GAPDH.

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente haciendo referencia a la descripción detallada que sigue de las realizaciones preferidas de la invención y el ejemplo que se incluye en esta memoria.

Antes de exponer y describir los presentes compuestos y métodos, debe entenderse que esta invención no se limita a proteínas específicas, métodos específicos, o ácidos nucleicos específicos, dado que los mismos pueden variar, por supuesto. Debe entenderse también que la terminología utilizada en esta memoria se utiliza para el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no debe considerarse como limitante.

Debe indicarse que, como se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los plurales correspondientes a no ser que el contexto indique claramente otra cosa.

En esta memoria se describen composiciones para el tratamiento o la prevención de la enfermedad RSV por modulación de la infección RSV y la inmunidad frente al mismo. Se identifican secuencias de aminoácidos en la glicoproteína G de RSV, a la que se hace referencia en esta memoria como el motivo de quimioquina C-X-X-X-C (o CX3C),

ES 2 316 487 T3

que son esenciales para causar la infección y enfermedad RSV. El motivo de quimioquina CX3C está localizado en las posiciones de los aminoácidos 182-186 en una región conservada y rica en prolina de la molécula de la glicoproteína G de RSV. La administración de una o más composiciones que interfieren directa o indirectamente con o que bloquean la actividad normal o la fijación de este motivo es útil para inmunización contra el tratamiento de la enfermedad RSV y es útil también para estudiar la patología de RSV orientada al desarrollo y cribado de composiciones terapéuticas y estrategias de tratamiento.

Las quimioquinas median el tráfico de leucocitos en las respuestas inflamatorias y se producen a menudo en condiciones patológicas tales como infección viral. Las quimioquinas se definen por tener cuatro cisteínas conservadas y se dividen en subfamilias basadas en el motivo formado por las dos primeras cisteínas. Por ejemplo, las quimioquinas CXC tienen las dos primeras cisteínas separadas por un aminoácido, mientras que las dos primeras cisteínas son adyacentes en el caso de las quimioquinas CC. Las quimioquinas C forman un tercer puente disulfuro además de los dos puentes disulfuro usuales, y las quimioquinas CX3C tienen las dos primeras cisteínas separadas por tres aminoácidos.

El motivo quimioquina de la glicoproteína G del RSV localizado en las posiciones de los aminoácidos 182-186 es un motivo C-X-X-X-C (o CX3C). El motivo es biológicamente activo (es decir, actúa como una quimioquina CX3C) y participa en la fijación del virus a las células susceptibles, y la infección de las mismas. En este motivo, C es un residuo cisteína y X es cualquier residuo de aminoácido. Cada uno de los 3 residuos X puede ser un aminoácido diferente o el mismo aminoácido, pero no cisteína. El motivo CX3C se fija al receptor de CX3C (CX3CR1) en la superficie de las células humanas y animales, facilitando con ello la infección de las células por el RSV.

Las composiciones descritas en esta memoria proporcionan inmunidad contra y tratamiento de la infección por RSV de varias maneras por interferir directa o indirectamente con la función o la estructura normales del motivo CX3C. Las composiciones incluyen virus RSV vivos o no vivos, o fragmentos de los mismos, en los cuales el motivo CX3C ha sido alterado, e incluyen también moléculas bloqueantes que inhiben la función del motivo CX3C.

Por ejemplo, se producen vacunas de virus RSV vivos por alteración del motivo CX3C en un virus de tipo salvaje de tal manera que el virus no puede utilizarlo para fijarse a e infectar las células o modular la respuesta del hospedador a la infección viral. El virus que contiene el motivo alterado se administra como una vacuna de virus vivo para inducir una respuesta inmune que confiere protección subsiguiente contra la infección por RSV.

Fármacos, anticuerpos, péptidos, polipéptidos u otras moléculas bloqueantes que se fijan a y bloquean con ello la actividad normal del motivo CX3C de la glicoproteína G de un virus RSV infectante se administran para tratar la infección por RSV. El sitio CX3C se desactiva también por fijación de fármacos, anticuerpos, péptidos, polipéptidos u otras moléculas bloqueantes proximales al motivo CX3C de un virus RSV infectante de tal manera que la actividad normal del motivo se inhibe o se pone en compromiso. Los anticuerpos preferidos no reconocen específicamente el dominio CX3C, limitando así la posibilidad de inducir autoinmunidad a quimioquinas endógenas estructuralmente similares, tales como fractalquino.

Las actividades biológicas normales del virus RSV vivo de tipo salvaje que son inhibidas, terminadas o moduladas por las composiciones y métodos proporcionados en esta memoria incluyen, pero sin carácter limitante, quimiotaxis, migración celular y adherencia del virus a las células.

Vacunas de RSV

En la presente invención, se producen vacunas vivas de RSV por modificación del motivo CX3C de la glicoproteína G del RSV para hacerlo no funcional para la fijación viral e infección de las células hospedadoras. Las vacunas RSV preferidas se modifican por ingeniería genética introduciendo o seleccionando mutaciones de delección, inserción y/o sustitución en la secuencia de aminoácidos del motivo CX3C en un virus RSV vivo. Las vacunas especialmente preferidas contienen variaciones de la secuencia nativa de aminoácidos (los aminoácidos 182-186 del genoma de la glicoproteína G del RSV, tales como CWAIC) que añaden un residuo adicional (tales como CWAIAC) o delecionan un residuo (tales como CWAC). Alternativamente, el motivo CX3C se altera para deleccionar uno o ambos residuos C o por aumento o disminución del número de residuos X entre los residuos C.

Se proporcionan también por esta invención vacunas de RSV vivas que se producen, o vacunas de RSV vivas existentes que se mejoran, por modificación del motivo CX3C de la glicoproteína G de RSV o residuos de aminoácidos proximales u otras partes de la glicoproteína G de tal modo que, cuando se administran a un humano o animal, se producen títulos más altos de anticuerpos que bloquean la función biológica del motivo CX3C sobre las glicoproteínas G de virus RSV posteriormente infectantes. "Título más alto" significa un título de anticuerpos que es mayor que un título de anticuerpos detectado previamente después de la inmunización con vacunas de RSV vivos existentes.

Es otro aspecto de la invención, se proporcionan vacunas de RSV vivos y no vivos que, cuando se administran a un humano o animal, inducen la producción de anticuerpos que bloquean la función biológica del motivo CX3C en la glicoproteína G de virus RSV posteriormente infectantes. Por ejemplo, la vacuna puede comprender uno o más fragmentos de glicoproteína G, péptidos o polipéptidos de glicoproteína G de diferentes cepas de RSV, glicoproteínas G de vacunas de virus no vivos, o glicoproteínas G de una vacuna de virus vivo, tal como un clon infeccioso de RSV que, cuando se administra a un humano o animal, inducen la producción de anticuerpos que inhiben la función

ES 2 316 487 T3

biológica de CX3C, tal como la fijación al receptor de CX3C o la formación de calvas de RSV en monocapas de células susceptibles o migración de leucocitos inducida por la glicoproteína G. El clon infeccioso de RSV está disponible de varias fuentes tales como los National Institutes of Health (Dr. Brian Murphy) o de Aviron Corporation (Mountain View, California). Alternativamente, la vacuna puede comprender uno o más péptidos o polipéptidos de glicoproteína G de cepas de RSV diferentes que tienen la propiedad indicada anteriormente.

La inmunización se consigue por administración a un humano o animal de una cantidad inmunógena de una o más de las composiciones de vacuna de esta invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 *Moléculas Bloqueantes de RSV*

El tratamiento del RSV se proporciona por administración, a un individuo humano o animal infectado por RSV, de una cantidad eficaz de una molécula bloqueante de CX3C en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una molécula bloqueante se define en esta memoria como un fármaco, compuesto químico, anticuerpo, péptido, polipéptido u otra molécula que bloquea la actividad biológica del motivo CX3C o bloquea la fijación de la glicoproteína G de CX3C al receptor de la glicoproteína G de CX3C, que es muy preferiblemente el receptor CX3CR1.

Los anticuerpos monoclonales, específicos para el motivo CX3C de la glicoproteína G de RSV o para el receptor al cual se fija el motivo CX3C (particularmente el receptor CX3CR1) o para otras partes de la glicoproteína G de RSV tales que bloquean la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 o la actividad asociada con la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 para todas las cepas RSV, son útiles, en asociación con anticuerpos monoclonales neutralizantes, para tratar pacientes que sufren la enfermedad o para uso profiláctico a fin de prevenir la infección por RSV en individuos que se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad RSV.

Los anticuerpos policlonales, suero concentrados o preparaciones de inmunoglobulina que contienen títulos altos de anticuerpos específicos para el motivo CX3C de glicoproteína G de RSV o para el receptor al cual se fija el motivo CX3C son útiles también para tratamiento o prevención de la enfermedad RSV.

La administración de anticuerpos, péptidos, polipéptidos o moléculas afines que bloquean los efectos semejantes a quimioquina del motivo CX3C de la glicoproteína G sobre la migración celular o la activación es útil también para tratamiento y prevención del RSV.

Las proteínas o péptidos aislados, recombinantes o sintéticos que contienen el motivo CX3C de la glicoproteína G de RSV, o fragmentos activos de los mismos o proteínas de fusión de los mismos, pueden utilizarse como moléculas bloqueantes como se ha descrito arriba, pero son útiles también como herramientas de investigación científica para identificar y producir otras moléculas bloqueantes, favoreciendo con ello la comprensión de los mecanismos de la patología viral del RSV y el desarrollo de terapias antivirales. Adicionalmente, las proteínas aisladas, recombinantes o sintéticas, o porciones antigénicas de las mismas (con inclusión de fragmentos portadores de epítipo), o proteínas de fusión de las mismas pueden administrarse a animales como inmunógenos o antígenos, solos o en combinación con un adyuvante, para la producción de antisuero reactivos con el motivo CX3C. Adicionalmente, las proteínas pueden utilizarse para cribar antisuero de pacientes hiperinmunes de los cuales pueden derivarse anticuerpos que tengan una afinidad muy alta para las proteínas.

Las proteínas, péptidos o polipéptidos preferidos de esta invención contienen el motivo CX3C. Muy preferiblemente, las proteínas, péptidos o polipéptidos contienen el motivo CX3C y la totalidad o una porción biológicamente activa o inmunógena de la secuencia de aminoácidos VPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKKTTPK (SEQ ID NO: 1).

Alternativamente, las proteínas, péptidos o polipéptidos de esta invención contienen el motivo CX3C y la totalidad o una porción biológicamente activa o inmunógena de la secuencia de aminoácidos VPCSICSNNPTC (a la que se hace referencia en esta memoria como RT32) (SEQ ID NO: 2), TCWAICKRIPNK (a la que se hace referencia en esta memoria como RT33) (SEQ ID NO: 3), NKKPGKKTTPK (a la que se hace referencia en esta memoria como RT34) (SEQ ID NO: 4), o combinaciones de las mismas. Otros péptidos que pueden utilizarse como moléculas bloqueantes incluyen, pero sin carácter limitante, TCAAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 5), TCWAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 6), TCNAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 7), TCDAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 8), TCDAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 9), TCMAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 10), TCFAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 11).

Los métodos descritos en los ejemplos de esta memoria se utilizaron para demostrar que estos péptidos 1) inhiben > 90% de la infección por RSV de las células susceptibles (v.g., células Vero), 2) inhiben > 90% de la fijación de CX3C de la glicoproteína G a CX3CR1, y 3) inhiben la formación de calvas de RSV.

La presente invención proporciona también ácidos nucleicos aislados que codifican los péptidos de la glicoproteína G de RSV de la presente invención y fragmentos de los mismos. Estos ácidos nucleicos pueden utilizarse para producir los péptidos de esta invención o como vacunas de ácido nucleico, en cuyo caso los péptidos de esta invención se producen en un individuo.

Un ácido nucleico como se utiliza en esta memoria hace referencia a moléculas mono o bicatenarias que pueden ser DNA, que comprende las bases nucleotídicas A, T, C y G, o RNA, que comprende las bases A, U (que sustituye

a T), C y G. El ácido nucleico puede representar una cadena codificante o su complemento. Los ácidos nucleicos pueden ser idénticos en secuencia a la secuencia que existe naturalmente o pueden incluir codones alternativos que codifican el mismo aminoácido que el que se encuentra en la secuencia existente naturalmente. Adicionalmente, los ácidos nucleicos pueden incluir codones que representan sustituciones conservativas de aminoácidos como las que son bien conocidas en la técnica.

Como se utiliza en esta memoria, el término “ácido nucleico aislado” significa un ácido nucleico separado o sustancialmente exento de al menos algunos de los otros componentes del organismo existente naturalmente, por ejemplo, los componentes estructurales de las células que se encuentran comúnmente asociados con los ácidos nucleicos en un ambiente celular y/u otros ácidos nucleicos. El aislamiento de ácidos nucleicos puede realizarse por tanto por técnicas tales como lisis celular seguida por extracción con fenol más cloroformo, seguida por precipitación de los ácidos nucleicos con etanol (48). Los ácidos nucleicos de esta invención pueden aislarse de las células de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica de aislamiento de ácidos nucleicos. Alternativamente, los ácidos nucleicos de la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con protocolos estándar bien descritos en la bibliografía para la síntesis de ácidos nucleicos. Se contemplan también modificaciones de los ácidos nucleicos de la invención con tal que se mantengan la estructura y función esenciales del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico.

El ácido nucleico que codifica el péptido o polipéptido de esta invención puede formar parte de una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende cualquier combinación de sitios de restricción y/o elementos funcionales como son bien conocidos en la técnica que facilitan la clonación molecular y otras manipulaciones del DNA recombinante. Así, la presente invención proporciona adicionalmente una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido y/o polipéptido de esta invención.

La presente invención proporciona adicionalmente un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido y/o polipéptido de esta invención. El vector puede ser un vector de expresión que contiene la totalidad de los componentes genéticos requeridos para la expresión del ácido nucleico en células en las cuales se ha introducido el vector, como son bien conocidos en la técnica. El vector de expresión puede ser un vector de expresión comercial o el mismo puede construirse en el laboratorio de acuerdo con protocolos estándar de biología molecular. El vector de expresión puede comprender ácido nucleico viral que incluye, pero sin carácter limitante, ácido nucleico de virus vacinia, adenovirus, retrovirus y/o virus adenoasociado. El ácido nucleico o vector de esta invención puede encontrarse también en un liposoma o un vehículo de suministro que puede ser capturado por una célula por endocitosis mediada por receptores u otro tipo de endocitosis.

El ácido nucleico de esta invención puede encontrarse en una célula, que puede ser una célula que exprese el ácido nucleico, con lo cual se produce en la célula un péptido y/o polipéptido de esta invención. Adicionalmente, el vector de esta invención puede encontrarse en una célula, que puede ser una célula que expresa el ácido nucleico del vector, con lo cual se produce en la célula un péptido y/o polipéptido de esta invención. Se contempla también que los ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención pueden estar presentes en un animal hospedador (v.g., un animal transgénico) que expresa los ácidos nucleicos de esta invención y produce los péptidos y/o polipéptidos de esta invención.

El ácido nucleico que codifica los péptidos y polipéptidos de esta invención puede ser cualquier ácido nucleico que codifique funcionalmente los péptidos y polipéptidos de esta invención. Para codificar funcionalmente los péptidos y polipéptidos (es decir, permitir que se expresen los ácidos nucleicos), el ácido nucleico de esta invención puede incluir, por ejemplo, secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un intensificador y los sitios de procesamiento de la información necesarios, tales como sitios de fijación de ribosoma, sitios de remodelación del RNA, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción.

Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes de metalotioneína, genes de actina, genes de inmunoglobulina, CMV, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, etc. Un ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido seleccionado puede determinarse fácilmente basándose en el código genético para la secuencia de aminoácidos del péptido y/o polipéptido seleccionado, y muchos ácidos nucleicos codificarán cualquier péptido o polipéptido seleccionado. Se contemplan también modificaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido y/o polipéptido. Modificaciones que pueden ser útiles son modificaciones en las secuencias que controlan la expresión del péptido o polipéptido que hacen inducible o reprimible la producción del péptido o polipéptido tal como es controlada por el inductor o represor apropiado. Tales métodos son estándar en la técnica (49). El ácido nucleico de esta invención puede generarse por medios estándar en la técnica, v.g. por técnicas de ácido nucleico recombinante y por síntesis de ácido nucleico o síntesis enzimática *in vitro*.

La presente invención proporciona también un método para producir los péptidos y polipéptidos de esta invención que comprende producir las células de esta invención que contienen los ácidos nucleicos o vectores de esta invención como ácido nucleico exógeno; cultivar las células en condiciones en las cuales el ácido nucleico exógeno contenido en la célula puede expresarse y el péptido y/o polipéptido codificado puede producirse; y aislar el péptido y/o polipéptido de la célula. De este modo, se contempla que los péptidos y polipéptidos de esta invención pueden producirse en cantidad *in vitro* en sistemas de expresión procariotas o eucariotas, como es bien conocido en la técnica.

Para expresión en un sistema procariota, existen numerosos vectores de expresión de *E. coli* (*Escherichia coli*) conocidos por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, útiles para la expresión de ácido nucleico que codifica péptidos y/o polipéptidos. Otros hospedadores microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus*

subtilis, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, así como diversas especies de *Pseudomonas*. Estos hospedadores procariotas pueden soportar vectores de expresión que contendrán típicamente secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (v.g., un origen de replicación). Adicionalmente, estará presente cualquier número de una diversidad de promotores bien conocidos, tales como el sistema del promotor lactosa, un sistema promotor de triptófano (Trp), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de fijación de ribosoma, por ejemplo, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. En caso necesario, puede proporcionarse una metionina amino-terminal por inserción de un codón Met 5' y en marco con el polipéptido. Asimismo, puede eliminarse la extensión carboxi-terminal del polipéptido utilizando procedimientos estándar de mutagénesis de oligonucleótidos.

Las secuencias de ácido nucleico pueden expresarse en hospedadores después que las secuencias se han posicionado para asegurar el funcionamiento de una secuencia de control de la expresión. Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos hospedadores, sea como episomas o como una parte integral del DNA cromosómico del hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión pueden contener marcadores de selección, v.g., resistencia a la tetraciclina o resistencia a la higromicina, a fin de permitir la detección y/o selección de dichas células transformadas con las secuencias de ácido nucleico deseadas (50).

Para expresión en sistemas eucariotas, puede utilizarse un sistema de expresión de levadura. Los sistemas de expresión de levadura presentan varias ventajas. En primer lugar, existe evidencia de que los polipéptidos producidos en un sistema de expresión de levadura exhiben un apareamiento correcto de disulfuro. En segundo lugar, la glicosilación posterior a la traducción es realizada eficientemente por los sistemas de expresión de levadura. La región conductora del factor pre-pro-alfa de *Saccharomyces cerevisiae* (codificada por el gen *MF α -1*) se utiliza rutinariamente para dirigir la secreción de proteínas por la levadura (51). La región conductora del factor pre-pro-alfa contiene un péptido señal y un segmento pro que incluye una secuencia de reconocimiento para una proteasa de levadura codificada por el gen *KEX2*. Esta enzima escinde la proteína precursora en el lado del carboxilo de una secuencia señal de escisión del dipéptido Lys-Arg. La secuencia codificante del polipéptido puede fusionarse en marco a la región conductora del factor pre-pro-alfa. Esta construcción se pone luego bajo el control de un promotor fuerte de la transcripción, tal como el promotor I de la alcohol-deshidrogenasa o un promotor glicolítico. La secuencia codificante va seguida por un codón de terminación de la traducción, que va seguido a su vez por señales de terminación de la transcripción. Alternativamente, la secuencia codificante de interés puede fusionarse a una segunda secuencia de codificación de polipéptidos, tal como Sj26 o β -galactosidasa, utilizada para facilitar la purificación del polipéptido de fusión resultante por cromatografía de afinidad. La inserción de sitios de escisión de proteasas para separar los componentes del polipéptido de fusión es aplicable a las construcciones utilizadas para expresión en levadura.

La glicosilación y expresión eficientes posteriores a la traducción de polipéptidos recombinantes pueden lograrse también en sistemas de *Baculovirus* en células de insecto, que son bien conocidos en la técnica.

Los ácidos nucleicos de esta invención pueden expresarse también en células de mamífero para producir los péptidos y polipéptidos de esta invención. Las células de mamífero permiten la expresión de péptidos y polipéptidos en un ambiente que favorece modificaciones importantes posteriores a la traducción tales como el plegado y apareamiento de las cisteínas, la adición de estructuras complejas de carbohidratos y la secreción de proteína activa. Los vectores útiles para la expresión de péptidos y polipéptidos en células de mamífero se caracterizan por inserción de la secuencia codificante entre un promotor viral fuerte y una señal de poliadenilación. Los vectores pueden contener genes que confieren resistencia a gentamicina o metotrexato para uso como marcadores seleccionables. Por ejemplo, la secuencia codificante puede introducirse en una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) utilizando un vector codificante de resistencia al metotrexato. La presencia del RNA vector en células transformadas puede confirmarse por análisis mediante transferencia Northern, y la producción de un cDNA o RNA de la cadena opuesta correspondiente a la secuencia codificante del péptido o polipéptido puede confirmarse por análisis mediante transferencias Southern y Northern, respectivamente. Se han desarrollado en la técnica varias otras líneas de células hospedadoras adecuadas capaces de producir péptidos y polipéptidos exógenos, que incluyen las líneas de células CHO, células HeLa, líneas de células de mieloma, células Jurkat y análogas. Vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, como se ha descrito arriba.

Los ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención pueden transferirse a la célula hospedadora por métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de célula hospedadora. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que pueden utilizarse el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación para otros hospedadores celulares.

Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos y polipéptidos de esta invención pueden administrarse también como vacunas de ácido nucleico. Para los propósitos de suministro de vacunas, un ácido nucleico codificante de un péptido o polipéptido de esta invención puede encontrarse en un vector de expresión que puede comprender ácido nucleico viral con inclusión, pero sin carácter limitante, ácido nucleico de virus vaccinia, adenovirus, retrovirus y/o virus adeno-asociado. El ácido nucleico o vector de esta invención puede encontrarse también en un liposoma o un vehículo de suministro que puede ser capturado por una célula mediante endocitosis mediada por receptores u otro tipo de endocitosis. Las vacunas de ácido nucleico de esta invención pueden encontrarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable o administrarse con un adyuvante. Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos y polipéptidos de esta invención pueden administrarse también a las células *in vivo* o *ex vivo*.

ES 2 316 487 T3

Los anticuerpos generados contra los péptidos de esta invención y aislados de antisuero de esta invención son útiles para bloqueo de la fijación del motivo CX3C o como herramientas de investigación. Los términos “anticuerpo” y “anticuerpos”, como se utilizan en esta memoria, incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, monocatenarios, biespecíficos, simianizados, y humanizados, así como fragmentos Fab, con inclusión de los productos de una genoteca de presión de inmunoglobulinas Fab. El término “antígeno” hace referencia a la glicoproteína G de RSV o cualquier porción de la glicoproteína G que se fija a CX3C o un péptido de glicoproteína G que puede inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero.

Como se ha descrito arriba, los anticuerpos proporcionados en esta memoria pueden ser monoclonales o policlonales, preferiblemente un fragmento F(ab)² que carece de la porción Fc del anticuerpo. Los anticuerpos pueden prepararse por generación de hibridomas de células B, como se describe con mayor detalle más adelante, o por utilización de animales de laboratorio tales como ratones, ratones humanizados, ratas, conejos o cabras que se inmunizan con los péptidos y/o polipéptidos de esta invención. Los péptidos y/o polipéptidos pueden contener mutaciones de delección, inserción y/o sustitución en la glicoproteína G que abarca parte de o la totalidad de los aminoácidos 182-186 de la glicoproteína G de RSV, o puede utilizarse para la inmunización la glicoproteína G de RSV intacta, una porción de la glicoproteína G de RSV, o una glicoproteína G de RSV modificada. Puede llevarse luego a cabo un cribado para identificar anticuerpos que bloquean la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 o bloquean las actividades inducidas por la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1. Para mejorar la respuesta de anticuerpos, pueden incluirse adyuvantes o modificadores inmunológicos, como se describe con mayor detalle más adelante. Se prefieren especialmente vacunas constituidas por variaciones de la secuencia de aminoácidos CWAIC que añaden uno o más residuos adicionales (v.g., CWAIAC) y/o delecionan uno o más residuos (v.g., CWAC) del motivo CXXXC definido por la secuencia de aminoácidos CWAIC (v.g., 182-186). La vacuna puede comprender también las porciones de la glicoproteína G proximales al motivo CX3C. Adicionalmente, el motivo CX3C puede alterarse de una diversidad de maneras que incluyen, pero sin carácter limitante, delección de uno o ambos residuos cisteína (“C”) o aumento o disminución del número de residuos (“X”) entre los residuos cisteína.

Los anticuerpos monoclonales se generan por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. El método preferido es una versión modificada del método de Kearney *et al.* (52), que se incorpora por referencia en su totalidad en esta memoria. Resumidamente, animales tales como ratones o conejos se inoculan con el inmunógeno en adyuvante, y se recogen células del bazo que se mezclan a continuación con una línea de células de mieloma. Se induce la fusión de las células por adición de polietilenglicol. Se seleccionan químicamente hibridomas por extensión en placa de las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Los hibridomas se criban subsiguientemente respecto a la aptitud para producir anticuerpos monoclonales que bloquean la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 y/o modulen la actividad biológica asociada con la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1. Los anticuerpos que producen hibridomas se clonan, se expanden y se guardan congelados para producción futura.

Métodos para la producción de anticuerpos monocatenarios son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en la patente U.S. No. 4.946.778, y pueden utilizarse para producir anticuerpos monocatenarios para los motivos descritos en esta memoria. Puede utilizarse tecnología de presentación de fago para seleccionar genes de anticuerpos que tengan actividades de fijación para el motivo XC3C, procedentes de genes μ amplificados por PCR de linfocitos de humanos cribados respecto a la posesión de anticuerpos para el motivo CX3C o genotecas naíf.

Los anticuerpos de esta invención son útiles para bloquear la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 o para modular la actividad biológica asociada con la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 por una vacuna de virus no vivo o para inmunización pasiva. Preferiblemente, el anticuerpo se modifica de tal manera que el mismo sea menos inmunógeno en el paciente al que se administra. Por ejemplo, si el paciente es un humano, el anticuerpo puede “humanizarse” por trasplante de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo derivado de hibridoma a un anticuerpo monoclonal humano como ha sido descrito por Jones *et al.* (53).

Los anticuerpos policlonales se preparan por cribado de donantes de sangre humanos y selección de aquéllos que tienen títulos altos de anticuerpos que bloquean la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 o bloquean las actividades inducidas por la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1, así como anticuerpos que tienen otras funciones biológicas importantes, v.g., anticuerpos neutralizantes. Pueden obtenerse también anticuerpos policlonales por inmunización de donantes con vacunas que inducen anticuerpos que bloquean la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 o que bloquean las actividades inducidas por la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1, y/o tienen otras funciones biológicas importantes, v.g., anticuerpos neutralizantes. El suero procedente de los donantes seleccionados se reagrupa luego y se convierte en preparaciones de inmunoglobulina.

60 *Ensayos de Cribado*

Se proporcionan ensayos para cribar vacunas y fármacos, compuestos químicos, anticuerpos, péptidos, polipéptidos u otras moléculas en cuanto a la aptitud para bloquear la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1, o para bloquear las actividades inducidas por la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1. Ensayos de esta invención incluyen aquéllos 1) que detectan la capacidad para neutralizar el virus RSV no neutralizado por heparina; 2) que detectan la capacidad para bloquear la fijación de la glicoproteína G de RSV a células transfectadas con el receptor CX3CR1; o 3) que detectan la capacidad para bloquear la migración de los leucocitos mediada por la glicoproteína G de RSV.

Composiciones Inmunológicas y Farmacéuticas

Composiciones inmunológicas que incluyen las vacunas arriba descritas, y otras composiciones farmacéuticas que contienen el RSV vivo modificado o RSV no vivo o las glicoproteínas G, polipéptidos, péptidos o anticuerpos de RSV que contienen CX3C, se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Una o más de estas composiciones pueden formularse y envasarse, solas o en combinación, utilizando métodos y materiales conocidos por los expertos en la técnica de las vacunas. La respuesta inmunológica puede utilizarse terapéutica o profilácticamente y puede proporcionar inmunidad de anticuerpos o inmunidad celular tal como la producida por linfocitos T tales como linfocitos T citotóxicos o linfocitos T CD4⁺.

Las composiciones inmunológicas, tales como vacunas, y otras composiciones farmacéuticas pueden administrarse solas o en cualquier combinación para tratar o proteger contra las infecciones causadas por RSV. En particular, las composiciones pueden utilizarse para proteger a los humanos contra la bronquiolitis, una infección del tracto respiratorio superior o una infección del tracto respiratorio inferior causada por infección de RSV.

Para mejorar la inmunogenicidad, las glicoproteínas G, polipéptidos o péptidos de esta invención de RSV que contienen CX3C pueden conjugarse a una molécula portadora. Portadores inmunógenos adecuados incluyen proteínas, polipéptidos, o péptidos tales como albúmina, hemocianina, tiroglobulina y derivados de los mismos, particularmente sero-albúmina bovina (BSA) y hemocianina de lapa perforada (KLH), polisacáridos, carbohidratos, polímeros, y fases sólidas. Otras sustancias derivadas de proteínas o derivadas de sustancias distintas a las proteínas son conocidas por los expertos en la técnica. Un vehículo inmunógeno tiene típicamente un peso molecular de al menos 1000 daltons, y preferiblemente mayor que 10.000 daltons. Las moléculas portadoras contienen a menudo un grupo reactivo para facilitar la conjugación covalente al hapteno. El grupo ácido carboxílico o grupo amino de los aminoácidos o los grupos azúcar de las glicoproteínas se utilizan a menudo de esta manera. Los vehículos que carecen de tales grupos pueden hacerse reaccionar a menudo con productos químicos apropiados para producir los mismos. Preferiblemente, se produce una respuesta inmunitaria cuando el inmunógeno se inyecta en animales tales como humanos, ratones, conejos, ratas, cabras, ovejas, cobayos, pollos, y otros animales, muy preferiblemente ratones y conejos. Alternativamente, un péptido antigénico múltiple que comprende múltiples copias de la proteína o polipéptido, o un polipéptido antigénico o inmunológicamente equivalente, puede ser suficientemente antigénico para mejorar la inmunogenicidad sin el uso de un vehículo.

Las glicoproteínas G, polipéptidos o péptidos de RSV que contienen CX3C o la glicoproteína G de RSV intacta, polipéptidos o péptidos de glicoproteína G de RSV, o modificaciones de la glicoproteína G de RSV que inducen anticuerpos que bloquean la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 o que bloquean las actividades inducidas por la fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 pueden administrarse con un adyuvante en una cantidad eficaz para mejorar la respuesta inmunógena. Hasta ahora, el único adyuvante utilizado de modo generalizado en humanos ha sido alumbre (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio). La saponina y su componente purificado Quil A, adyuvante de Freund completo y otros adyuvantes utilizados en investigación y aplicaciones veterinarias tienen toxicidades que limitan su uso potencial en vacunas humanas. Sin embargo, preparaciones químicamente definidas, tales como muramil-dipéptido, monofosforil-lípido A, conjugados de fosfolípidos, encapsulación del conjugado con un proteoliposoma, y encapsulación de la proteína en vesículas lipídicas pueden ser también útiles.

Métodos de Administración y Dosis de las Composiciones Farmacéuticas

Se describen también en esta memoria métodos para el tratamiento de los individuos diagnosticados con enfermedad RSV y afecciones asociadas con la infección por RSV, tales como bronquiolitis, infección respiratoria superior e infección respiratoria inferior por administración de las composiciones arriba descritas.

Se proporciona también por esta invención una composición para tratamiento o prevención de una infección de RSV en un individuo, por administración al individuo de una cantidad eficaz de péptido, polipéptido, anticuerpo monoclonal o ácido nucleico codificante de péptidos de la glicoproteína G de RSV de esta invención que altera la actividad biológica del motivo CX3C de la glicoproteína G de RSV y una composición anti-viral. Las composiciones anti-virales pueden incluir inhibidores de la replicación e infección por RSV de moléculas pequeñas semejantes a fármacos: análogos de nucleósidos tales como ribavirina, EICAR, Pirazofurina, 3-desazaguanina, GR92938X y LY253963. Estos inhibidores están direccionados para inhibir la inosina-monofosfato-deshidrogenasa (IMPDH). Son también útiles inhibidores direccionados para inhibir la adsorción y entrada de virus. Prominentes entre esta clase son los polioxometalatos y CL387626 (Wyeth-Ayerst, Pearl River, NY). Otros ejemplos de polioxometalatos son T118, benzatrona de Trimeris, BABIM y RD30028. Son también útiles inhibidores de oligonucleótidos antisentido de RSV, tales como V590, un inhibidor que direcciona residuos en los genes NS1/NS2 de RSV.

Los péptidos de glicoproteína G de RSV pueden incorporarse en un vehículo farmacéutico tal como solución salina, dextrosa, agua, glicerol, etanol, otros compuestos terapéuticos, y combinaciones de los mismos. La formulación debería ser apropiada para el modo de administración que se describe más adelante y puede incluir otros modificadores inmunitarios tales como heparina. La composición puede contener también otros ingredientes biológicamente inertes adicionales tales como saborizantes, cargas, etc.

Métodos de administración adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, suministro intramuscular, intravenoso, intranasal, mucosal, por aerosol o por cualquier ruta que produzca el efecto deseado de inhibir la actividad biológica

del motivo (o dominio) CX3C en la glicoproteína G. Otros ejemplos no limitantes de tales rutas de administración incluyen administración oral, parenteral y transdérmica.

Una vacuna de esta invención puede envasarse en una dosificación simple para inmunización por administración parenteral (es decir, intramuscular, intradérmica o subcutánea) o administración nasofaríngea (es decir, intranasal). La vacuna se administra muy preferiblemente por inhalación. La vacuna está combinada preferiblemente con un vehículo farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración. El vehículo es usualmente agua o una solución salina tamponada, con o sin un conservante. La vacuna puede estar liofilizada para resuspensión en el momento de la administración; o en solución.

La microencapsulación de la vacuna proporcionará también una liberación controlada. Numerosos factores contribuyen a la selección de un polímero particular para microencapsulación. La reproducibilidad de la síntesis de polímeros y el proceso de microencapsulación, el coste de los materiales y el proceso de microencapsulación, el perfil toxicológico, los requerimientos para cinética de liberación variable y la compatibilidad fisicoquímica del polímero y los antígenos son todos ellos factores que deben considerarse. Ejemplos de polímeros útiles son policarbonatos, poliésteres, poliuretanos, poliortoésteres, poliamidas, poli-(d,l-lactida-co-glicolida) (PLGA) y otros polímeros biodegradables.

Una cantidad eficaz de las composiciones de esta invención está comprendida entre cantidades de nanogramo/kg a miligramo/kg para niños pequeños y adultos. Basándose en este intervalo, pueden determinarse las dosificaciones equivalentes para pesos corporales menores o mayores. La dosis debería ajustarse para adaptarla al individuo al que se administra la composición y variará con la edad, el peso y el metabolismo del individuo. La vacuna puede contener adicionalmente estabilizadores tales como timerosal (sal de sodio de etil(2-mercaptobenzoato-S)mercurio) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) o conservantes fisiológicamente aceptables. La cantidad exacta de la composición requerida variará de un individuo a otro, dependiendo de la especie, la edad, el peso y el estado general del individuo, el péptido o polipéptido particular utilizado, su modo de administración y factores análogos. Así pues, no es posible especificar una cantidad exacta para cada péptido o polipéptido. Sin embargo, una cantidad apropiada puede ser determinada por una persona con experiencia ordinaria en la técnica utilizando únicamente experimentación de rutina una vez asimilada la doctrina de esta memoria. Un experto en la técnica comprenderá que las dosificaciones se optimizan del mejor modo posible por el médico que tenga a su cargo el tratamiento, y métodos para la determinación de las cantidades y regímenes de dosificación y la preparación de formas de dosificación se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (47).

Como ejemplo, a un individuo diagnosticado con una infección de RSV o que se sepa se encuentra en riesgo de sufrir infección por RSV, pueden administrarse entre aproximadamente 50 y 1000 nM y, de modo más preferible, entre aproximadamente 100 y 500 nM de una composición de esta invención, y posiblemente en un adyuvante, a intervalos de 1 a 3 semanas durante aproximadamente 12 semanas o hasta que una evaluación de los parámetros clínicos del individuo (v.g., síntomas y niveles de RNA de RSV) indican que el individuo no está infectado por RSV. El tratamiento puede continuarse o reanudarse si los parámetros clínicos del individuo indican que está presente infección por HCV (sic) y puede mantenerse hasta que la infección ya no es detectada por estos parámetros.

La invención se ilustra adicionalmente por los elementos siguientes, que no deben interpretarse en modo alguno como imposición de limitaciones en cuanto al alcance de la misma.

Ejemplo 1

Estudios de fijación

Se examinó glicoproteína G purificada en cuanto a la fijación a células 293-CX3CR1³³. Se utilizó un plásmido pcDNA 3.1 que contenía el gen CX3CR1 y un gen de resistencia a la neomicina para transfectar de manera estable células de riñón de embrión humano (HEK). Se utilizó la resistencia a la neomicina para selección y mantenimiento de la transfección plasmídica de las células de riñón de embrión humano. Para confirmar la transfección, lisados de células de riñón de embrión humano transfectadas con CX3CR1 se tiñeron con anticuerpo anti-CX3CR1 en análisis de transferencias Western, o se examinaron por citometría de flujo células transfectadas intactas.

Todos los estudios de fijación se realizaron en hielo y, o bien glicoproteína G o Fkn humano (R&D Diagnostics, Minneapolis, MN) se diluyeron entre 1 nM y 100 nM en PBS (GIBCO) que contenía 1% de seroalbúmina bovina (Sigma) y se incubaron con las células 293-CX3CR1 o células 293 de control durante 30 min a 4°C. Fijación de 293-CX3CR1 saturadas con fractalquino entre 1 y 10 nM (sic). Para estudios de inhibición, se preincubó Fkn humano 100 pM-1 μ M o glicoproteína G con las células durante 30 min a 4°C. Sin lavado, se añadieron 100 pM de Fkn o glicoproteína G y se incubaron durante 30 min a 4°C. Se lavaron las células, se bloquearon con anticuerpo de bloqueo Fc γ RIII (HB197) durante 30 min en hielo, se lavaron y se tiñeron en caso apropiado con un cóctel de anticuerpos monoclonales anti-glicoproteína G (132-5B, 132-5G, 130-2G, 232-1F) o un cóctel de anticuerpos monoclonales anti-glicoproteína G biotinilados (130-2G, 131-2G) o anticuerpo monoclonal anti-Fkn (51637.11; R&D Diagnostics). Se utilizaron en todos los experimentos concentraciones de 1 μ g de anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G (131-2G)³⁴, suero de conejo anti-CX3CR1³³, y anticuerpo monoclonal anti-CX3CR1 que contenía 10 μ g/ml de heparina. El porcentaje de inhibición en ausencia de heparina para la inhibición de la glicoproteína G del anticuerpo anti-glicoproteína G variaba desde 32 a 48% y desde 4 a 10% para Fkn, y la inhibición del anticuerpo anti-CX3CR1

variaba desde 40 a 55% tanto para la glicoproteína G como para Fkn. Los anticuerpos anti-glicoproteína G 130-5F y 130-9G, que se había predicho se fijan fuera del motivo CX3C³⁵, no inhibían la glicoproteína G ni Fkn (intervalo 4-8%). Se detectó la tinción con anticuerpo monoclonal anti-ratón (cadenas H&L) de cabra con FITC adsorbido (PharMingen, San Diego, CA) o estreptavidina-PE (PharMingen) utilizando citometría de flujo (FACScan, Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Se utilizó un polipéptido ¹²⁵I-Fkn de 76 aminoácidos que comprendía el dominio CX3CR (NEN, Boston, MA) en los estudios de radioligandos³³. Como control, se examinó por citometría de flujo el volumen vacío después del paso de la glicoproteína G purificada por una columna de afinidad de anticuerpo anti-glicoproteína G (130-2G) respecto a la fijación a las células 293 o 293-CX3CR1. No se detectó fijación alguna de glicoproteína G a las células 293 o 293-CX3CR1 por citometría de flujo utilizando anticuerpo monoclonal anti-G (131-2G). Los estudios de inhibición utilizando el material eluido para competir por la fijación de la glicoproteína G a las células 293 o 293-CX3CR1 no demostraron inhibición alguna, lo que sugería que la glicoproteína G, y no un contaminante, se fijaba a CX3CR1.

Péptidos

Para los estudios de inhibición de péptidos, se identificaron una serie de péptidos de glicoproteína G en la secuencia de aminoácidos de la cepa A2 de RSV (GENBANK; locus de la proteína de fijación 1912305, Tabla 4). Los péptidos se sintetizaron utilizando un método de síntesis de péptidos en fase sólida simultáneo y múltiple en un sintetizador de péptidos (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Berkeley, CA), y se testaron en cuanto a homogeneidad por cromatografía líquida en fase inversa y electroforesis capilar (www.biotech.cdc.gov/protein/methods). Los ensayos de inhibición se realizaron como se ha descrito anteriormente para los estudios de fijación.

Purificación de la Glicoproteína G

Se examinaron en este estudio dos preparaciones diferentes de glicoproteína G: una glicoproteína G purificada aislada de células Vero (RSV) infectadas con RSV/A2 (ATCC CCL 81; infectadas con una multiplicidad de infección entre 0,5 y recogidas entre los días 4 ó 5 p.i.), y una preparación purificada de glicoproteína G soluble recombinante marcada con polihistidina. La glicoproteína G purificada aislada de las células Vero infectadas con RSV se utilizó en este estudio debido a que esta preparación contenía la forma natural de la glicoproteína G; sin embargo, se alcanzaron resultados comparables utilizando la preparación de glicoproteína G soluble recombinante marcada con polihistidina. La proteína G purificada aislada de las células Vero infectadas con RSV se preparó utilizando una modificación de un procedimiento de aislamiento en tres pasos descrito previamente⁴⁴. Resumidamente, el lisado de virus recogido por congelación-descongelación de matraces que contenían células Vero infectadas por RSV se diluyó en PBS que contenía PMSF 1 mM y EDTA 2 mM, se trató por ultrasonidos en hielo, se centrifugó a 100.000 g durante 30 min a 10°C, y se recogió el sedimento. El sedimento se resuspendió en tampón de carga (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM, DTT 2 mM, EDTA 2 mM, N-acetil-glucosamina 10 mM y 1% de Triton X-100, pH 7,5), se trató por ultrasonidos en hielo, y se recogió un lisado aclarado después de centrifugación a 12.500 g durante 30 min a 4°C. Las glicoproteínas virales se capturaron utilizando una columna de lectina de germen de trigo-Sepharose 4B eluida previamente con tampón de carga que contenía N-acetil-glucosamina 500 mM y equilibrada con tampón de carga que contenía 1% de n-octil-glucopiranosido (tampón n-OG). La glicoproteína G se eluyó con tampón de carga que contenía N-acetil-glucosamina 500 mM y se dializó contra dos cambios de tampón M (sacarosa 250 mM, MES 25 mM-NaOH, NaCl 10 mM, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM en tampón n-OG, pH 5,7), y se cargó en una columna Q-Sepharose de intercambio de anión eluida previamente con tampón M que contenía NaCl 2 mM. La glicoproteína G se eluyó utilizando un gradiente lineal de NaCl (desde 0,1 M a 1 M) en tampón M. Las fracciones eluidas con NaCl 100 mM y 200 mM que contenían la glicoproteína G se dializaron contra dos cambios de PBS.

Se preparó glicoproteína G recombinante purificada marcada con polihistidina a partir de células Vero transfectadas establemente con pcDNA codificante de glicoproteína G soluble marcada con polihistidina bajo selección con zeocina. Las células transfectadas se congelaron a -70°C, se recogieron las células en PBS que contenía PMSF 1 mM, y se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en tampón Gsol (NaPO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, sacarosa 250 mM, PMSF 1 mM, 1% Triton X-100, pH 7,5), se trató por ultrasonidos en hielo, y se centrifugó luego a 12.500 g durante 30 min a 4°C. La glicoproteína G marcada con polihistidina se capturó y se purificó utilizando una columna de HisTrap-Sepharose 4B (columna de afinidad Ni-NTA) como se describe por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ)). La glicoproteína G marcada con polihistidina se eluyó con tampón Gsol que contenía 1% de tampón n-OG e imidazol 250 mM, y se dializó contra dos cambios de PBS.

La caracterización del contenido de la preparación de glicoproteína G se realizó por electroforesis en gel y transferencia Western. La fracción de la columna de lectina de germen de trigo enriquecida a la vez en glicoproteínas G y F procedentes del lisado de las células Vero infectadas con RSV produjo bandas múltiples por electroforesis en gel y tinción con plata (Figura 4). Las bandas localizadas aproximadamente a 90 kD y 45 kD corresponden a dos bandas detectadas por transferencia Western con anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G (131-2 G)³⁴ y una banda a aproximadamente 70 kD corresponde a una banda detectada por transferencia Western con un anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína F (131-2A)³⁴ (Figura 4). Después del paso de purificación final, es decir, la elución con Q-Sepharose, únicamente se detectaba la banda de glicoproteína G por transferencia Western (Figura 4), lo que indicaba que la preparación de glicoproteína G final no contenía glicoproteína F detectable. La glicoproteína G recombinante purificada marcada con polihistidina, recuperada de la columna His-Trap-Sepharose 4B, contenía glicoproteína G pero no glicoproteína F como se detectó por transferencia Western (panel 4) y otras bandas de proteína indicadas por electroforesis en gel y tinción con plata.

Examen in vivo del tráfico de células

Se examinó el tráfico de células al pulmón en ratones BALB/c naíf e inmunes frente a FI-RSV después de tratamiento intranasal con fractalquino 1 μ M, glicoproteína G de RSV o péptidos G de RSV. Todos los ratones eran hembras adquiridas de Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN) y mantenidas en los Centers for Disease Control and Prevention en Atlanta, GA. Los ratones inmunes frente a FI-RSV se inmunizaron en el músculo glúteo superficial utilizando 10⁵ equivalentes pfu de FI-RSV de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los ratones se anestesiaron con 2,2,2-tribromoetanol y se trataron por vía intranasal con 0,05 ml de fractalquino, glicoproteína G de RSV o péptido diluido en PBS (GIBCO). El día 2 después del tratamiento, se anestesiaron los ratones, se desangraron por corte de la arteria caudal derecha, y las células broncoalveolares (BAL) se recogieron en PBS que contenía 1% de BSA (Sigma). Las células BAL se bloquearon con 10% de suero normal de ratón (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) en PBS, y se tiñeron luego con las combinaciones apropiadas de anti-CD3 marcado con FITC o PE (145-2C11), anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD11B (M1/70), anti-CD45R/B220 (RA3-6B2), células anti-pan NK (DX5), anti-neutrófilos (RB6-8C5), y controles de ratón isotipo Ab (todos ellos de PharMingen, San Diego, CA). La distribución de los marcadores de la superficie celular se determinó en modo de dos colores en un FACScan con software CellQUEST (Becton-Dickinson, Mountain View, CA).

Quimiotaxis de los leucocitos

Se midió la quimiotaxis de los leucocitos hacia Fkn, glicoproteína G o medio de acuerdo con Boyden⁴⁶ utilizando placas de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA) con inserciones de filtros de 3 μ m (Nalge Nunc, Rochester, NY) recubiertas con una matriz extracelular constituida primariamente por laminina, colágeno IV y proteoglicano (ECM, Sigma, St. Louis, MO). Para estudios en murinos, se pusieron 5 x 10⁵ células naíf de bazo en la cámara superior y se pusieron Fkn de ratón 10 nM o glicoproteína G 10 nM, anticuerpo anti-CX3CR1, anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G o anti-glicoproteína F, suero normal de conejo, suero de conejo anti-CCR5 o medio en la cámara superior o la inferior según fuera apropiado. Para los estudios en humanos, se pusieron 10⁶ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) purificadas en gradiente de densidad (Linfocito Separation Media, ICN Biomedicals, Aurora, OH, según instrucciones del fabricante) procedentes de donantes adultos humanos normales en la cámara superior en presencia o ausencia de péptido RT33 1 μ M, y Fkn humano 10 nM, glicoproteína G 10 nM o péptido RT33 1 μ M se pusieron en las cámaras inferiores. La cámara Boyden modificada se incubó a 37°C durante 4-6 h, se retiraron las inserciones, se lavaron en PBS (GIBCO BRL), se fijaron en aldehído glutárico al 3% y se tiñeron en violeta cristal al 0,01% tamponado con formalina. Las células quimiotácticas se visualizaron con un microscopio. Las células quimiotácticas se analizaron respecto a la expresión de CX3CR1 por recogida de las células de las cámaras Boyden superiores o inferiores modificadas, tinción con anticuerpo (2A9-1) y citometría de flujo como se ha descrito. Los leucocitos quimiotácticos hacia G o Fkn expresaban un porcentaje mayor de CX3CR1 en la cámara inferior (25-30%) en comparación con la cámara superior (7-11%).

Ensayo de reducción de calvas de RSV

Se realizaron diluciones de Fkn (R&D Systems), SDF-1 α (R&D Systems), glicoproteína G, heparina (Sigma), péptidos de glicoproteína G y anticuerpo anti-CX3CR1 en Medio de Eagle modificado de Dulbecco exento de suero (DMEM; GIBCO) que contenía 1% de BSA (Sigma) y se preincubaron con las células Vero durante 1 h a 37°C. Se utilizaron en todos los experimentos 50 μ g de anticuerpo anti-CX3CR1 o suero normales de conejo desactivados por calentamiento (56°C, 30 min) (control). El suero normal de conejo no tenía efecto significativo alguno sobre el número de calvas. Se realizaron diluciones de RSV en DMEM exento de suero (GIBCO) y se añadieron a células Vero tratadas previamente durante 2 h a 37°C. Después de la infección con el virus, se añadió a los pocillos DMEM (GIBCO) que contenía 10% de FBS (Hyclone, Logan, UT). Se enumeraron las calvas utilizando inmunotinción para las glicoproteínas F y G con utilización de anticuerpos monoclonales biotinilados 131-2A (anti-glicoproteína F) y 130-2G (anti-glicoproteína G) como se ha descrito⁴⁵.

Análisis de protección contra RNAsa

El aislamiento de RNA y el análisis multi-sonda de protección contra RNAsa (RPA) se realizó de acuerdo con el fabricante (PharMingen, San Diego, CA). El mRNA se aisló utilizando un kit Poli(A)Pure (Ambron, Austin, TX). Se utilizaron células Vero para extracción del RNA. El RNA total se extrajo utilizando RNA STAT-50LS como se describe por el fabricante (TEL-TEST Inc., Friendswood, TX). Se detectó el mRNA V28 por RPA utilizando el RiboQuant Multi-Probe RNase Protection Assay System (PharMingen, San Diego, CA).

Especificidad de la fijación de glicoproteína G a CX3CR1

Se identificó previamente el receptor para Fkn, CX3CR1, y se caracterizó utilizando antisuero de conejo anti-CX3CR1 y células de riñón de embrión humano transfectadas con CX3CR1 (células 293-CX3CR1)³³. La citometría de flujo utilizando antisuero de conejo anti-CX3CR1³³ indicó que el porcentaje de CX3CR1 detectable en las células 293-CX3CR1 aumentaba desde 4-10% en las células 293 no transfectadas hasta 80-92% para las células 293-CX3CR1. La fijación de Fkn a las células 293-CX3CR1 alcanzaba un máximo y se mantenía constante en 100 pM-10 nM, por lo que se utilizó Fkn 10 nM para calcular el porcentaje de fijación máxima de Fkn (Fkn-Maximum, Tabla 1). El examen de una fracción de la columna de lectina de germen de trigo enriquecida a la vez en las glicoproteínas G y F (Figura 4) demostró que la fijación de la glicoproteína G aumentaba desde 18% en las células 293 hasta 70% en

las células 293-CX3CR1, mientras que la fijación de la glicoproteína F aumentaba desde 8% en las células 293 hasta 12% en las células 293-CX3CR1. Para confirmar la fijación de la glicoproteína G a las células 293-CX3CR1 se utilizó un anticuerpo monoclonal para glicoproteína G³⁴ en un estudio de inhibición de la fijación con una glicoproteína G purificada recombinante marcada con polihistidina (10 nM, Tabla 2). El anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G (131-2G), que es reactivo con un fragmento de glicoproteína G (aminoácidos 1-173)³⁵, inhibía el 86 a 92% de la fijación de glicoproteína G a las células 293-CX3CR1 como se detectaba por un panel de anticuerpos monoclonales anti-glicoproteína G reactivos frente a 3 sitios antigénicos diferentes en la glicoproteína G³⁵, pero no inhibía la fijación de Fkn (0-4%). En contraste, el anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G 130-2G, reactivo con un dominio COOH-terminal de la glicoproteína G (aminoácidos 215-298)³⁵, y un anticuerpo para glicoproteína F, no inhibían la fijación de la glicoproteína G (12-20% y 4-12%, respectivamente) o Fkn (5-10% y 4-10%, respectivamente) a las células 293-CX3CR1. Como era de esperar, la fijación de la glicoproteína G recombinante marcada con polihistidina aumentaba desde un intervalo de 7 a 12% para las células 223 hasta un intervalo de 68-88% para las células 293-CX3CR1, y la fijación a las células 293-CX3CR1 era inhibida (80-88%) por el anticuerpo monoclonal 131-2G.

Para determinar si la glicoproteína G se fijaba a las células 293-CX3CR1 por CX3CR1, se examinó la capacidad de cuatro reactivos (antisuero anti-CX3CR1 de conejo, anticuerpo monoclonal anti-CX3CR1 (2A 9-1), Fkn y un polipéptido de 76 aminoácidos ¹²⁵I-Fkn que contenía el dominio CX3C) que se fijan a CX3CR1 para bloquear la fijación de la glicoproteína G a las células 293-CX3CR1. Adicionalmente, para determinar si la fijación de glicoproteína G a las células 293-CX3CR1 era dependiente del motivo CX3C, se generaron péptidos de glicoproteína G con una sola inserción ($\Delta + 1$) o delección ($\Delta - 1$) de residuo en el motivo CX3C, y asimismo péptidos que carecían de o incluían el motivo CX3C (Tabla 4). Este panel de péptidos se analizó respecto a su capacidad para bloquear la fijación de glicoproteína G o Fkn a las células 293-CX3CR1.

Dado que tanto la glicoproteína G como Fkn pueden fijarse a las células por interacciones HBD-GAG^{22,37,38}, se incluyó heparina en estos estudios para inhibir esto (Tabla 2). La fijación de glicoproteína G a las células 293-CX3CR1 era inhibida mínimamente (20-34%) por Fkn solo; sin embargo, la adición de Fkn a heparina inhibía casi por completo la fijación de la glicoproteína G (desde 78-84% hasta 85-98%). La interacción extensa de glicoproteína G HBD-GAG con las células 293-CX3CR1 no es inesperada, dada la naturaleza altamente glicosilada de la glicoproteína G²⁸. La fijación de la glicoproteína G a las células 293-CX3CR1 en presencia de heparina era inhibida también adicionalmente por el péptido RT33 que contenía el motivo CX3C (desde 78-84% hasta 85-94%) y por la adición de los dos anticuerpos anti-CX3CR1 (desde 78-84% hasta 88-94%). Se observó un aumento similar en la inhibición de la fijación de Fkn a las células 293-CX3CR1 en presencia de heparina con la adición de glicoproteína G (desde 57-65% hasta 80-85%) o péptido RT33 (desde 57-65% hasta 70-80%) o los dos anticuerpos anti-CX3CR1 (78-84% a 88-97%). Los péptidos que no contenían el motivo CX3C (RT32, RT34) y los péptidos con cambios en el motivo CX3C ($\Delta + 1$ y $\Delta - 1$) (Tabla 4) así como el suero normal de conejo de control no afectaban a la fijación. Estos datos sugieren que la mayor parte de la fijación de la glicoproteína G ocurre por interacción HBD-GAG y la mayor parte de la fijación restante se debe a la interacción de la glicoproteína G con CX3CR1. El tratamiento con concentraciones 10 nM-10 μ M de diferentes quimioquinas (MIP-2, IP-10, proteína-1 afín a la proteína inflamatoria de los macrófagos (C10) y el oncogén α regulado por el crecimiento, KC) era también incapaz de alterar la fijación de Fkn o glicoproteína G a las células 293-CX3CR1. Estudios de inhibición de radioligandos³⁶ demostraron que Fkn y la glicoproteína G inhibían más del 90% de la fijación del polipéptido ¹²⁵I Fkn a las células 293-CX3CR1 a concentraciones de 10 pM a 10 nM (Figura 2). El análisis Scatchard de los datos de fijación reveló K_d para Fkn = $5,8 \pm 1,4$ nM, y K_d para glicoproteína G = $2,1 \pm 1,6$ nM.

45 *CX3CR1 es un receptor para RSV*

Se consideró también el impacto de la fijación de glicoproteína G a CX3CR1 en el curso de la infección viral por examen de la reducción de las calvas de RSV en células Vero después de tratamiento con heparina, Fkn, glicoproteína G, péptidos de glicoproteína G y anti-CX3CR1 (Tabla 3). Se detectó la expresión de CX3CR1 en células Vero no infectadas (31-51% de las células) y células Vero infectadas con RSV (60-85% de las células) por citometría de flujo, y se detectó mRNA de CX3CR1 por análisis de protección contra RNasa. Los resultados de los ensayos de infectividad (Tabla 3) eran similares a los de los estudios de inhibición de la fijación de glicoproteína G (Tabla 2), en los cuales glicoproteína G, Fkn, péptido RT33, anticuerpo anti-CX3CR1 y heparina inhibían todos ellos la reducción de calvas, pero $\Delta + 1$, $\Delta - 1$, RT32 y los péptidos de glicoproteína RT34 (Tabla 4), y el suero normal de conejo tenían efecto mínimo a nulo. El aumento sobre la reducción de calvas asociada a heparina (66%) por la adición de glicoproteína G (98%), Fkn (97%), péptido RT33 (92%) y anticuerpo anti-CX3CR1 (91%), (Tabla 3) sugiere que RSV se fija a CX3CR1 por la glicoproteína G. Los péptidos que carecen del motivo CX3C (RT32, RT34) o con cambios en el motivo CX3C ($\Delta + 1$ y $\Delta - 1$) (Tabla 4) no aumentaban la reducción de calvas asociadas a heparina (Tabla 3).

Estas proteínas tenían efectos similares sobre la reducción de calvas utilizando un inóculo de RSV 10 a 100 veces mayor. La especificidad de la fijación de glicoproteína G a CX3CR1 estaba respaldada adicionalmente por la reducción de calvas después de tratamiento con anticuerpo anti-CX3CR1 solo (38%). La inhibición por los anticuerpos anti-CX3CR1 era comparable a la inhibición por el péptido RT33 solo (16%). Dado que el análisis de protección de RNA demostraba que la infección por RSV aumentaba la expresión de mRNA de CXCR4 (Figura 6), se realizó la reducción de calvas por SDF-1 α , un ligando para CXCR4, pero no se detectó efecto alguno sobre la formación de calvas de RSV (Tabla 3).

La glicoproteína G media la quimiotaxis de los leucocitos

Dado que la glicoproteína G es un ligando para CX3CR1, se testó si la misma podría actuar como mimético de Fkn para inducir la quimiotaxis leucocitaria de los leucocitos naíf de ratón^{39,40} y alterar posiblemente la quimiotaxis de los leucocitos mediada por Fkn. (Figura 3). Tanto Fkn como la glicoproteína G inducían índices de quimiotaxis similares (4,5-5,0 en una cámara Boyden modificada. Los anticuerpos CX3CR1 inhibían la quimiotaxis de los leucocitos hacia la glicoproteína G o hacia Fkn (índices de quimiotaxis 1,8-2,2). Además, la glicoproteína G inhibía la quimiotaxis de los leucocitos hacia Fkn aproximadamente en un 37% (índice de quimiotaxis 3,2), en tanto que Fkn inhibía la quimiotaxis de los leucocitos hacia la glicoproteína G aproximadamente en un 75% (índice de quimiotaxis 1,2). Adicionalmente, anti-glicoproteína G (131-2G) inhibía la quimiotaxis de los leucocitos hacia glicoproteína G (índice de quimiotaxis 1,1), pero no hacia Fkn (índice de quimiotaxis 4,8), y la quimiotaxis hacia glicoproteína G o Fkn no se veía afectada por tratamiento con anti-glicoproteína F (131-2A) (índices de quimiotaxis 3,9-4,8). Los resultados de estos estudios de inhibición sugieren que glicoproteína G y Fkn inducen quimiotaxis por un mecanismo similar.

Se observaron los resultados análogos en estudios de quimiotaxis examinando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana purificadas (Tabla 5). El porcentaje total de expresión positiva de CX3CR1 para todos los tipos de células en la población de PBMC antes de la quimiotaxis estaba comprendido entre 38 y 49%; sin embargo, durante la incubación a 37°C, la expresión de CX3CR1 disminuye, y al cabo de 2 horas después de la incubación está comprendida entre 21 y 37% de expresión, a las 4 horas después de la incubación está comprendida entre 11 y 26% de expresión y al cabo de 6 horas después de la incubación está comprendida entre 8 y 30% de expresión. La disminución de la expresión de CX3CR1 en PBMC durante la incubación refleja probablemente endocitosis del receptor y un reciclaje que es común entre los receptores de quimioquinas⁴¹. Al cabo de 6 horas después de la incubación en las cámaras de Boyden, el porcentaje de leucocitos CX3CR1⁺ que migraban hacia glicoproteína G o Fkn en la cámara Boyden inferior era mayor (25-30%) comparado con los leucocitos que quedaban en la cámara Boyden superior (7-11%). La quimiotaxis de los leucocitos hacia el péptido RT33 en la cámara Boyden inferior era moderada (intervalo 1,6-2,2). Los índices de quimiotaxis sustanciales para glicoproteína G y Fkn (3,0-3,7), la capacidad de la glicoproteína G y Fkn para reducir mutuamente la quimiotaxis por el otro, y la mayor expresión de CX3CR1 en los leucocitos quimiotácticos hacia glicoproteína G o Fkn 10 nM sugieren que tanto glicoproteína G como Fkn inducen quimiotaxis por mecanismos similares que implican CX3CR1. La adición de péptido RT33 1 μM a las cámaras Boyden superiores reducía la quimiotaxis tanto hacia glicoproteína G como hacia Fkn, pero los péptidos de glicoproteína G que carecían del motivo CX3C (Tabla 4) no reducían la quimiotaxis hacia G o Fkn.

Estudios realizados en ratones BALB/c naíf demuestran que G y Fkn reclutan también leucocitos *in vivo* (Figura 5B y Tabla 6). CX3CR1 se expresa en leucocitos de ratón y de rata, y por inmunoprecipitación se detectó CX3CR1 en esplenocitos naíf de ratón, una línea de células monocíticas de ratón (LADMAC), así como en una línea de células epiteliales humanas (HUT-292, datos no presentados). Los ratones BALB/c naíf se trataron por vía intranasal con glicoproteína G, Fkn o los péptidos RT32, RT33 y RT34 de glicoproteína G (Figura 2). El número total de células BAL recuperadas al cabo de 48 horas después del tratamiento se incrementaba por el tratamiento con Fkn, glicoproteína G o péptido RT33. Los números medios de células BAL (± SEM) recuperados después del tratamiento eran 3,8 (± 0,6) x 10⁵ células/ml para Fkn, 4,6 (± 1,1) x 10⁵ células/ml para glicoproteína G, y 3,5 (± 0,3) x 10⁵ células/ml para el péptido RT33, comparados con 2,2 (± 0,5) x 10⁵ células/ml para el péptido RT32 o 2,8 (± 0,2) x 10⁵ células/ml para el péptido RT34. Los macrófagos son el tipo de células predominante en las células BAL con indiferencia del tratamiento; sin embargo, el tratamiento con glicoproteína, Fkn y péptido RT33 daba como resultado el reclutamiento de un mayor porcentaje de PMNs y linfocitos al pulmón con relación al tratamiento con los péptidos RT32 o RT34.

Estos datos demuestran que la glicoproteína G tiene semejanzas estructurales con Fkn y se fija a las células de una manera similar a Fkn por CX3CR1 y GAG. La interacción entre glicoproteína G y las células por CX3CR1 parece tener al menos dos papeles importantes en la biología de la infección por RSV. En primer lugar, la interacción del motivo CX3C sobre la glicoproteína G con CX3CR1 en las células es capaz de modular la respuesta inmunitaria como se demuestra por la capacidad de la glicoproteína G para inducir la migración de los leucocitos en experimentos en cámara Boyden. En segundo lugar, la fijación de glicoproteína G por CX3CR1 facilita la infección. La especificidad de la interacción de glicoproteína G con CXCR3 se analizó por ensayos de fijación y de inhibición de la fijación en células 293-CX3CR1, y por dos ensayos funcionales, los ensayos de reducción de calvas de RSV y de migración e inhibición de la migración de los leucocitos. Los resultados de estos ensayos demuestran que la fijación incrementada de glicoproteína G está correlacionada con la expresión incrementada de CX3CR1 en las células 293-CX3CR1, e indicaban consistentemente que la glicoproteína G se fija a CX3CR1 por la vía del motivo CX3C. Los resultados consistentes de tres preparaciones diferentes de glicoproteína G examinadas, el uso de anticuerpos monoclonales anti-glicoproteína G para detectar o inhibir la fijación a las células 293-CX3CR1, y la migración de los leucocitos hacia la glicoproteína G demuestran el papel específico de la glicoproteína G. Los estudios de inhibición con reactivos que se sabe se fijan a CX3CR1 (Fkn, el polipéptido ¹²⁵I-Fkn, suero de conejo anti-CX3CR1 y un anticuerpo monoclonal anti-CX3CR1) respaldan el papel específico de CX3CR1 en esta interacción. Los estudios de inhibición con péptidos de glicoproteína G con o sin el motivo CX3C indican que la interacción de la glicoproteína G con CX3CR1 ocurre, como era de esperar, a través del motivo CX3C en la glicoproteína G. Los datos presentados en esta memoria indican también que gran parte de la fijación de glicoproteína G y RSV a las células ocurre por interacción HBD-GAG, y que la fijación restante a las células ocurre principalmente por fijación de glicoproteína G a CX3CR1.

La fijación de la glicoproteína G de RSV a CX3CR1 en la superficie de las células facilita la infección de las células por RSV. Estos datos demuestran que CX3CR1 así como GAG son receptores para la infección de RSV y que la fijación del virus a CX3CR1 por el motivo CX3C en la glicoproteína G explica algo y posiblemente la totalidad de la fijación a las células no asociada a GAG.

5

A lo largo de esta solicitud, se citan diversas publicaciones.

Referencias

- 10 1. **Chanock, R. M., Parrott, R. H., Connors, M., Collins, P. L. & Murphy, B. R.** Serious respiratory tract disease caused by respiratory syncytial virus: prospects for improved therapy and effective immunization. *Pediatrics* **90**, 137-143 (1992).
- 15 2. **Fixler, D. E.** Respiratory syncytial virus infection in children with congenital heart disease: a review. *Ped. Cardiol.* **17**, 163-168 (1996).
3. **McIntosh, K. & Fishaut, J. M.** Immunopathologic mechanisms in lower respiratory tract disease of infants due to respiratory syncytial virus. *Prog. Med. Viro.* **26**, 94-118 (1980).
- 20 4. **Hall, C. B.** Respiratory syncytial virus: A continuing culprit and conundrum. *J. Ped.* **135**, 2-7 (1999).
5. **Chin, J., Magoffin, R. L., Shearer, L. A., Schieble, J. H. & Lennette, E. H.** Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *Am. J. Epidemiol.* **89**, 449-463 (1969).
- 25 6. **Weibel, R. E., Stokes, J., Jr., Leagus, M. B., Mascoli, C. C. & Hilleman, M. R.** Respiratory virus vaccines. V. Field evaluation for efficacy of heptavalent vaccine. *A.m. Rev. Resp. Dis.* **94**, 362-379 (1966).
- 30 7. **Connors, M., Collins, P. L., Firestone, C.-Y. and Murphy, B. R.** Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J. Virol.* **65**: 1634-1637 (1991).
8. **Stott, E. J., et al.** Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **61**, 3855-3861 (1987).
- 35 9. **Groothuis, J. R., King, S. J., Hogerman, D. A., Paradiso, P. R. & Simoes, E. A.** Safety and immunogenicity of a purified F protein respiratory syncytial virus (PF2) vaccine in seropositive children with bronchopulmonary dysplasia. *J. Infect. Dis.* **177**, 467-469 (1998).
- 40 10. **Olmsted, R. A., et al.** Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **83**, 7462-7466 (1986).
- 45 11. **Bright, H., Turnbull, T., Toms, G. L. & Scott, R.** Comparison of the T helper cell response induced by respiratory syncytial virus and its fusion protein in BALB/c mice. *Vaccine* **13**, 915-922 (1995).
12. **Graham, B. S., et al.** Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *J. Immunol.* **151**, 2032-2040 (1993).
- 50 13. **Srikiatkhachorn, A. & Braciale, T. J.** Virus-specific memory and effector T lymphocytes exhibit different cytokine responses to antigens during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J. Virol.* **71**, 678-685 (1997).
- 55 14. **Kurt-Jones, et al.** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunol.* **1**, 398-401 (2000).
15. **Openshaw, P. J.** Immunity and immunopathology to respiratory syncytial virus. The mouse model. *Amer. J. Respir. & Crit. Care Med.* **152**, S59-62 (1995).
- 60 16. **Johnson, T. R., et al.** Priming with secreted glycoprotein G of respiratory syncytia virus (RSV) augments interleukin-5 production and tissue eosinophilia after RSV challenge. *J. Virol.* **72**, 2871-2880 (1998).
17. **Hancock, G. E., et al.** Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in BALB/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **70**, 7783-7791 (1996).
- 65 18. **Sparer, T. E., et al.** Eliminating a region of respiratory syncytial virus attachment protein allows induction of protective immunity without vaccine-enhanced lung eosinophilia. *J. Exp. Med.* **187**, 1921-1926 (1998).

19. **Tebbey, P., Hagen, M. & Hancock, G.** Atypical pulmonary eosinophilia is mediated by a specific amino acid sequence of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* **188**, 1967-1972 (1998).
20. **Tripp, R. A. et al.** Respiratory syncytial virus (RSV) G and/or SH proteins alter Th1 cytokines, natural killer cells and neutrophils responding to pulmonary infection in BALE/c mice. *J. Virol.* **73**, 7099-7107 (1999).
21. **Tripp, R. A., Jones, L. & Anderson, L. J.** Respiratory syncytial virus G and/or SH glycoproteins modify CC and CXC chemokine mRNA expression in the BALB/c mouse. *J. Virol.* **74**, 6227-6229 (2000).
22. **Feldman, S. A., Hendry, R. M. & Beeler, J. A.** Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J. Virol.* **73**, 6610-6617 (1999).
23. **Witt, D. P. & Lander, A. D.** Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr. Biol.* **4**, 394-400 (1994).
24. **Driscoll, K. E.** Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp. Lung Res.* **20**, 473-490 (1994).
25. **Lalani, A. S., et al.** The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *J. Virol.* **71**, 4356-4363 (1997).
26. **Koopmann, W., Ediriwickrema, C. & Krangel, M. S.** Structure and function of the glycosaminoglycan binding site of chemokine macrophage-inflammatory protein-1 beta. *J. Immunol.* **163**, 2120-2127 (1999).
27. **Johnson, P. R., Spriggs, M. K., Olmsted, R. A. & Collins, P. L.** The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **84**, 5625-5629 (1987).
28. **Melero, J.A., Garcia-Barreno, B., Martinez, I., Pringle, C.R., & Cane, P.A.** Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J. Gen. Virol.* **75**, 2411-2418 (1997).
29. **McDermott, D.H., & Murphy, P.M.** Chemokines and their receptors in infectious disease. *Springer Sent. Immunopathol.* **22**, 393-415 (2000).
30. **Loetscher, P., Moser, B. & Baggiolini, M.** Chemokines and their receptors in lymphocyte trafficking and HIV infection. *Adv. Immunol.* **74**, 127-180 (2000).
31. **Beisser, P.S., et al.** Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes. *J. Virol.* **75**, 5949-5957.
32. **Endres, M.J., Garlisi, C.G., Xiao, H., Shan, L. & Hendrick, J.A.** The Kaposi's sarcoma-related herpesvirus (KHSV)-encoded chemokine vMIP-1 is a specific agonist for the CC chemokine receptor (CCR)8. *J. Exp. Med.* **189**, 1993-8 (1999).
33. **Combadiere, C., et al.** Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV- I. *J. Biol. Chem.* **273**, 23799-23804 (1998).
34. **Anderson, L. J., et al.** Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* **15**, 626-633 (1985).
35. **Sullender, W.** Antigenic analysis of chimeric and truncated RSV G glycoproteins of respiratory syncytial virus. *Viol.* **209**, 70-79 (1995).
36. **Combadiere, C., Gao, J., Tiffany, H. L. & Murphy, P. M.** Gene cloning, RNA distribution, and functional expression of mCX3CR1, a mouse chemotactic receptor fo the CX3C chemokine fractalkine. *Bio. & Bioplzys. Res. Comm.* **253**, 728-732 (1998).
37. **Bourgeois, C., Bour, J. B., Lidholt, K., Gauthray, C. & Pothier, P.** Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity *in vitro*. *J. Virol.* **72**, 7221-7227 (1998).
38. **Hallak, L. K., Collins, P. L., Knudson, W. & Peebles, M. E.** Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. *Viol.* **271**, 264-275 (2000).
39. **Schall, T.** Fractalkine-a strange attractor in the chemokine landscape. *Immunol. Today* **18**, 147-152 (1997).
40. **Fong, A. M. et al.** Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J. Exp. Med.* **188**, 1413-1419 (1998).

41. **Pelchen-Matthews, A., et al.** Chemokine receptor trafficking and viral replication. *Immunol Rev.* **168**, 33-49 (1999).
42. **Karron, R. A. et al.** Respiratory syncytial virus (RSV) SH and RSV G glycoproteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **94**, 13961-1396 (1997).
43. **Feldman, S. A., Audet, S. & Beeler, J. A.** The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparin sulfate. *J. Virol.* **74**, 6442-6447 (2000).
44. **Roder, C., Krusat, T., Reimers, K., & Werchu, H.** Purification of respiratory syncytial virus F and RSV G glycoproteins. *J. Chromat.* **737**: 97-106 (2000).
45. **Tripp, R. A., Moore, D., Winter, J. & Anderson, L. J.** Respiratory syncytial virus infection and G and/or SH protein expression contribute to substance P, which mediates inflammation and enhanced pulmonary disease in BALB/c mice *J. Virol.* **74**, 1614-162 (2000).
46. **Boyden, S.** The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* **115**, 453-466 (1962).
47. *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Martin, E.W., ed., latest edition), Mack Publishing Co., Easton, PA.
48. **Michieli, P., Li, W., Lorenzi, M. V., Miki, T., Zakut, R., Givol, D., and Pierce, J. H.** *Oncogene* **12**, 775-784, 1996.
49. **Sambrook et al.,** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
50. U.S. Patent 4,704,36
51. **Brake et al.,** 1984. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* **82**:4642-4646.
52. **Kearney et al.,** *J. Immunol.* **123**:1548-1558 (1979).
53. **Jones et al.,** *Nature* **321**:522-525 (1986) or **Tempest et al.** *Biotechnology* **9**: 266-273 (1991).

TABLA 1

Fijación de glicoproteína G y Fkn a las células 293 y 293-CX3CR1

	<u>Fijación máxima de Fkn (%)[*]</u>			
	<u>10 nM</u>	<u>1 nM</u>	<u>100 pM</u>	<u>10 pM</u>
Glicoproteína G	88	87	80	40
Fkn	98	99	98	46

El porcentaje de fijación máxima de Fkn se calculó utilizando la ecuación:

$$\frac{[\% \text{ G (o Fkn) } 293\text{-CX3CR1}] - [\% \text{ G (o Fkn) } 293]}{[\% \text{ Fkn (10nM) } 293\text{-CX3CR1}] - [\% \text{ Fkn (10nM) } 293]}$$
 donde G = Glicoproteína G, Fkn = fractalquino, 293-CX3CR1 = 293 transfectadas con CX3CR1, 293 = 293 no transfectadas. La concentración de glicoproteína G se estimó utilizando un peso molecular de 90 kD.

ES 2 316 487 T3

TABLA 2

Porcentaje de inhibición de la fijación de glicoproteína G y Fkn a las células 293-CX3CR1 por glicoproteína G, Fkn, glicoproteína G, anticuerpos, (sic) péptidos RT32, RT33, RT34, • +1, • -1, y diferentes quimioquinas en presencia y/o ausencia de heparina

	Inhibidor	Intervalo de inhibición (%)	
		Glicoproteína G	Fkn
5			
10	Anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G	86 - 92	0 - 4
	Suero anti-CX3CR1	88 - 93	90 - 97
15	Anticuerpo monoclonal anti-CX3CR1	88 - 94	88 - 92
	Glicoproteína G (1µM)	---	50 - 58
	Glicoproteína G (10 nM)	---	32 - 38
20	Glicoproteína G (100 pM)	---	5 - 8
	Fkn (1 µM)	20 - 34	---
	Fkn (10 nM)	8 - 15	---
25	Fkn (100 pM)	2 - 5	---
	RT33 (1 µM)	35 - 42	18 - 27
	Δ-1 (1 µM)	8 - 12	0 - 4
30	Δ+1(1 µM)	16 - 22	0 - 8
	RT32 (1µM)	8 - 14	6 - 12
	RT34 (1 µM)	4 - 18	6 - 14
35	Heparina (5 µg/ml)	78 - 84	57 - 65
	Heparina (5 µg /ml) + Fractalquino (10 nM)	85 - 98	---
	Heparina (5 µg /ml) + RT33 (1µM)	85 - 94	70 - 80
	Heparina (5 µg/ml) + Glicoproteína G (10 nM)	---	80 - 85
40	Heparina (5 µg /ml) + Glicoproteína G (10 nM)+ RT33 (1µM)	---	82 - 90
	Heparina (5 µg /ml) + RT32 (1µM)	75 - 82	52 - 66
45	Heparina (5 µg /ml) + RT34 (1µM)	80 - 85	60 - 64
	Heparina (5 µg /ml) + Δ-1 (1µM)	76 - 82	60 - 67
	Heparina (5 µg/ml) + Δ+1 (1µM)	80 - 88	50 - 65
50	Sueros normales de conejo	6 - 10	5 - 14
	Sueros de conejo anti-CCR5	5 - 12	5 -12
	MIP-2 (10 µM)	2 - 8	0 - 4
	C10 (10 µM)	5 - 8	4 - 8
55	KC (10 µM)	0 - 6	4 - 6
	IP-10 (10 µM)	0 - 4	0 - 6

60 Inhibición de la fijación de Fkn y glicoproteína G a las células 293-CX3CR1 por tratamiento con anticuerpos monoclonales para glicoproteína G o CX3CR1, o tratamiento con glicoproteína G, Fkn, o péptidos de glicoproteína G en presencia o ausencia de heparina como se describe en los métodos. La fijación de Fkn y glicoproteína G a las células 293-CX3CR1 era inhibida utilizando 5-50 µg/ml de heparina. La concentración de glicoproteína G se estimó utilizando un peso molecular de 90 kD.

65

ES 2 316 487 T3

TABLA 3

Reducción de calvas de RSV por glicoproteína G, fractalquino, péptidos de glicoproteína G, anticuerpo anti-CX3CR1, factor-1-alfa derivado de células estromales (SDF-1●) y/o heparina en células Vero

5	<u>Tratamiento</u>	<u>Concentración</u>	<u>Inhibición de calvas (%)</u>	<u>Valor p</u>
	Glicoproteína G	100 nM	61	0,01 ^a
10	Glicoproteína G	10 nM	49	
	Glicoproteína G	1 nM	0	
	Fkn	10 nM	80	0,01 ^b
15	Fkn	1 nM	31	
	Fkn	100 pM	0	
	Glicoproteína G + Fkn	100 nM + 10 nM	88	0,03 ^c
20	Δ + 1	1 μM	30	0,05 ^d
	Δ - 1	1 μM	0	
25	RT32	1 μM	2	0,10 ^e
	RT33	1 μM	71	0,01 ^f
	RT34	1 μM	6	0,08 ^g
30	Heparina	5 μg/ml	66	0,01 ^h
	Heparina + Glicoproteína G	5 μg/ml + 100 nM	98	0,02 ⁱ
	Heparina + Fkn	5 μg/ml + 10 nM	97	0,02 ^j
35	Heparina + RT33	5 μg/ml + 1 μM	92	0,03 ^k
	Heparina + RT32	5 μg/ml + 1 μM	64	0,10 ^l
	Heparina + RT34	5 μg/ml + 1 μM	70	0,10 ^m
40	Heparina + Δ+1	5 μg/ml + 1 μM	58	0,10 ⁿ
	Heparina + Δ-1	5 μg/ml + 1 μM	68	0,10 ^o
	Anticuerpo anti-CX3CR1	policlonal	38	0,02 ^p
	Anticuerpo anti-CX3CR1 + heparina	5 μg/ml	91	0,03 ^q
45	Sueros normales de conejo	5 μg/ml	6	
	SDF- 1α	100 nM	12	0,10 ^r
50	SDF- 1α	10 nM	7	
	SDF- 1α	1 nM	5	

55 Reducción de calvas de RSV después de tratamiento con glicoproteína G, Fkn, péptidos de glicoproteína G, anticuerpo anti-CX3CR1, SDF-1-● y/o heparina como se describe en los métodos. El porcentaje de inhibición se determinó a partir de las uni-

60

65

ES 2 316 487 T3

5 dades formadoras de calvas (pfu) medias de células Vero tratadas frente a las células
Vero tratadas con solución salina utilizando una dilución de RSV que produciría 40-80
6 pfu. Los valores p se determinaron utilizando análisis no apareados de dos colas don-
de $p < 0,05$ es significativo. La concentración de glicoproteína G se estimó utilizando
10 un peso molecular de 90 kD.

15 ^a valor p comparativo de la inhibición de la glicoproteína G con la inhibición de medios
de cultivo de tejidos (TCM).

^b valor p comparativo de la inhibición de Fkn con la inhibición de TCM.

20 ^c valor p comparativo de la inhibición de Glicoproteína G + Fkn con la inhibición de
Glicoproteína G.

^d valor p comparativo de la inhibición de $\Delta+1$ con la inhibición de TCM.

25 ^e valor p comparativo de la inhibición de RT32 con la inhibición de TCM.

^f valor p comparativo de la inhibición de RT33 con la inhibición de TCM.

30 ^g valor p comparativo de la inhibición de RT34 con la inhibición de TCM.

^h valor p comparativo de la inhibición de heparina con la inhibición de TCM.

35 ⁱ valor p comparativo de la inhibición de heparina + glicoproteína G con la inhibición de
heparina.

^j valor p comparativo de la inhibición de heparina + Fkn con la inhibición de heparina .

40 ^k valor p comparativo de la inhibición de heparina + péptido RT33 con la inhibición de
heparina.

45 ^l valor p comparativo de la inhibición de RT32 + heparina con la inhibición de hepari-
na.

^m valor p comparativo de la inhibición de RT34 + heparina con la inhibición de hepari-
na.

50 ⁿ valor p comparativo de la inhibición de $\Delta+1$ + heparina con la inhibición de heparina.

^o valor p comparativo de la inhibición de $\Delta-1$ + heparina con la inhibición de heparina.

55 ^p valor p comparativo de la inhibición del anticuerpo anti-CX3CR1 con la inhibición de
suero normal de conejo.

60 ^q valor p comparativo de la inhibición del anticuerpo anti-CX3CR1 + heparina con la
inhibición de heparina.

^r valor p comparativo de la inhibición de SDF-1• con la inhibición de TCM.

65

ES 2 316 487 T3

TABLA 4

Localización del motivo CX3C en la glicoproteína G

Secuencia parcial de aminoácidos de la glicoproteína G:

171
182 186
201 (posición del aminoácido)
 ...VPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKKT~~TT~~TKP...

RT32: VPCSICSNNPTC
RT33: TCWAICKRIPNK
RT34: NKKPGKKT~~TT~~TKP
Δ-1 : TCWA ~~C~~KRIPNK
Δ+1 : TCWAIACKRIPNK

La localización del motivo CX3C (CWAIC) en la glicoproteína G comparada con péptidos de glicoproteína G fuera del motivo CX3C (RT32 y RT34), que contienen el motivo CX3C (RT33) o con péptidos que contienen una deleción (• -1) o inserción (• +1) de aminoácido.

TABLA 5

Quimiotaxis de los leucocitos y porcentaje de expresión positiva de CX3CR1 para células mononucleares de sangre periférica humana quimiotácticas hacia glicoproteína G, Fkn y péptido RT33 de glicoproteína G en presencia o ausencia del péptido RT33

	<u>Expresión de CX3CR1 (%)</u>		<u>Índices de quimiotaxis</u>
	<u>Superior</u>	<u>Inferior</u>	
TCM/Glicoproteína G	8-11	25-30	3,0 - 3,6
TCM/Fkn	7- 8	26-30	3,2 - 3,7
TCM/RT33	11-16	16-18	1,6 - 2,2
RT33/Glicoproteína G	16-18	9-14	1,5 - 2,0
RT33/Fkn	16-21	6-14	1,8 - 2,2

Se determinaron la quimiotaxis de los leucocitos y el porcentaje de expresión positiva de CX3CR1 en PBMC humanos después de un ensayo de 6 horas de quimiotaxis . Se muestran los porcentajes de células positivas para CX3CR1 en las cámaras Boyden modificadas superiores e inferiores. Los índices de quimiotaxis se determinaron a partir del número de veces de aumento de la migración de los leucocitos hacia el quimioatrayente, es decir Fkn, glicoproteína G o péptido RT33, sobre la migración de los leucocitos hacia medio solo. TCM = medio de cultivo de tejidos.

ES 2 316 487 T3

TABLA 6

Tratamientos	Porcentaje de células BAL determinado por tinción con H&E ⁱ			
	Macrófago	PMN	Eosinófilo	Linfocito
Glicoproteína G	68+10	22±4	0±0	10±3
Fractalquino	71+10	16+5	0±0	10±3
RT32	94+5	2+7	0±0	12+4
RT33	76+8	16+6	0±0	4+7
RT34	86+8	8+3	0±0	8+2

Tratamientos	Porcentaje de células BAL determinado por citometría de flujo ^j					
	DX5	RB6-8C5	CD1 1 b	B220	CD4	CD8
Glicoproteína G	9±6	10±4	12±5	5±4	8±2	4±3
Fractalquino	17±8	10±6	12±4	6±2	16±4	6±2
RT32	2±1	2±2	3±2	3±2	2±2	24-7
RT33	10±2	12	10±4	4±2	10±2	4±2
RT34	6±2	6±4	3±1	4±2	6±2	3±3

ⁱ Se fijaron células BAL y se tiñeron con H&E. Los porcentajes de las diferentes células se determinaron para > 200 células/portaobjetos contando dos portaobjetos para cada experimento. El porcentaje del tipo de células representa la mediana ± SE de dos experimentos separados.

^j Se utilizó citometría de flujo para determinar el porcentaje de tipos de células en las células BAL el día 2 posterior al tratamiento. Se analizaron 10.000 sucesos no acotados por ventanas para células DX5+, RB6-8C5+, y CD11b+, y se utilizó una ventana de linfocitos para analizar las células B220+, CD4+, y CD8+.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una molécula bloqueante que inhibe la actividad biológica de un motivo CX3C de una glicoproteína G del virus respiratorio sincitial, en donde C es un residuo cisteína y X es cualquier residuo de aminoácido distinto de cisteína, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ó 11, o un anticuerpo generado contra un péptido que tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ó 11, para inhibir la fijación de la glicoproteína G del virus respiratorio sincitial a un receptor CX3CR1, en donde el anticuerpo se fija específicamente a las posiciones de los aminoácidos 182-186 de una glicoproteína G nativa del virus respiratorio sincitial o bloquea la actividad asociada con la fijación al receptor CX3CR1.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante se fija al virus respiratorio sincitial.

3. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un anticuerpo que se fija al motivo CX3C de la glicoproteína G de RSV o que se fija en posición proximal al motivo CX3C y altera una estructura secundaria del motivo o bloquea estéricamente la fijación de la glicoproteína G del virus respiratorio sincitial a un receptor de CX3C o la actividad biológica asociada con la fijación de la glicoproteína G del virus respiratorio sincitial a un receptor de CX3C.

4. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante se fija al receptor de CX3C.

5. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene la secuencia TCAAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 5).

6. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene la secuencia TCWAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 6).

7. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene la secuencia TCNAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 7).

8. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene la secuencia TCDAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 8).

9. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene la secuencia TCHAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 9).

10. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene la secuencia TCMAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 10).

11. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene la secuencia TCFAACKRIPNKK (SEQ ID NO: 11).

12. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene la secuencia TCWAICKRIPNK (SEQ ID NO: 3).

13. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un péptido que tiene la secuencia NKKPGKTTTKP (SEQ ID NO: 4).

14. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un anticuerpo que se fija al péptido que tiene la secuencia TCWAICKRIPNK (SEQ ID NO: 3).

15. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula bloqueante es un anticuerpo que se fija al péptido que tiene la secuencia NKKPGKTTTKP (SEQ ID NO: 4).

16. La composición de la reivindicación 1, en donde la actividad biológica es quimiotaxis, migración celular o adherencia de virus a las células.

17. Un virus respiratorio sincitial que comprende un motivo CX3C de la glicoproteína G respiratoria sincitial que no es funcional para la fijación del virus a un receptor CX3CR1 en una célula, en donde C es un residuo cisteína y X es cualquier aminoácido distinto de cisteína.

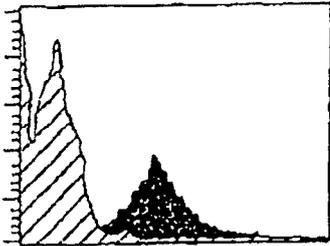
18. El virus respiratorio sincitial de la reivindicación 17, en donde el virus es un virus vivo.

19. El virus respiratorio sincitial de la reivindicación 17, en donde el virus es un virus no vivo.

20. Una composición que comprende un péptido como se define en la reivindicación 1 para uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un individuo.

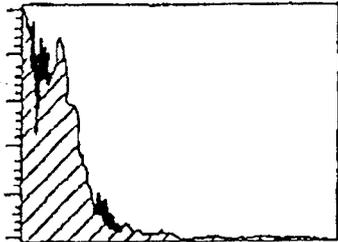
ES 2 316 487 T3

21. Un método *in vitro* para identificar una sustancia útil para el tratamiento o la prevención de la enfermedad del virus respiratorio sincitial, que comprende poner en contacto la sustancia con un receptor de CX3C, en presencia de la glicoproteína G del virus respiratorio sincitial, y detectar la inhibición de la fijación de la glicoproteína al receptor CX3C, en donde la detección de la inhibición de la fijación de la glicoproteína G del virus respiratorio sincitial al receptor CX3C identifica una sustancia útil para el tratamiento o la prevención de la enfermedad del virus respiratorio sincitial.
22. El método de la reivindicación 21, en donde la sustancia se fija al motivo CX3C de la glicoproteína G del virus respiratorio sincitial.
23. El método de la reivindicación 21, en donde la sustancia se fija al receptor CX3C.
24. Un método *in vitro* para identificar una sustancia para el tratamiento o la prevención de la enfermedad del virus respiratorio sincitial, que comprende poner en contacto la sustancia con una célula que contiene un receptor de CX3C, en presencia del virus respiratorio sincitial, y detectar la inhibición de una actividad biológica asociada con la fijación del virus respiratorio sincitial al receptor CX3C, en donde la detección de la inhibición de una actividad biológica asociada con la fijación del virus respiratorio sincitial al receptor de CX3C identifica una sustancia útil para el tratamiento o la prevención de la enfermedad del virus respiratorio sincitial.
25. Una composición que comprende un péptido como se define en la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la infección del virus respiratorio sincitial en un individuo infectado con el virus respiratorio sincitial.
26. Una composición que comprende un anticuerpo de la glicoproteína G anti-RSV, anticuerpo que inhibe la fijación de la glicoproteína G del virus respiratorio sincitial a un receptor CX3CR1, para uso en el tratamiento de la infección por el virus respiratorio sincitial en un individuo infectado con el virus respiratorio sincitial.
27. Una composición de la reivindicación 14 ó 15 para uso en el tratamiento de la infección del virus respiratorio sincitial en un individuo infectado con el virus respiratorio sincitial.
28. Uso del virus respiratorio sincitial de la reivindicación 17 para preparar una composición para prevención de la infección con el virus respiratorio sincitial en un individuo.
29. Uso de la composición de la reivindicación 1 para preparar una composición para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo, en donde la preparación comprende una cantidad inmunógena de la composición de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
30. Uso de la composición de la reivindicación 14 para preparar una composición para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo, en donde la preparación comprende una cantidad inmunógena de la composición de la reivindicación 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
31. Uso de la composición de la reivindicación 15 para preparar una composición para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo, en donde la preparación comprende una cantidad inmunógena de la composición de la reivindicación 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
32. Uso de un virus de la reivindicación 17 para preparar una composición para inducción de una respuesta inmunitaria en un individuo, en donde la preparación comprende una cantidad inmunógena del virus de la reivindicación 17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
33. El virus respiratorio sincitial de la reivindicación 17, en donde el virus comprende una mutación por delección en la secuencia de aminoácidos del motivo CX3C.
34. El virus respiratorio sincitial de la reivindicación 17, en donde la secuencia de aminoácidos del motivo CX3C está delecionada.
35. El virus respiratorio sincitial de la reivindicación 17, en donde el virus comprende una mutación de inserción en la secuencia de aminoácidos del motivo CX3C.
36. Uso de un virus de las reivindicaciones 33, 34 ó 35 para preparar una composición para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo, en donde la preparación comprende una cantidad inmunógena del virus de las reivindicaciones 33, 34 ó 35 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.



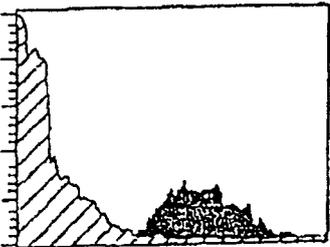
293-CX3CR1 + FKN

FIG. 1A



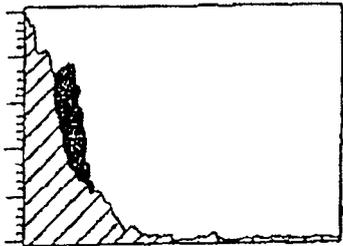
293 + FKN

FIG. 1B



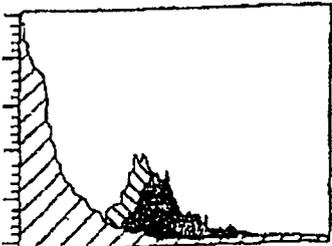
293-CX3CR1 + G

FIG. 1C



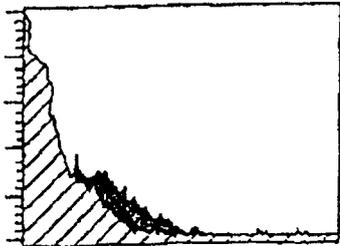
293 + G

FIG. 1D



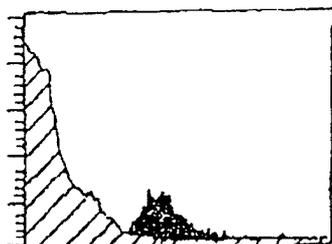
293-CX3CR1 + G
+ RT32 + RT34

FIG. 1E



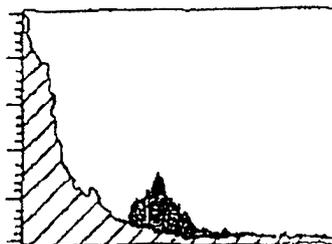
293-CX3CR1 + G
+ RT33

FIG. 1F



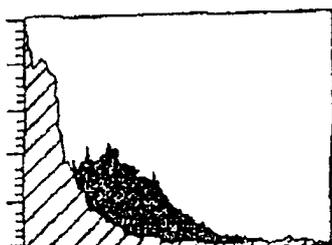
293-CX3CR1 + G
+ ($\Delta+1$)

FIG. 1G



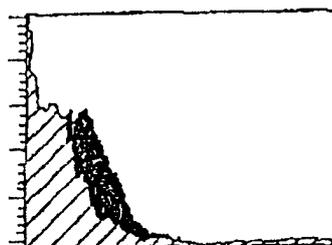
293-CX3CR1 + G
+ ($\Delta-1$)

FIG. 1H



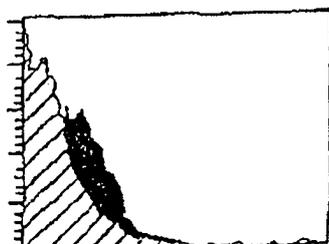
293-CX3CR1 + GHIS

FIG. 1I



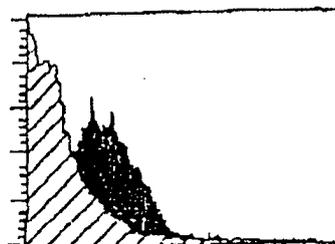
293 + GHIS

FIG. 1J



293-CX3CR1 + GHIS
+ 131-2G

FIG. 1K



293-CX3CR1 + GHIS
+ 131-2A

FIG. 1L

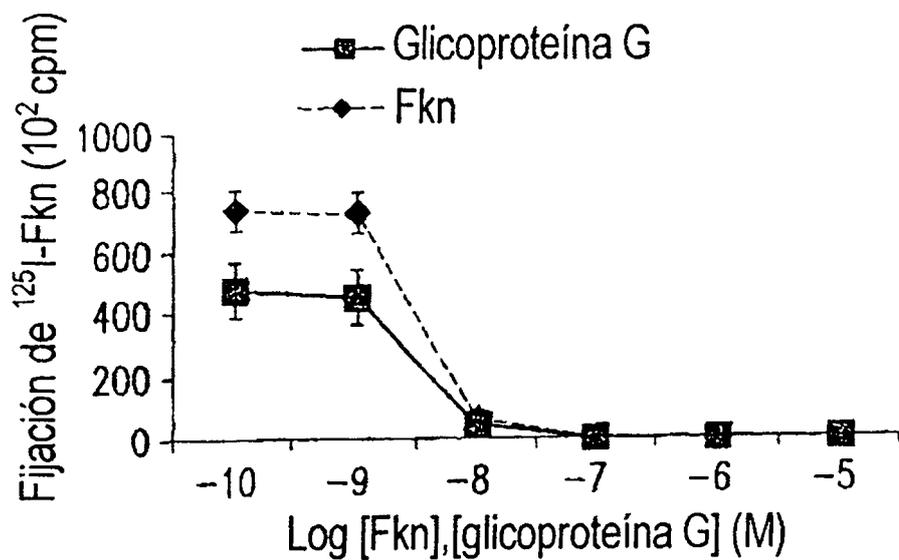


FIG. 2A

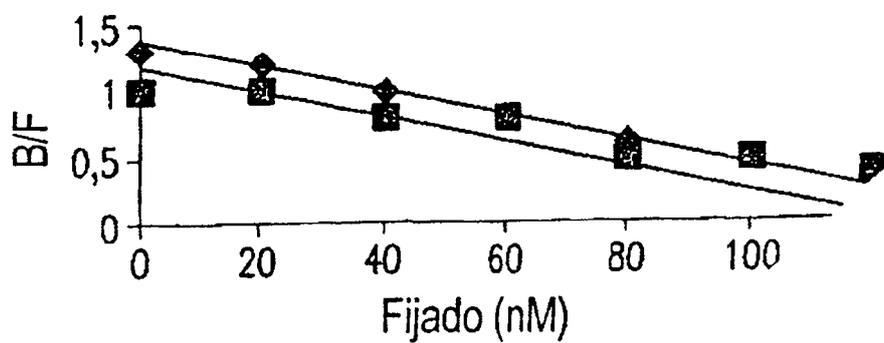


FIG. 2B

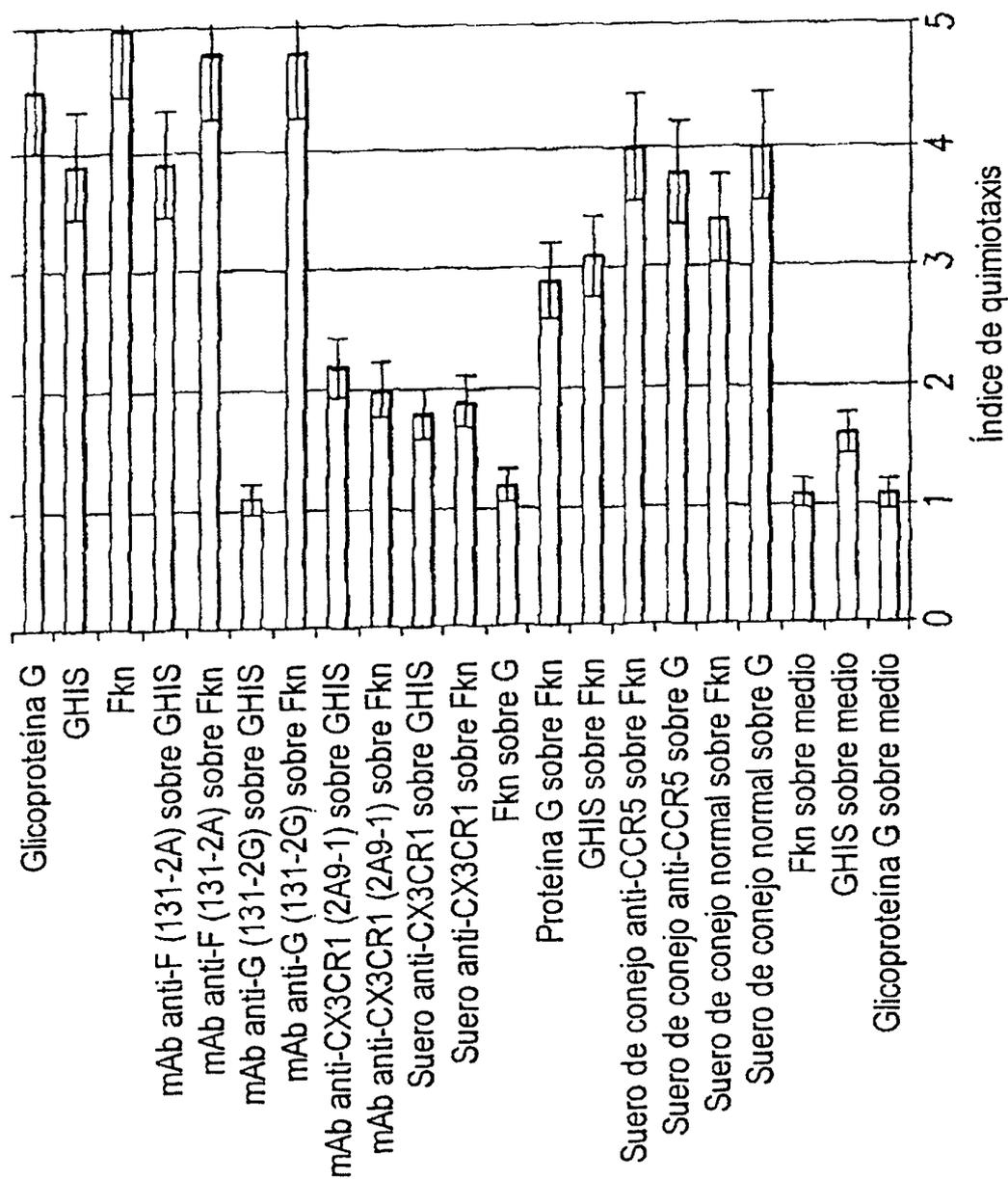


FIG.3

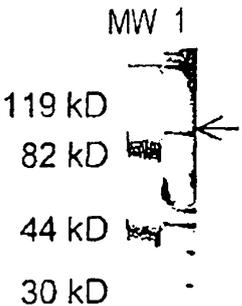


FIG.4A

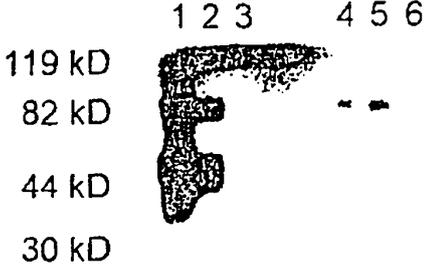


FIG.4B

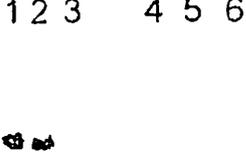


FIG.4C

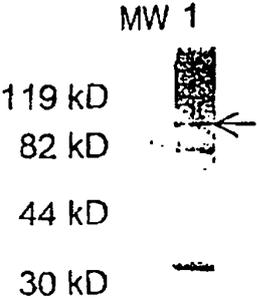


FIG.4D

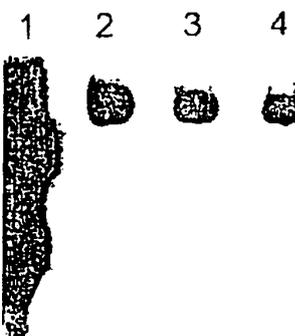


FIG.4E

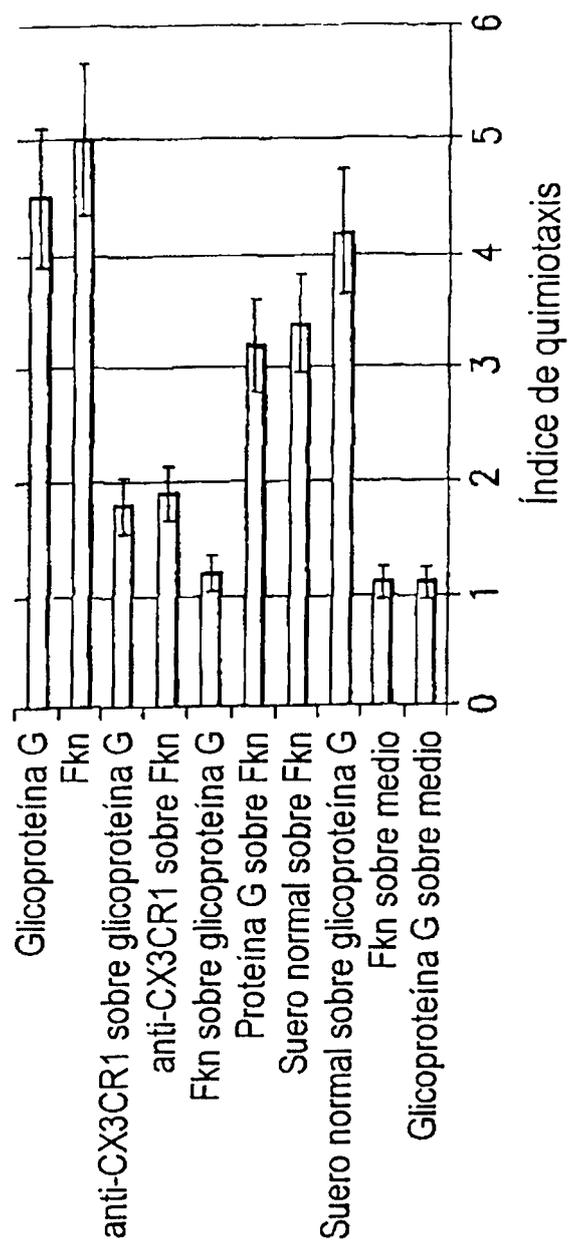


FIG. 5A

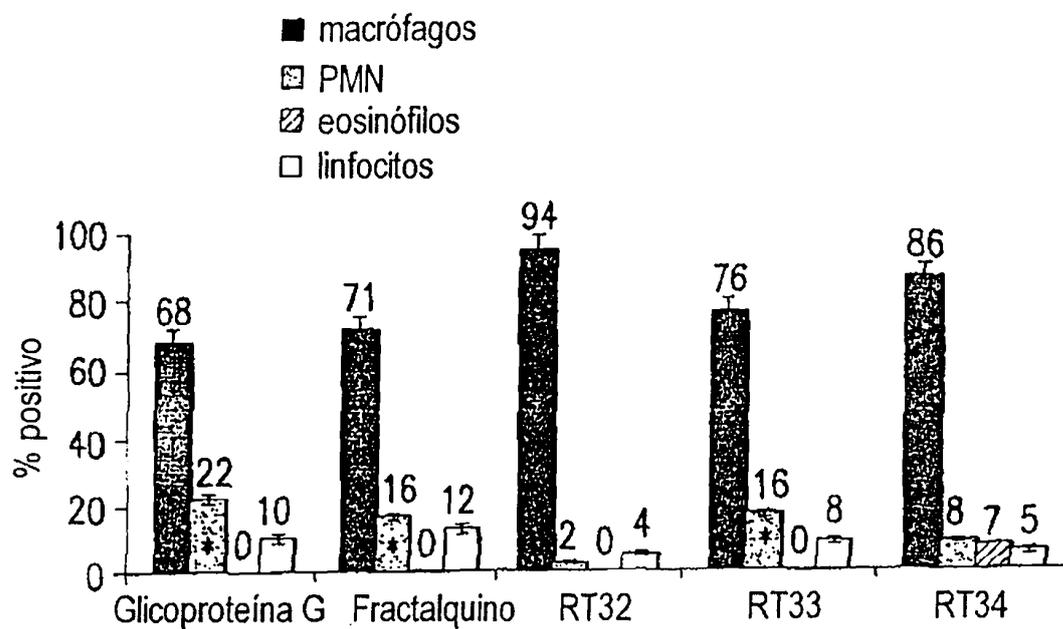


FIG. 5B

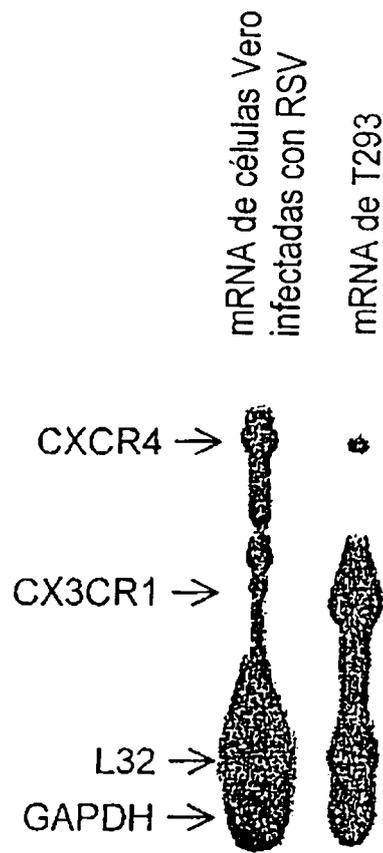


FIG.6

ES 2 316 487 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> El gobierno de los Estados Unidos de América, representado por The Secretary, Department of Health and Human Services
TRIPP, RALPH A.
JONES, LES
ANDERSON, LARRY J.
- 10 <120> “COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MODULAR LA INFECCIÓN POR RSV Y LA INMUNIDAD”
- <130> 14114.0348P1
- 15 <140> 160/241.521
<141> 2000-10-18
- <160> 11
- 20 <170> FastSEQ para Windows Version 4.0
- <210> 1
- 25 <211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción sintética
- <400> 1
- 35
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Pro | Cys | Ser | Ile | Cys | Ser | Asn | Asn | Pro | Thr | Cys | Trp | Ala | Ile | Cys |
| 1 | | | 5 | | | | 10 | | | | | | | 15 | |
| Lys | Arg | Ile | Pro | Asn | Lys | Lys | Pro | Gly | Lys | Lys | Thr | Thr | Thr | Lys | Pro |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | |
- 40
- <210> 2
- 45 <211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
<223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética
- <400> 2
- 55
- | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Pro | Cys | Ser | Ile | Cys | Ser | Asn | Asn | Pro | Thr | Cys |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | |
- 60 <210> 3
<211> 12
<212> PRT
- 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 316 487 T3

<220>

<223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética

5 <400> 3

Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
1 5 10

10

<210> 4

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética

<400> 4

25 Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro
1 5 10

30 <210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética

40 <400> 5

Thr Cys Ala Ala Ala Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
1 5 10

45

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética

55

<400> 6

Thr Cys Trp Ala Ala Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
1 5 10

60

<210> 7

65 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 316 487 T3

<220>

<223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética

5 <400> 7

Thr Cys Asn Ala Ala Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
1 5 10

10

<210> 8

<211> 13

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética

<400> 8

25 Thr Cys Asp Ala Ala Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
1 5 10

30 <210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética

40 <400> 9

Thr Cys Asp Ala Ala Ala Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
1 5 10

45

<210> 10

<211> 13

50 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética

<400> 10

60 Thr Cys Met Ala Ala Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
1 5 10

<210> 11

65 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 316 487 T3

<220>

<223> Nota: Descripción de la Secuencia Artificial = Construcción Sintética

5 <400> 11

Thr Cys Phe Ala Ala Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
1 5 10

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65