

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 649**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04819114 .2**
96 Fecha de presentación: **12.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1692161**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Polipéptidos de receptor de quimiocina quimérica**

30 Prioridad:
13.11.2003 US 519605 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.03.2012

73 Titular/es:
**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD
PRINCETON NJ 08543-4000, US**

72 Inventor/es:
**DINCHUK, Joseph E.;
DAVIES, Paul;
ZHAO, Qihong;
CARTER, Percy, H.;
SOLOMON, Kimberly, A. y
SCHERLE, Peggy Ann**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 649 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

Polipéptidos de receptor de quimiocina quimérica

Campo de la invención

La presente invención está definida en las reivindicaciones.

- 5 La presente invención se refiere, en general, a proteínas quiméricas y, más particularmente, a un polipéptido de receptor de quimiocina quimérica que comprende una región de un receptor de quimiocina CCR2 unida a una región de un receptor de quimiocina CCR3. Según la invención, la fusión se ordena con una región de CCR2 en el extremo N de la proteína quimérica y una región de CCR3 unida a la región de CCR2 y que forma el extremo C de la quimérica. La quimérica puede emplearse en una variedad de aplicaciones, tales como ensayos de unión a ligando, ensayos de señalización y ensayos para compuestos que inhiben la unión de una quimiocina (por ejemplo, eotaxina) a su receptor relacionado (por ejemplo, CCR3).
- 10

Abreviaturas de aminoácidos

<u>Código de una letra</u>	<u>Código de tres letras</u>	<u>Nombre</u>
A	Ala	Alanina
V	Val	Valina
L	Leu	Leucina
I	Be	Isoleucina
P	Pro	Prolina
F	Phe	Fenilalanina
W	Trp	Triptófano
M	Met	Metionina
G	Gly	Glicina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
C	Cys	Cisteína
Y	Tyr	Tirosina
N	Asn	Asparagina
Q	Gln	Glutamina
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
K	Lys	Lisina
R	Arg	Arginina
H	His	Histidina

Codones funcionalmente equivalentes

<u>Aminoácido</u>	<u>Codones</u>
Alanina	Ala A GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys C UGC UGU
Ácido aspártico	Asp D GAC GAU

(continuación)

<u>Aminoácido</u>			<u>Codones</u>
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	ACG AGU UCA UCC UCG UCU

Antecedentes de la invención

5 Los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) son las proteínas más ampliamente elegidas como diana para fines terapéuticos. Estructuralmente, esta clase de proteínas comprende una región del extremo N extracelular y una región del extremo C intracelular que se unen por una región transmembrana (TM) que comprende siete dominios helicoidales alfa que atraviesan la bicapa de la membrana celular.

10 Se ha dilucidado la función de cada dominio (el extremo N y el extremo C) de los GPCR. Cada uno de los dominios de un GPCR tiene una función distinta. Más particularmente, los GPCR retienen todas sus regiones de unión a ligando conocidas dentro de las regiones extracelulares y los dominios TM 2 a 7 (por ejemplo, Ling y col., (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:7922-7927; Gardella & Juppner, (2001) Trends Endocrin. Metal. 12(5):210-217; Vaidehi y col., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12622-12627), mientras que las regiones intracelulares regulan la señalización de células y las funciones de internalización del receptor (Trejo y col., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 13698-13702; Hedin y col., (1998) J. Biol. Chem. 273(19):11472-11477; Trejo & Coughlin, (1999) J. Biol. Chem. 274(4):2216-2224; Castro-Fernandez & Conn, (2002) Mol. Cell. Endocrinol. 191:149-156). Los receptores acoplados a la proteína G, que incluyen receptores de quimiocinas, tienen un amplio intervalo de especificidades en términos de las señales que reciben y aquellas que transducen. Como se describe adicionalmente en este documento, estas observaciones se han aplicado a la presente invención en forma de quimeras de receptores de quimiocinas que retienen la capacidad de unión a ligando, además de la actividad de señalización mediada por la proteína G.

25 La familia de los receptores de quimiocinas de los receptores acoplados a la proteína G representa el grupo más grande de GPCR de unión a péptidos descrito hasta la fecha (Onuffer & Horuk, (2002) Trends Pharmacol. Sci. 23(10):459-467). En esta capacidad, los péptidos unidos son quimiocinas para el receptor de quimiocina (el GPCR) (véase, por ejemplo, Yoshie y col., (2001) Adv. Immunol. 78: 57). Las quimiocinas tienen aproximadamente 4 a aproximadamente 14 kDa de tamaño y comprenden cuatro residuos de cisteína conservados. Se agrupan ampliamente en dos grupos: un grupo principal que comprende los subgrupos CC y CXC en los que dos cisteínas son adyacentes o están separadas por un residuo, y un grupo secundario que comprende los subgrupos C y CXXXC, en los que la segunda cisteína está ausente o está separada de la primera cisteína por tres residuos (véase, por ejemplo, Horuk, (2003) Methods 29:369-375; Horuk, (2001) Cytokine Growth Factor Rev. 12:313-335). El

esquema de clasificación depende del número y la posición de los dos primeros residuos de cisteína conservados (Horuk, (2003) *Methods* 29:369-375).

Se han identificado al menos 18 receptores de quimiocinas que incluyen 10 receptores de quimiocinas de tipo CC (CCR1 (Neote y col., (1993) *Cell* 72:415-425; Gao y col., (1993) *J. Exp. Med* 177:1421-1427), CCR2 (Charo y col., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:2752-56), CCR3 (Combadiere y col., (1995) *J. Biol. Chem.* 270:16491-16494; Combadiere y col., (1995) *J. Biol. Chem.* 270:30235; Daugherty y col., (1996) *J. Exp. Med* 183:2349-2354; Ponath y col., (1996) *J. Clin. Invest.* 97:604-612), CCR4 (Power y col., (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 19495-19500), CCR5 (Samson y col., (1996) *Biochem.* 35:3362-3367; Combadiere y col., (1996) *J. Leukocyte Biol.* 60:147-152), CCR6 (Baba y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:14893-14898), CCR7 (Yoshida y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 13803-13809), CCR8 (Tiffany y col., (1997) *J. Exp. Med* 186:165-170; Roos y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:17251-17254; Horuk y col., (1998) *J. Biol. Chem.* 273:386-391; Goya y col., (1998) *J. Immunol.* 160:1975-1981), CCR9 (Zaballos y col., (1999) *J. Immunol.* 162:5671-5675), CCR10 (Homey y col., (2000) *J. Immunol.* 164:3465-3470; Jarmin y col., (2000) *J. Immunol.* 164: 3460-3464) y 8 de los tipos CXC, CXXC y XC (CXCR1 (Holmes y col., (1991) *Science* 253:1278-1280), CXCR2 (Murphy & Tiffany, (1991) *Science* 253:1280-1283), CXCR3 (Marchese y col., (1995) *Genomics* 29:335-344; Loetscher y col., (1996) *J. Exp. Med* 184:963-969), CXCR4 (Nomura y col., (1993) *Int. Immunol.* 5:1239-1249; Federspiel y col., (1993) *Genomics* 16:707-712; Jazin y col., (1993) *Regul. Pep.* 47:247-258; Herzog y col., (1993) *DNA Cell Biol.* 12:465-471; Loetscher y col., (1993) *J. Biol. Chem.* 269:232-237), CXCR5 (Legler y col., (1998) *J. Exp. Med* 187:655-660), CXCR6 (Matloubian y col., (2000) *Nature Immunol.* 1: 298-304), CXXCR1 (Combadiere y col., (1998) *J. Biol. Chem.* 273:23799-23804) y XCR1 (Yoshida y col., (1998) *J. Biol. Chem.* 273:16551-16554)). Véase, por ejemplo, Horuk, (2001) *Cytokine Growth Factor Rev.* 12:313-335 para una revisión de receptores de quimiocinas.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los receptores de quimiocinas conocidos están públicamente disponibles de la base de datos GenBank y tienen los siguientes números de acceso:

Tabla de accesos de GenBank

CCR1	L10918, L09230, D10925
CCR2	U03905, U80924, D29984, U03882, U80924
CCR3	U28694, U51241, U49727
CCR4	X85740
CCR5	U54994, X91492, U57840
CCR6	U60000, U45984, U68032, Z79782
CCR7	X84702, L31581, L31584, L08176
CCR8	U45983, Z79782, U62556, Y08456
CCR9	U45982
CCR10	U13667
CXCR1	L19591, U11870, X65858, L19592, M68932
CCR2	L19593, M94582, U11869, M73969, M99412
CCR3	X95876, U32674
CXCR4	X71635, D10924, M99293, L01639, L06797
CXCR5	X68149, X68829
CXCR6	U73531
CX3CR1	U20350, U28934
XCR1	L36149

Una función de la combinación de receptor de quimiocina/quimiocina es atraer y activar células que participan en una variedad de respuestas inmunitarias (véase, por ejemplo, Yoshie y col., (2001) *Adv. Immunol.* 78:57; Rollins, (1997) *Blood* 90:909; Baggiolini, (1998) *Nature* 392:565; Nagasawa y col., (1996) *Nature* 382:635). Dependiendo de

la distribución celular y los patrones de expresión/producción de estos pares de proteínas, la coordinación de fenómenos biológicos extremadamente complejos, notablemente inmunológicos, puede llevarse a cabo (Horuk, (2001) Cytokine Growth Factor Rev. 12: 313-335; Baggiolini, (1998) Nature 392:565-68). Debido a que múltiples receptores de quimiocinas se expresan frecuentemente en un único tipo de célula, y debido a que muchos receptores de quimiocinas pueden unirse a múltiples quimiocinas, la complejidad de posibles interacciones es enorme.

El único receptor conocido para la quimiocina eotaxina es CCR3; sin embargo, CCR3, (el receptor de eotaxina) también puede unirse a otras quimiocinas que incluyen eotaxina 2, RANTES, MCP-2, MCP-3 y MCP-4 (véase, por ejemplo, Horuk, (2001) Cytokine Growth Factor Rev. 12:313-335; Baggiolini, (1998) Nature 392:565-68). En el caso de CCR3 y su ligando de péptido, la eotaxina, la distribución y los patrones de expresión de estas dos proteínas sugieren una función en un proceso inflamatorio relacionado con el asma (Baggiolini y col., (1997) Annu. Rev. Immunol. 15:675-705) y con dermatitis de contacto (Taha y col., (2000) J. Allergy Clin. Immunol. 105:1002-1007; Yawalkar y col., (1999) J. Invest. Dermatol. 113: 43-48; Ying y col., (1999) J. Immunol. 163:3976-3984). En un ejemplo de un procedimiento tal, tras la unión funcional, los ligandos de CCR3 estimulan el flujo de calcio, la reorganización de actina, la regulación por incremento de integrina, la internalización de receptores, la activación de rutas de transducción de señales y la migración de células (Adachi y col., (2001) J. Immunol. 167:4609-4615; El-Shazly y col., (1999) Biochem. Biophys. Res. Comm. 264(1):163-170; Elsner y col., (1996) Eur. J. Immunol. 26:1919-1925; Elsner y col., (1998) Eur. J. Immunol. 28:2152-2158; Kampen y col., (2000) Blood 95:1911-1917; Lundahl y col., (1998) Inflammation 22:123-135; Tachimoto y col., (2002) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 26: 645-649; Tenscher y col., (1996) Blood 88: 3195-3199; Woo y col., (2000) Biochem. Biophys. Res. Comm. 298: 392-397; Zimmerman y col., (1999) J. Biol. Chem. 274: 12611-12618). Se sabe que el receptor de eotaxina está limitado en expresión principalmente a eosinófilos, linfocitos T colaboradores de la variedad T_H2 (Sallusto y col., (1997) Science 277:2005-2007), basófilos (Uguccioni y col., (1997) J. Clin. Invest. 100:1137-43), mastocitos, plaquetas, células dendríticas y, basándose en trabajos descritos en este documento, también monocitos. Se sabe que la mayor parte de estos tipos de células se asocian a una variedad de reacciones alérgicas agudas y crónicas que incluyen resistencia a ciertas infecciones parasitarias.

Continuando, se sabe que el anticuerpo anti-CCR3 administrado a ratones por tanto vías intraperitoneales como intranasales deroga el reclutamiento de eosinófilos en el pulmón tras la exposición al alérgeno intranasal (Justice y col., (2003) Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 284: L169-L178). El anticuerpo también elimina la hiperreceptividad de las vías respiratorias a la exposición a metacolina. Los ratones inactivados a CCR3 presentan reclutamiento de eosinófilos marcadamente reducido para el pulmón y la piel tras la exposición al alérgeno (Humbles y col., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99(3):1479-84; Ma y col., (2002) J. Clin. Invest. 109(5):621-28). Sin embargo, el efecto sobre la hiperreceptividad de las vías respiratorias depende de la vía de sensibilización al antígeno. Los ratones sensibilizados por inyección intraperitoneal muestran una hiperreceptividad ligeramente potenciada (Humbles y col., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99(3):1479-84), mientras que aquellos sensibilizados por administración epicutánea de antígeno muestran una reducción casi completa de la hiperreceptividad.

El CCR2 existe en dos isoformas, CCR2A y CCR2B (Charo y col., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:2752-56). A diferencia de CCR3, que se expresa principalmente en eosinófilos, el CCR2 (también denominado en lo sucesivo MCP-1R) se expresa predominantemente en el linaje de monocitos/macrófagos y se cree que su ligando de péptido primario, MCP-1, sirve para reclutar monocitos a sitios de inflamación (Taub y col., (1993) Science 260:355; Roth y col., (1995) Eur. J. Immunol. 25: 3482). Además de MCP-1 (α y β), los ligandos de quimiocinas conocidos por interactuar con CCR2 incluyen MCP-2, MCP-3, MCP-4 y MCP-5. La expresión de CCR2 también se ha descrito en basófilos, células NK, linfocitos T de memoria, eosinófilos y células dendríticas. Tras la unión funcional, los ligandos de CCR2 estimulan el flujo de calcio, la reorganización de actina, la regulación por incremento de integrina, la internalización de receptores, la activación de rutas de transducción de señales y la migración de células. Basándose en la distribución celular y la actividad de CCR2 y sus ligandos, el potencial terapéutico de los inhibidores de CCR2 puede existir para afecciones inflamatorias crónicas tales como arterosclerosis, artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

En el caso de CCR2A (nº de acceso de GenBank AF545480), se predice que los residuos 1-42 de SEC ID Nº: 2 comprenden la región del extremo N, que los residuos 310-374 de SEC ID Nº: 2 comprenden la región del extremo C y que los residuos 43-309 de SEC ID Nº: 2 comprenden la región TM. En el caso de CCR2B (nº de acceso de GenBank U03905), se predice que los residuos 1-42 de SEC ID Nº: 4 comprenden la región del extremo N, que los residuos 310-360 de SEC ID Nº: 4 comprenden la región del extremo C y que los residuos 43-309 de SEC ID Nº: 4 comprenden la región TM. Con respecto a CCR3 (nº de acceso de GenBank U28694), se predice que los residuos 1-34 de SEC ID Nº: 6 comprenden la región del extremo N, que los residuos 306-355 de SEC ID Nº: 6 comprenden la región del extremo C y que los residuos 35-305 de SEC ID Nº: 6 comprenden la región TM. La región TM crea extensos bucles intracelulares y extracelulares de proteína que confieren reactividad y función biológica específica. Los GPCR pueden responder a una amplia variedad de estímulos que incluyen luz, odorizantes, iones, lípidos, péptidos y proteínas globulares.

La presente invención se refiere a receptores de quimiocinas quiméricas. Previamente se han generados varios receptores de quimiocinas quiméricas particulares. Por ejemplo, Peiper y col. informan de la generación de (1) una

quimera que comprende la región del extremo N de DARC, que se unió a la porción restante de CCR1; y (2) una quimera que comprende la región del extremo N de CCR1, que se unió a la porción restante de DARC (Peiper y col., (1997) *Method Enzymol.* 288:57-71). Sin embargo, las quimeras de Peiper y col. sólo incorporaron la región del extremo N extracelular de CCR1 y DARC. Además, Alkhatib y col. (Alkhatib y col., (1997) *J. Biol. Chem.* 33:20420-26) y Pease y col. (Pease y col., (1998) *J. Biol. Chem.* 273(32):19972-76) prepararon diversas quimeras de CCR1/CCR3. Sin embargo, las quimeras de Alkhatib y Pease también incluyen sólo el extremo N extracelular de un receptor CCR1 o CCR3 unido al resto de un receptor CCR3 o CCR1, respectivamente. Hill y col. prepararon quimeras que comprenden el dominio del extremo N de CCR1, CCR2 y CXCR4 y la porción restante de CCR5, pero, de nuevo, estas quimeras no incorporaron un extremo N contiguo/elemento de hélice de siete TM (Hill y col., (1998) *Viol.* 248:357-71). Similarmente, Rucker y col. prepararon quimeras de CCR2B/CCR5 (Rucker y col., (1996) *Cell* 87:437-46), pero estas quimeras no incorporaron un extremo N intacto/elemento de hélice de siete TM de un único receptor. También se han preparado quimeras que comprenden componentes de receptor de quimiocina (CCR2/CD8; Monteclaro & Charo, (1997) *J. Biol. Chem.* 272(37):23186-90), además de quimeras formadas entre ortólogos de la misma proteína (CCR3 humano/de macaco; Sol y col., (1998) *Viol.* 240:213-20), pero ninguna de estas quimeras incorporó un extremo N intacto/elemento de hélice de siete TM de un único receptor.

Aunque se han generado al menos los receptores quiméricos anteriormente descritos, estas quimeras no comprenden en general un extremo N contiguo/elemento de hélice de siete TM ni comprenden una región de un receptor CCR3 unido a una región de un receptor CCR2 en particular. Por tanto, estas quimeras no presentan completamente las propiedades de ambos CCR que se usaron para construir la quimera (es decir, las propiedades del extremo N y la región TM de un primer CCR tal como CCR3 y el extremo C intracelular de un segundo CCR tal como CCR2). Notablemente, estas quimeras previamente generadas no incluyen la región TM del componente del extremo N de la quimera.

Un ímpetu por generar los receptores quiméricos de la presente invención fue la necesidad de un receptor que pudiera unirse con alta afinidad al ligando relacionado a la vez que retuviera al menos una de las capacidades de señalización en la dirección 3' asociadas al receptor nativo. Una quimera tal podría emplearse en un ensayo de cribado para identificar quimiocinas que se unen a un receptor de quimiocina y/o inducen señalización. Antes de la presente invención, en la materia se carecía de un receptor quimérico tal.

Por tanto, lo que se necesita es un receptor de quimiocina quimérica que comprenda el extremo N hasta al menos el último residuo de la séptima región transmembrana de un primer CCR (por ejemplo, CCR3 o CCR2) unido a toda o una parte del extremo C de un segundo CCR (por ejemplo, CCR2 o CCR3, respectivamente). Un receptor tal facilitaría varios ensayos diferentes tales como unión a ligando de quimiocina más precisa, y ensayos de señalización que pueden lograrse empleando las quimeras conocidas en la técnica. Además, modificando sólo la cola citoplásmica de un receptor de quimiocinas también puede ser posible generar rutas de señalización alternativas tras la unión del ligando relacionado. Estas rutas alternativas podrían resultar más fáciles de describir y/o cuantificar que las rutas asociadas al receptor natural. El receptor de quimiocina quimérica también sería útil en modular esfuerzos de diseño. La presente invención resuelve estos y otros problemas.

Resumen de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones. La presente invención se refiere en términos generales a un receptor de quimiocina quimérica aislado. En una realización, el receptor de quimiocina quimérica comprende: (a) un primer segmento de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que se extiende desde el primer residuo del extremo N de un primer receptor de quimiocina hasta al menos el último residuo de la séptima hélice transmembrana del primer receptor de quimiocina; y (b) un segundo segmento de polipéptido unido a la primera secuencia de polipéptidos, comprendiendo la segunda secuencia de polipéptidos una secuencia de aminoácidos contigua que comprende toda o una parte del extremo C de un segundo receptor de quimiocina en el que el receptor de quimiocina quimérica comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 24.

En este documento también se describe que el primer receptor de quimiocina se selecciona del grupo que consiste en un receptor que se une a quimiocina de la forma C, una quimiocina de la forma CC, una quimiocina de la forma CX y una quimiocina de la forma CXXXC. A este respecto, el primer receptor de quimiocina puede seleccionarse del grupo que consiste en CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR1, CCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXXXCR1 y XCR1. En este documento también se describe que el segundo receptor de quimiocina se selecciona del grupo que consiste en un receptor que se une a una quimiocina de la forma C, una quimiocina de la forma CC, una quimiocina de la forma CX y una quimiocina de la forma CXXXC. A este respecto, el segundo receptor de quimiocina puede seleccionarse del grupo que consiste en CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXXXCR1 y XCR1. Según la invención, el primer receptor de quimiocina es CCR2 y el segundo receptor de quimiocina es CCR3, siendo CCR2 la isoforma B de CCR2. Según la invención, la primera secuencia de polipéptidos comprende los residuos 1-314 de SEC ID N°: 4 y la segunda secuencia de polipéptidos comprende los residuos 312-355 de SEC ID N°: 6. En otros aspectos, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica el receptor de quimiocina quimérica de la reivindicación 1, una célula huésped que comprende el polinucleótido, un polinucleótido aislado que es complementario al polinucleótido y un vector de ADN que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2 ó 3.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para producir un receptor de quimiocina quimérica. En una realización, el procedimiento comprende: (a) cultivar una célula huésped como se define por las reivindicaciones en un medio nutritivo adecuado para producir el receptor de quimiocina quimérica; y (b) aislar el receptor de quimiocina quimérica de la célula o medio. Según la invención, el receptor de quimiocina quimérica comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 24. En algunas realizaciones del procedimiento se desvela un polinucleótido aislado que codifica el receptor de quimiocina quimérica. En una realización, la secuencia de polinucleótidos es la que se expone en SEQ ID N°: 23. Una célula huésped que comprende el polinucleótido, un polinucleótido aislado que es complementario al polinucleótido de longitud completa y un vector de ADN que comprende el polinucleótido constituyen realizaciones adicionales del procedimiento.

También se desvela un procedimiento para producir un receptor de quimiocina quimérica. En una realización, el procedimiento comprende (a) cultivar una célula huésped como se define por las reivindicaciones en un medio nutritivo adecuado para producir un receptor de quimiocina quimérica, y (b) aislar el receptor de quimiocina quimérica de la célula o medio.

En este documento también se describe un procedimiento de identificación de un compuesto que se une a un receptor de quimiocina. El procedimiento puede comprender: (a) poner en contacto un compuesto de prueba con un polipéptido del receptor de quimiocina quimérica que comprende: un primer segmento de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que se extiende desde el primer residuo del extremo N de un primer receptor de quimiocina hasta al menos el último residuo de la séptima hélice transmembrana del primer receptor de quimiocina, y (i) un primer segmento de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que se extiende desde el primer residuo del extremo N de un primer receptor de quimiocina hasta al menos el último residuo de la séptima hélice transmembrana del primer receptor de quimiocina, y (ii) un segundo segmento de polipéptido unido a la primera secuencia de polipéptidos, comprendiendo la segunda secuencia de polipéptidos una secuencia de aminoácidos contigua que comprende toda o una parte del extremo C de un segundo receptor de quimiocina, y (b) determinar si el compuesto de prueba se unió al receptor de quimiocina quimérica. El compuesto de prueba puede marcarse. La marca puede seleccionarse adicionalmente del grupo que consiste en una radiomarca y una enzima. Además, el procedimiento puede llevarse a cabo en presencia de un ligando que se sabe que se une al receptor de quimiocina quimérica.

En este documento también se describe un procedimiento de identificación de un grado al que un compuesto induce señalización intracelular. El procedimiento puede comprender: (a) determinar un nivel de referencia de la señalización intracelular en ausencia de un compuesto de prueba; (b) poner en contacto el compuesto de prueba con un polipéptido de receptor de quimiocinas quiméricas que comprende: (i) un primer segmento de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que se extiende desde el primer residuo del extremo N de un primer receptor de quimiocina hasta al menos el último residuo de la séptima hélice transmembrana del primer receptor de quimiocina; y (ii) un segundo segmento de polipéptido unido a la primera secuencia de polipéptidos, comprendiendo la segunda secuencia de polipéptidos una secuencia de aminoácidos contigua que comprende toda o una parte del extremo C de un segundo receptor de quimiocina; (c) determinar un nivel al que el compuesto de prueba induce señalización intracelular; y (d) comparar el nivel de referencia de la señalización intracelular con el nivel de señalización intracelular en presencia del compuesto de prueba, por lo que se identifica un grado al que un compuesto induce señalización intracelular. La actividad de señalización puede ser un aumento transitorio en la concentración de calcio libre citosólico. La actividad de señalización puede ser adicionalmente la hidrólisis de GTP.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar una quimera que comprende (a) un primer segmento de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que se extiende desde el primer residuo del extremo N de un primer receptor de quimiocina hasta al menos el último residuo de la séptima hélice transmembrana del primer receptor de quimiocina, y (b) un segundo segmento de polipéptido unido a la primera secuencia de polipéptidos, comprendiendo la segunda secuencia de polipéptidos una secuencia de aminoácidos contigua que comprende toda o una parte del extremo C de un segundo receptor de quimiocina en el que el receptor de quimiocina quimérica comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 24.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que representa los resultados de un análisis de unión de eotaxina humana de células del clon 5.5 que expresan CCR3/2.

La Figura 2A es un diagrama que representa un vector pFLAG-CMV usado para clonar/expresar CCR3 humano natural.

La Figura 2B es una secuencia de nucleótidos marcando el marco de lectura abierto de CCR3 humano, empezando en la secuencia señal de FLAG PreProTripsina.

La Figura 3A es un diagrama que representa un vector pFLAG-CMV3 usado para clonar el inserto de CCR3/2 quimérico.

La Figura 3B es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de CCR2B humano (SEC ID N°: 4), CCR3 (SEC ID N°: 6) y la quimera CCR3/2 (SEC ID N°: 22).

La Figura 4 es un gráfico que representa los resultados de un análisis de FACS de la línea 5.5 de CCR3/2 de CHO con respecto a las líneas de expresan CCR3 de CHO de control.

La Figura 5A es un gráfico que representa una comparación de curvas de inhibición de fármaco en

eosinófilos humanos.

La Figura 5B es un gráfico que representa una comparación de curvas de inhibición de fármaco en el clon de 5.5 de CCR3/2 de CHO.

La Figura 6 es un diagrama esquemático que representa la señalización por rutas de cinasa en una célula.

5 La Figura 7A es una fotografía que representa la detección por quimioluminiscencia de la transferencia Western de la fosforilación de erk en eosinófilos humanos expuestos a eotaxina humana.

La Figura 7B es una fotografía que representa la detección por quimioluminiscencia de la transferencia Western de la fosforilación de erk en células CHO del clon 5.5 de CCR3/2 expuestas a eotaxina humana.

10 La Figura 8A es un alineamiento de un ácido nucleico que codifica una quimera CCR2/3 (SEC ID N°: 23) con un ácido nucleico que codifica CCR2B humano (SEC ID N°: 3).

La Figura 8B es un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de una quimera CCR2/3 (SEC ID N°: 24) con la secuencia de aminoácidos de un CCR2B humano (SEC ID N°: 4).

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a un receptor de quimiocina quimérica aislado. En una realización, el receptor de quimiocina quimérica comprende: (a) un primer segmento de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que se extiende desde el primer residuo del extremo N de un primer receptor de quimiocina hasta al menos el último residuo de la séptima hélice transmembrana del primer receptor de quimiocina; y (b) un segundo segmento de polipéptido unido a la primera secuencia de polipéptidos, comprendiendo la segunda secuencia de polipéptidos una secuencia de aminoácidos contigua que comprende toda o una parte del extremo C de un segundo receptor de quimiocina, en el que el receptor de quimiocina quimérica comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 24. Según la invención, la primera secuencia de polipéptidos se deriva de un polipéptido de CCR2 (por ejemplo, CCR2B) y la segunda secuencia se deriva de un polipéptido de CCR3. Un ímpetu por generar un receptor quimérico tal fue la necesidad de un receptor que pudiera unirse con alta afinidad a su ligando relacionado a la vez que retuviera al menos algunas de las capacidades de señalización en la dirección 3' asociadas al receptor de longitud completa. Una quimera tal podría emplearse en un ensayo de cribado para identificar quimiocinas que se unen a un receptor de quimiocina y/o inducen señalización. Antes de la presente invención, en la materia se carecía de un receptor quimérico tal.

I. Definiciones

30 Todos los términos científicos y técnicos usados en la presente solicitud tienen significados comúnmente usados en la materia, a menos que se especifique de otro modo. Como se usa en la presente divulgación, las siguientes palabras o términos tienen los significados especificados.

Siguiendo la antigua convención de leyes de patente, los términos “un” y “una” significan “uno o más” cuando se usan en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones.

35 Como se usa en este documento, el término “aproximadamente” cuando se refiere a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje pretende englobar variaciones de $\pm 20\%$ o menores (por ejemplo, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 7\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, o $\pm 0,1\%$) de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son apropiadas.

40 Como se usa en este documento, los términos “aminoácido”, “residuo de aminoácido” y “residuo” se usan indistintamente y significan cualquiera de los veinte aminoácidos que se producen naturalmente. Un aminoácido se forma tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Los residuos de aminoácido descritos en este documento están preferentemente en la forma isomérica “L”. Sin embargo, los residuos en la forma isomérica “D” pueden estar sustituidos por cualquier residuo de L-aminoácido, en tanto que se retenga la propiedad funcional deseada por el polipéptido. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino (N) de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura convencional de polipéptidos, las abreviaturas para los residuos de aminoácido se han mostrado en forma tabulada en este documento anteriormente.

50 Se observa que las secuencias de residuos de aminoácido representadas en este documento por las fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha, en la dirección convencional de extremo amino (N) a extremo carboxi (C). Además, los términos “aminoácido” y “residuo de aminoácido” se definen ampliamente para incluir aminoácidos modificados e inusuales.

Además, se observa que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un péptido unido a otra secuencia de uno o más residuos de aminoácido, un enlace covalente a un grupo del extremo amino tal como NH_2 , a un grupo acetilo o a un grupo del extremo carboxi tal como COOH .

55 Como se usa en este documento, el término “anticuerpo” significa policlonal, monoclonal, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos. El término en globa anticuerpos preparados por técnicas recombinantes tales como anticuerpos quiméricos o humanizados, además de anticuerpos monocatenarios o biespecíficos.

Como se usa en este documento, los términos “antígeno” y “epítipo”, que son muy entendidos en la materia,

significan toda o una parte de una macromolécula que es específicamente reconocida por un componente del sistema inmunitario, por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de antígenos de linfocitos T. Un epítipo es una región de un antígeno. Como se usa en este documento, el término “antígeno” engloba epítipos antigénicos, por ejemplo, fragmentos de un antígeno que son epítipos antigénicos.

5 Como se usa en este documento, los términos “asociar” y “unir”, y derivaciones gramaticales de los mismos, se usan indistintamente y significa una condición de proximidad entre dos o entre varias moléculas, elementos estructurales, compuestos químicos o entidades químicas. Una asociación puede ser no covalente (es decir, reversible), en la que la yuxtaposición está energéticamente favorecida por el enlace de hidrógeno o interacciones de van der Waals o electrostáticas, o puede ser covalente (es decir, irreversible). Por tanto, en la presente divulgación, cuando se establece que un ligando se “asocia” con o se “une” a una proteína, se indica que el ligando interactúa con la proteína por interacciones covalentes o no covalentes. El ligando puede ser un antígeno o epítipo y la proteína puede ser un anticuerpo.

15 En un aspecto relacionado, la expresión “se asocia específicamente”, y derivaciones gramaticales del mismo, significa una interacción entre un primer resto (por ejemplo, un modulador, tal como una quimiocina o un anticuerpo) y un segundo resto (por ejemplo, una quimera CCR2/CCR3) que se produce preferentemente con una interacción entre el primer o segundo resto y cualquier otro resto presente. A modo de ejemplo, un anticuerpo se presenta con una variedad de antígenos diferentes, pero sólo se une a un antígeno particular. En este ejemplo, el anticuerpo “se asocia específicamente” con el antígeno particular.

20 Como se usa en este documento, los términos “gen de CCR2” y “gen de CCR2 recombinante” significan una molécula de ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de CCR2 de la presente invención, que incluye secuencias de exón y, opcionalmente, de intrón. El término engloba todas las formas conocidas o descubiertas de un gen de CCR2, incluyendo aquellas que codifican isoformas tales como, pero no se limitan a, CCR2A y CCR2B.

25 Como se usa en este documento, los términos “gen de CCR3” y “gen de CCR3 recombinante” significan una molécula de ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de CCR3 de la presente invención, que incluye tanto secuencias de exón como, opcionalmente, de intrón. El término engloba todas las formas conocidas o descubiertas de un gen de CCR3, incluyendo aquellas que codifican isoformas.

30 Como se usa en este documento, las expresiones “producto génico de CCR2”, “proteína de CCR2”, “polipéptido de CCR2”, “producto génico de polipéptido de CCR2”, “péptido de CCR2”, “producto génico de CCR3”, “proteína de CCR3”, “polipéptido de CCR3”, “producto génico de polipéptido de CCR3” y “péptido de CCR3” se usan indistintamente y significan polipéptidos y fragmentos de los mismos que tienen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente idénticas (como se define en este documento) a la secuencia de aminoácidos natural correspondiente derivada de un organismo de interés (por ejemplo, un ser humano) y que son biológicamente activas porque comprenden toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de CCR2 o CCR3 natural (por ejemplo, SEC ID N^o: 2, 4 y/o 6), reaccionan de forma cruzada con anticuerpos producidos contra un polipéptido de CCR2 o CCR3, se unen a quimiocina y/o median en la señalización intracelular. Tal actividad biológica también puede incluir inmunogenicidad.

40 En realizaciones de la presente invención, un polipéptido de CCR2 o CCR3 natural está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos denotada por un número de acceso de GenBank presentado en la tabla de accesos de GenBank proporcionada anteriormente en este documento. Por tanto, el término “natural” puede referirse a una isoforma de un polipéptido dado.

45 Como se usa en este documento, el término “receptor de quimiocina” significa un polipéptido que puede unirse a una quimiocina y/o mediar en la señalización intracelular. Una lista no limitante de receptores de quimiocinas representativos incluye CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXXCR1 y XCR1.

50 Como se usa en este documento, los términos “proteína quimérica” y “proteína de fusión” se usan indistintamente y significan una fusión que comprende una primera molécula (por ejemplo, una región o dominio de un polipéptido de CCR2 o un polipéptido de CCR3) y una secuencia de aminoácidos de la segunda molécula de polipéptido (por ejemplo, una región o dominio de un polipéptido de CCR2 o de CCR3). En una realización, una proteína quimérica de la presente invención comprende una región de un polipéptido de CCR2 unida a una región de un polipéptido de CCR3. Una proteína quimérica o de fusión puede expresarse a partir de un único gen quimérico que codifica la proteína quimérica.

55 Como se usa en este documento el término “complementaria” significa una secuencia de ácidos nucleicos que es de bases apareadas, o puede aparear bases, según las reglas de complementariedad convencionales de Watson-Crick. Estas reglas generalmente mantienen que los pares de guanina con citosina (G:C) y los pares de adenina con cualquier timina (A:T) en el caso de ADN, o los pares de adenina con uracilo (A:U) en el caso de ARN.

Como se usa en este documento, el término “detectar” significa confirmar la presencia de una entidad diana observando la aparición de una señal detectable tal como una señal radiológica, fluorescente, colorimétrica, etc. que

aparecerá exclusivamente en presencia de la entidad diana.

Como se usa en este documento, los términos “aislado” y “purificado” se usan indistintamente y se refieren a material (por ejemplo, un ácido nucleico o un polipéptido) sacado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural, si el material se produce naturalmente) y, por tanto, está alterado “por la mano del hombre” de su estado natural. Por ejemplo, un polinucleótido aislado podría ser parte de un vector o una composición de materia, o podría estar contenido dentro de una célula, y todavía estar “aislado” debido a que ese vector, composición de materia o célula particular no es el entorno original del polinucleótido. El término “aislado” no se refiere a bibliotecas de ADN genómico o A DNc, preparaciones totales de células completas o de ARNm, preparaciones de ADN genómico (incluyendo aquellas separadas por electroforesis y transferidas a transferencias), preparaciones de ADN genómico de células completas rotas u otras composiciones en las que la materia no demuestra características diferenciadoras de secuencias de polinucleótidos y/o de proteínas de la presente invención; tales secuencias se excluyen específicamente del alcance de la presente invención.

Como se usa en este documento, el término “ligando” significa cualquier molécula que se sabe o de la que se sospecha que se asocia a otra molécula. El término “ligando” engloba inhibidores, activadores, agonistas, antagonistas, sustratos naturales y análogos de sustratos naturales. Un ligando puede comprender, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos, una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un péptido y/o polipéptido) o una molécula pequeña.

Como se usa en este documento, el término “modular”, y derivaciones gramaticales del mismo, se refiere a un aumento, disminución u otra alteración de cualquiera y/o todas las actividades o propiedades químicas y/o biológicas mediadas por una secuencia de ADN dada, secuencia de ARN, polipéptido, péptido o molécula. La definición de “modulador” como se usa en este documento engloba agonistas, antagonistas o agonistas inversos de una actividad o proteína particular. Por tanto, el término “modular” se refiere tanto a la regulación por incremento (es decir, activación o estimulación) como a la regulación por disminución (es decir, inhibición o supresión) de una respuesta por cualquier modo de acción. Un modulador puede modular la actividad de señalización mediada por receptor de quimiocinas (por ejemplo, GPCR).

Como se usa en este documento, los términos “organismo”, “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente y significan cualquier organismo citado en este documento, que incluye procariontas, aunque los términos se refieren preferentemente a organismos eucariotas, notablemente mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, perros y cerdos), y lo más preferentemente a seres humanos. Los procedimientos de la presente invención son particularmente preferibles para su uso en el contexto de vertebrados de sangre caliente.

Como se usa en este documento, los términos “segmento de polipéptido”, “porción de polipéptido” y “región de polipéptido” se usan indistintamente y significan una secuencia de aminoácidos que es al menos un aminoácido más corta que una secuencia de referencia, pero retiene el orden secuencial de aminoácidos en la secuencia de referencia. Por ejemplo, un segmento de polipéptido de un polipéptido de CCR2A significa una secuencia de aminoácidos que comprenden como máximo 373 aminoácidos de longitud (un residuo menos que los 374 residuos mostrados en SEC ID N°: 2). En otro ejemplo, un segmento de polipéptido de un polipéptido de CCR2B significa una secuencia de aminoácidos que comprenden como máximo 359 aminoácidos de longitud (un residuo menos que los 360 residuos mostrados en SEC ID N°: 4). En otro ejemplo, un fragmento de polipéptido de un polipéptido de CCR3 comprende como máximo 354 aminoácidos de longitud (un residuo menos que los 355 residuos mostrados en SEC ID N°: 6).

Como se usa en este documento, los términos “segmento”, “porción” y “región” se usan indistintamente y significan secuencias más cortas derivadas de un polipéptido o polinucleótido más largo. En algunas realizaciones, una secuencia más corta o más larga derivada de un polipéptido de CCR2 o de CCR3 retiene una actividad biológica de un polipéptido de CCR2 o de CCR3 de longitud completa, por ejemplo, (a) la capacidad para mediar en la señalización, y/o (b) la capacidad para unirse a una quimiocina. Un segmento puede ser específicamente reconocido por un anticuerpo.

Como se usa en este documento, los términos “proteína”, “polipéptido” y “péptido” se usan indistintamente y significan cualquier polímero que comprenda cualquiera de los 20 aminoácidos de la proteína, independientemente de su tamaño. Aunque “proteína” se usa frecuentemente en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y “péptido” se usa frecuentemente en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la materia se solapa y varía. Por tanto, el término “polipéptido” como se usa en este documento se refiere a péptidos, polipéptidos y proteínas, a menos que se indique lo contrario. Además, los términos “proteína”, “polipéptido” y “péptido” se usan indistintamente en este documento.

Un polipéptido de la presente invención puede comprender aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros de péptidos, y puede contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por el gen. Un polipéptido puede modificarse por cualquier procedimiento natural tal como por procesamiento pos-traducciona, o por técnicas de modificación química que se conocen en la técnica. Tales modificaciones serán conocidas para aquellos expertos en la materia. Las modificaciones pueden producirse en cualquier parte en un polipéptido, que incluye el esqueleto del péptido, las cadenas laterales del aminoácido y los

extremos amino o carboxilo. El mismo tipo de modificación puede estar presente en los mismos grados o grados variables en varios sitios en un polipéptido dado.

Un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Un polipéptido puede estar ramificado, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, o un polipéptido puede ser cíclico, con o sin ramificación. Polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procedimientos naturales de pos-traducción, o pueden prepararse por procedimientos sintéticos. Modificaciones representativas incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclización, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclas de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, acetilación, serilación, suilación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins – Structure And Molecular Properties*, 2ª ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York, Nueva York, EE.UU. (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, (Johnson, ed.), Academic Press, Nueva York, Nueva York, EE.UU., pág. 1-12 (1983); Seifter y col., (1990) *Method Enzymol.* 182:626-646; y Rattan y col., (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62).

Como se usa en este documento, los términos “señalar” y “señalización intracelular” se usan indistintamente. En un aspecto, los términos significan la transmisión de información referente a la unión de un ligando con la región extracelular de un receptor de la presente invención, que incluye tanto receptores quiméricos como receptores naturales de longitud completa, al interior de una célula. En otro aspecto, los términos significan uno o más acontecimientos que se producen dentro de una célula que indican que se ha producido un acontecimiento dado tal como la unión a ligando por el segmento extracelular de un receptor. El uno o más acontecimientos pueden formar elementos de una ruta de tipo cascada.

Como se usa en este documento, el término “sustancialmente idéntico” significa al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos. Los polipéptidos que son sustancialmente idénticos a un polipéptido de receptor de quimiocina (o un fragmento del mismo), tal como un polipéptido de CCR2A (SEC ID N°: 2), CCR2B (SEC ID N°: 4) o de CCR3 (SEC ID N°: 6), pueden tener entre aproximadamente el 70% y aproximadamente el 80%, preferentemente entre aproximadamente el 81% y aproximadamente el 90%, o incluso más preferentemente entre aproximadamente el 91% y aproximadamente el 99% de identidad de secuencias con la secuencia correspondiente de una proteína de CCR2 o de CCR3 natural, o fragmento de la misma. La identidad de secuencias se calcula basándose en una secuencia de referencia, que puede ser un subconjunto de una secuencia mayor. Si una secuencia de referencia es una secuencia de polipéptidos, la secuencia de referencia puede tener al menos aproximadamente 6 aminoácidos de longitud o más, normalmente al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, y puede extenderse hasta la secuencia completa que está siendo comparada. Si una referencia es una secuencia de nucleótidos, la secuencia de referencia también puede tener al menos aproximadamente 18 residuos de longitud o al menos aproximadamente 30 residuos de longitud. En la técnica se conocen algoritmos para el análisis de secuencias, tales como BLAST, descrito en Altschul y col., (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, y otros descritos en este documento.

Como se usa en este documento, el término “vector” significa un replicón tal como plásmido, fago o cósmido, con el que otro segmento de ADN puede asociarse de manera que se provoque la replicación del segmento asociado.

II Receptores de quimiocinas quiméricas de la presente divulgación

En toda la presente divulgación se ha adoptado la siguiente nomenclatura: cuando se refiere a una quimera, la notación de la izquierda a la derecha sigue el extremo N a C de la quimera. Por ejemplo, la notación “CCR3/2” indica que el extremo N de la quimera se deriva de CCR3, mientras que el extremo C se deriva de CCR2. Análogamente, la notación “CCR2/3” indica que el extremo N de la quimera se deriva de CCR2, mientras que el extremo C se deriva de CCR3.

II.A. Receptor CCR3/2 quimérico

Combinando un segmento que comprende el primer residuo del extremo N hasta al menos el último residuo de la séptima región que atraviesa TM de CCR3 con toda o una parte de la cola citoplásmica de CCR2, por ejemplo, desde el primer residuo no TM intracelular hasta el último residuo del extremo C, la mayoría de, si no todas, las propiedades de unión de ligando una quimera CCR3/2 tal no se diferenciarán significativamente de las de CCR3 natural intacto. Similarmemente, las propiedades de señalización de la quimera CCR3/2 no se diferenciarán significativamente de las de CCR2 natural intacto. La generación de un receptor quimérico con cambios mínimos para el extremo N/región TM y la cola citoplásmica del extremo C que demuestra tanto capacidad de unión a ligando adecuada como capacidad de señalización funcional es la primera etapa en este procedimiento.

La importancia de preservar un séptimo dominio TM correcto para mantener las características de unión de receptor se demuestra por un GPCR que termina en el séptimo dominio TM y no tiene cola citoplásmica, concretamente el

receptor de la hormona liberadora de gonadotropina de mamífero. El receptor de la hormona liberadora de gonadotropina de mamífero (GnRHR) es el único GPCR conocido en el que la cola del extremo C está ausente (véase, por ejemplo, Eidne y col., (1992) Mol. Cell. Endocrinol. 90:R5-R9) y todavía continúa uniéndose al ligando y señalizando apropiadamente (véase, por ejemplo, Heding y col., (1998) J. Biol. Chem. 273(19):11472-11477). En 1999, Flanagan y col. informaron que cambios menores introducidos en el séptimo dominio TM de un GnRHR de mamífero tenían efectos espectaculares sobre las expresión del receptor y el acoplamiento a proteína G (Flanagan y col., (1999) J. Biol. Chem. 274(41):28880-86). En otro estudio, Brothers y col. demostraron que los residuos dentro del séptimo dominio TM de GnRHR de mamífero son importantes para la unión a ligando, además de Brothers y col., (2002) Mol. Cell Endocrinol. 190:19-27).

A diferencia de la importancia de mantener el séptimo dominio TM correcto, la adición de una cola del extremo C de otros GPCR al GnRHR de mamífero no altera sus propiedades de unión de ligando, pero la adición cambia cómo el receptor responde al ligando tanto en términos de tasas de internalización del receptor como de respuesta de señalización (willars y col., (1999) J. Biol. Chem. 274(42) 30146-53; Heding y col., (1998) J. Biol. Chem. 273(19):11472-77). Sin embargo, no es posible añadir ningún extremo C a un GPCR "sin cola" sin introducir el potencial de interrumpir la expresión del receptor de interés, ya que simplemente el cambiar el codón de terminación cambiando el marco de la proteína precisamente en la dirección 5' del codón de terminación nativo puede producir un receptor no expresado (Heding y col., (1998) J. Biol. Chem. 273(19):11472-77).

Teniendo en cuenta lo anterior, un enfoque para producir un receptor de quimiocina quimérica funcional evitaría cambios en la séptima región transmembrana y utilizaría una sustitución conservativa para el extremo C de manera que se minimizara cualquier cambio en la internalización y señalización de receptores. Por tanto, los receptores quiméricos de la presente invención no incorporan cambios en la séptima región transmembrana de CCR3, mientras que introducen una sustitución conservativa en el extremo C reemplazando el extremo C de un receptor de quimiocina (por ejemplo, CCR3 o CCR2) con el del otro (por ejemplo, CCR2 o CCR3, respectivamente). A este respecto, se predice que reemplazar el extremo C de CCR2 o CCR3 con el del otro receptor de quimiocina proporcionaría un receptor funcional con respecto a la señalización, con poco cambio, si lo hubiera, en las características de unión a ligando.

Como se describe en este documento se formó una quimera tal, concretamente una quimera CCR3/2. Esta quimera comprende el extremo N hasta el último residuo de la séptima región que atraviesa TM de CCR3 (nº de acceso de GenBank U28694), concretamente los residuos 1-310, que está unido a la cola citoplásmica intracelular de la isoforma B de CCR2, concretamente los residuos 315-360, con el fin de formar una quimera de 356 residuos. El ochenta y siete por ciento de la secuencia de aminoácidos de la quimera se deriva de CCR3, mientras que el 13% de la quimera se deriva de la isoforma B de CCR2. Similarmente, el 87% de la secuencia de ácidos nucleicos de la quimera se deriva de CCR3, mientras que el 13% de la quimera se deriva de la isoforma B de CCR2. La quimera CCR3/2 comparte el 55% de identidad de aminoácidos con la isoforma A de CCR2 (nº de acceso de GenBank AF545480) y el 62% de identidad con la isoforma B de CCR2 (nº de acceso de GenBank U03905). La homología global entre la secuencia de ácidos nucleicos del marco de lectura abierto de la quimera CCR3/2 humana y el marco de lectura abierto de la isoforma A de CCR2 humana es aproximadamente el 60%. Adicionalmente, la homología global entre los marcos de lectura abiertos de la quimera CCR3/2 humana y la isoforma B de CCR2 humana es aproximadamente el 68%.

Una quimera CCR3/2 descrita en este documento puede emplearse en una variedad de funciones. En un ejemplo, esta quimera puede emplearse para explorar la biología de la estimulación de quimiocinas (es decir, eotaxina) de receptores y para distinguir las características de unión a ligando de un receptor particular, a la vez que se evita el uso del aparato de señalización en la dirección 3' nativo del receptor relacionado (es decir, CCR3). En otro ejemplo, una quimera tal puede emplearse en el cribado de uno o más compuestos de prueba que pueden inhibir la unión de eotaxina a probablemente sitios de unión en la región de CCR3 de la molécula quimérica. Tales compuestos inhibidores podrían ser útiles en la prevención y/o el tratamiento de condiciones que pueden resultar de la estimulación en exceso del receptor relacionado (es decir, CCR3), tal como rinitis y/o asma.

Otra ventaja de la quimera CCR3/2 descrita en este documento es que puede emplearse en sistema de no eosinófilos recombinantes.

Como se describe en este documento, un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención comprende no sólo la región del extremo N extracelular de un receptor, sino también la región transmembrana completa. Más particularmente, un receptor de quimiocina de la presente invención comprende las siete hélices TM. Ninguna otra quimera conocida por los presentes inventores incorpora esta región completa. Como se trata en este documento anteriormente, la mayoría de las quimeras de quimiocinas conocidas sólo incorporan la región del extremo N extracelular y no incorporan la región TM de siete hélices completa.

Como se muestra en la Figura 1, una quimera CCR3/2 de la presente invención presentó unión a eotaxina. La unión observada fue muy similar a la presentada por el receptor intacto natural en eosinófilos. Esta observación ejemplifica una ventaja de las quimeras de la presente invención, concretamente que las quimeras de la presente invención pueden estudiarse, y los moduladores candidatos identificarse, en un sistema de no eosinófilos.

Además, en estudios de unión, se observó que el compuesto 1 compete con la eotaxina por la unión al fragmento de CCR3 extracelular (véase el Ejemplo 6). Los resultados de este conjunto de experimentos indican que una quimera tal podría emplearse en un procedimiento de cribado diseñado para identificar inhibidores de unión a eotaxina.

II.B. Polipéptidos de CCR2/CCR3 quiméricos

5 El mismo enfoque presentado anteriormente con respecto a la formación de una quimera CCR3/2 se empleó para formar la quimera CCR2/3 de la invención. Más específicamente, el extremo N hasta el último residuo de la séptima región que atraviesa TM de CCR2 se unió a la cola citoplásmica de CCR3. Como se ejemplifica en este documento, una quimera CCR2/CCR3 puede formarse empleando los procedimientos que se emplearon para construir una quimera CCR3/CCR2 de la presente invención. Basándose en los resultados del estudio de unión presentados en este documento para una quimera CCR3/2 (véase la Figura 1 y el Ejemplo 6), se espera que la mayoría de, si no todas, las propiedades de unión a ligando de la quimera CCR2/3 no se diferencien de las de CCR2 natural intacto.

Al igual que la quimera CCR3/2 descrita en este documento, la quimera CCR2/3 de la invención puede emplearse para identificar inhibidores de ligandos relacionados con CCR2 en diversas operaciones de cribado y para estudiar la biología de la unión a receptor.

15 II.C. Otros receptores de quimiocinas quiméricas

Una quimera binaria como también se describe en este documento generalmente comprende al menos la región extracelular y transmembrana contigua, que se derivará de un receptor de quimiocina. Unida a esta región está toda o una parte de la región intracelular derivada de un segundo receptor de quimiocina. Como en el caso de CCR2/CCR3, un receptor de quimiocina quimérica puede formarse empleando los procedimientos ejemplificados en este documento para la construcción de un receptor de quimiocina quimérica CCR3/2.

Se prefieren las quimeras binarias que comprenden una secuencia contigua que comprende al menos la secuencia extracelular y TM derivada de un receptor de quimiocina por los motivos presentados en este documento. Por ejemplo, el perfil de unión a ligando de una quimera binaria de la presente invención es similar al del receptor natural del que se deriva el extremo N de la quimera (véase la Figura 1). Adicionalmente, el perfil de señalización es similar al del receptor natural del que se deriva el extremo C de la quimera. Por tanto, las quimeras también descritas en este documento pueden ser útiles en el cribado de moduladores de la señalización de unión a receptor y mediada por receptor. Estas quimeras muestran adicionalmente la ventaja de que son recombinantes y pueden expresarse en un sistema sin eosinófilos.

Además, los resultados de los experimentos de competición con una quimera CCR3/2 (véase la Figura 1 y el Ejemplo 6) indican que las quimeras que comprenden secuencias derivadas de otros receptores de quimiocinas y GPCR pueden ser útiles en ensayos de cribado diseñados para identificar inhibidores de quimiocina que se unen al receptor relacionado extracelular de la quimera.

III.A. Equivalentes de ácido nucleico

Los equivalentes de ácidos nucleicos pueden compartir un grado de homología con uno o varios polinucleótidos, tales como aquellos que codifican las quimeras descritas en este documento. El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede ser homología parcial u homología completa, siendo la homología completa equivalente a identidad. Una secuencia parcialmente complementaria que inhibe al menos parcialmente una secuencia idéntica de la hibridación con un ácido nucleico diana se denomina en lo sucesivo con el término funcional "sustancialmente homóloga". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (por ejemplo, transferencia Southern o Northern, hibridación en disolución, y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia sustancialmente homóloga o sonda competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia completamente homóloga o sonda con la secuencia diana en condiciones de baja rigurosidad. Sin embargo, las condiciones de baja rigurosidad no permiten la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede probarse por el uso de una segunda secuencia diana que carece incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, inferior a aproximadamente el 30% de identidad). En ausencia de unión no específica, la sonda no se hibridará con la segunda secuencia diana no complementaria.

Aquellos expertos en la materia sabrán cómo determinar la identidad en porcentaje entre dos/entre varias secuencias usando, por ejemplo, algoritmos tales como aquellos usados en el programa informático GAP (Needleman & Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48(3):443-53) o basándose en el programa informático CLUSTALW (Thompson y col., (1994) Nucleic Acid Res. 2(22):4673-4680) o FASTDB (Brutlag y col., 1990, Comp. App. Biosci. 6:237-245), como se conoce en la técnica. Aunque el algoritmo de FASTDB normalmente no considera deleciones o adiciones de no apareamiento internas en secuencias, es decir, huecos, en su cálculo, esto puede corregirse manualmente para evitar una estimación por exceso de la identidad en porcentaje. Sin embargo, GAP y CLUSTALW tienen en cuenta huecos de secuencias en sus cálculos de identidad.

También disponibles para aquellos expertos en la materia están los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (Altschul y col.,

(1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 y Altschul y col., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410). El programa BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

III.B. Equivalentes de polipéptidos

- 5 Los equivalentes de polipéptidos de los polipéptidos quiméricos de la presente invención también se describen en este documento. Por ejemplo, un polipéptido que comparte un grado (pero inferior al 100%) de identidad o similitud con una quimera de la presente invención se denomina en lo sucesivo un equivalente.

Para secuencias de aminoácidos, la similitud e identidad en porcentaje puede determinarse, por ejemplo, empleando el programa BLASTP. El programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3 y una expectativa (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915) usa alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

Un equivalente de polipéptido puede ser, por ejemplo, un equivalente estructural. Un equivalente estructural es un polipéptido que retiene una estructura equivalente tanto al nivel local como al nivel global, o ambos, con respecto a un polipéptido de referencia, pero no comparte el 100% de identidad de secuencias o similitud. Por ejemplo, un polipéptido en el que se han introducido una o más sustituciones conservativas puede tener una secuencia de aminoácidos que es diferente de la de una secuencia de referencia, a la vez que todavía retiene una estructura equivalente global, al nivel global y/o local. Tales polipéptidos se denominan en lo sucesivo equivalentes estructurales del polipéptido de referencia.

III.C. Equivalentes biológicos

- 20 Los equivalentes biológicos de los polipéptidos de la presente invención se describen además en este documento. Un equivalente biológico es un polipéptido que presenta la misma actividad biológica, aunque no necesariamente al mismo grado, que un polipéptido de referencia (por ejemplo, un polipéptido quimérico de la presente invención). Un equivalente biológico puede comprender más aminoácidos, menos o diferentes a los encontrados en el polipéptido de referencia.

IV. Polinucleótidos que codifican polipéptidos de la presente invención

Los ácidos nucleicos de la presente invención, que incluyen aquellos que codifican un receptor de quimiocina natural o un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención, pueden clonarse, sintetizarse, alterarse recombinantemente, o combinaciones de los mismos. Las técnicas de clonación convencionales de ADN recombinante y moleculares usadas para aislar ácidos nucleicos son muy conocidas en la técnica. A modo de ejemplo, procedimientos no limitantes se describen, por ejemplo, por Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (3ª ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, (2001); por Silhavy y col., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1984); por Current Protocols in Molecular Biology, (Ausubel y col., eds.), Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, Nueva York (2002); y por Glover, (ed.) (1985) DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, R.U. La mutagénesis específica de sitio puede usarse para crear cambios, delecciones de pares de bases o en la técnica también se conocen pequeñas inserciones (véase, por ejemplo, Adelman y col., (1983) DNA 2:183; Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, (2001)).

Las secuencias desveladas o detectadas mediante los procedimientos de la presente invención pueden detectarse, subclonarse, secuenciarse y evaluarse adicionalmente por cualquier técnica conocida en la materia usando cualquier procedimiento normalmente aplicado a la detección y/o caracterización de una secuencia de ADN específica que incluye, pero no se limita a, secuenciación de dideoxi, PCR, restricción de oligómeros (Saiki y col., (1985) Bio/Technology 3:1008-1012), análisis de sondas de oligonucleótidos específicas de alelos (ASO) (Conner y col., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:278) y ensayos de ligación de oligonucleótidos (OLA) (Landgren y col., (1988) Science 241:1007). Se han revisado las técnicas moleculares para el análisis de ADN (Landgren y col., (1988) Science 242:229-237) y pueden emplearse en la presente invención.

En un aspecto, la presente invención se refiere a vectores que comprenden los polinucleótidos de la presente invención (tales como un vector que codifica una quimera de la presente invención), células huésped y la producción de polipéptidos por técnicas recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, plásmido, vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser de replicación competente o replicación defectuosa. En el último caso, la propagación vírica se producirá generalmente sólo en células huésped complementarias.

Un polinucleótido puede unirse a un vector que comprende un marcador de selección para la propagación en un huésped. Generalmente, un vector de plásmido puede introducirse en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede encapsidarse *in vitro* usando una línea celular de encapsidación apropiada y luego transducirse en células huésped.

El inserto de polinucleótido puede estar operativamente ligado a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del

fago λ , los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores tempranos y tardíos del SV40 y los promotores de LTR retrovíricas, por nombrar algunos. Otros promotores adecuados serán conocidos para aquellos expertos en la materia. Las construcciones de expresión pueden comprender adicionalmente sitios para la iniciación, terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos expresados por las construcciones puede incluir un codón de iniciación de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) apropiadamente posicionado al final del polipéptido que va a traducirse.

Un vector de expresión puede comprender al menos un marcador de selección. Tales marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, G418 o resistencia a neomicina para cultivo celular eucariota y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias.

Ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas tales como células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (nº de acceso de ATCC 201178)); células de insecto tales como células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*; células de animales tales como CHO, COS, 293, y células de melanoma de Bowes; y células de plantas. En la técnica se conocen medios de cultivos y condiciones apropiadas para las células huésped anteriormente descritas.

Ejemplos de vectores que pueden emplearse en un sistema bacteriano incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9 (disponibles de QIAGEN, Inc., Chatsworth, California, EE.UU.); vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (disponibles de Stratagene Cloning Systems, Inc., La Jolla, California, EE.UU.); y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (disponibles de Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey, EE.UU.).

Ejemplos de vectores eucariotas que pueden emplearse incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia (Piscataway, Nueva Jersey, EE.UU.).

Ejemplos de vectores de expresión que pueden emplearse en un sistema de levadura incluyen, pero no se limitan a, pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3,5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K y PAO815 (todos disponibles de Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Otros vectores adecuados serán rápidamente evidentes para un experto en la materia.

La introducción de la construcción en la célula huésped puede estar mediada por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros procedimientos. Tales procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar tales como Davis y col., Basic Methods In Molecular Biology (2ª ed.) Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut (1994). Se contempla específicamente que los polipéptidos de la presente invención puedan expresarse por una célula huésped que carece de un vector recombinante.

Además de englobar células huésped que contienen las construcciones de vector tratadas en este documento, la presente invención también engloba células huésped primarias, secundarias e inmortalizadas de origen vertebrado, particularmente de origen mamífero, que se han manipulado para delecionar o sustituir material genético endógeno (por ejemplo, secuencia codificante) y/o para incluir material genético (por ejemplo, secuencias de polinucleótidos heterólogas) que están operablemente asociadas a un polinucleótido de la presente invención, y que activa, altera y/o amplifica polinucleótidos endógenos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas conocidas en la materia para asociar operablemente una región de control heteróloga (por ejemplo, promotor y/o potenciador) y secuencias de polinucleótidos endógenas mediante recombinación homóloga, produciendo la formación de una nueva unidad de transcripción (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.641.670; la patente de EE.UU. nº 5.733.761; publicación PCT nº WO 96/29411; publicación PCT nº WO 94/12650; Koller y col., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra y col., (1989) Nature 342:435-438).

Una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de quimiocina nativo o un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención puede identificarse y aislarse usando procedimientos convencionales, tales como aquellos descritos por Sambrook y col. (1989). Por ejemplo, puede emplearse PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) para aislar y/o clonar ADNc de interés. En este procedimiento, oligo-dT puede emplearse como cebador en una reacción de transcriptasa inversa para preparar ADNc de la primera cadena de ARN aislado que contiene secuencias de ARN de interés, por ejemplo, ARN aislado de tejido humano. Entonces, el ARN puede aislarse mediante procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, usando el reactivo TRIZOL (GIBCO-BRL/Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). Entonces, los ADNc de la primera cadena transcritos se amplifican en reacciones de PCR.

Los productos de cada reacción de PCR pueden entonces separarse por un gel de agarosa, purificarse en gel y clonarse directamente en un vector adecuado, tal como un vector de plásmido conocido. Los plásmidos resultantes se someten a endonucleasa de restricción y secuenciación de didesoxi de ADN bicatenario de plásmidos. Si se determina la precisión de la secuencia clonada, el plásmido puede introducirse en un sistema de expresión adecuado tal como un sistema de expresión bacteriano como se describe en este documento.

V. Polipéptidos de la presente invención

- La generación de un receptor de quimiocina quimérica forma un aspecto de la presente invención. En general, un receptor de quimiocina quimérica comprende un polipéptido de CCR2 o una parte de un polipéptido de CCR2 que puede unirse a un polipéptido candidato o una región adecuada del polipéptido candidato, concretamente un polipéptido de CCR3. La fusión se hace de forma que el CCR2 forme el extremo N de la quimera, con la condición de que el segmento del receptor de quimiocina empleado como extremo N comprenda la región extracelular, además de al menos la región TM completa del receptor de quimiocina. El segmento del extremo C del receptor quimérico comprende toda o una parte de la región intracelular de un receptor de quimiocina que es diferente del receptor usado para formar el extremo N del receptor de quimiocina quimérica.
- La aplicación de mutagénesis dirigida a sitio y el ensamblaje de receptores de quimiocinas que comprenden dominios de dos o más receptores de quimiocinas diferentes (es decir, receptores quiméricos) se ha empleado como una estrategia para obtener un mejor entendimiento de la relación estructura-función en GPCR (véase, por ejemplo, Jackson, (1991) *Pharmacol. Ther.* 50(3):425-42; Peiper y col., (1997) *Method Enzymol.* 288: 56-70). Algunas estrategias representativas para ensamblar polipéptidos quiméricos, tales como receptores de quimiocinas quiméricas, incluyen reacción en cadena de la polimerasa por solapamiento (PCR por solapamiento), PCR por ligación y mutagénesis por PCR en la que sitios de restricción únicos se introducen en puntos deseados de ligación (Peiper y col., (1997) *Method Enzymol.* 288: 56-70). Como se describe en este documento, se empleó mutagénesis por PCR con la introducción de sitios de restricción únicos en puntos de ligación deseada.
- Aunque se han empleado estas diversas técnicas en la materia para unir dominios de diferentes quimiocinas, las quimeras generadas no comprendieron una secuencia contigua que comprendía la secuencia extracelular hasta al menos la séptima secuencia TM de un receptor de quimiocina unido con toda o una parte de una región intracelular de un segundo receptor de quimiocina.
- La expresión recombinante de un polipéptido quimérico de la presente invención, o un fragmento del mismo, requiere la construcción de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido tal. Una vez se ha obtenido un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico, o porción del mismo, un vector para la producción del polipéptido puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas conocidas en la materia. En este documento se describen procedimientos para preparar una proteína que expresa un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos quiméricos.
- Los polipéptidos de la presente invención, que incluye los receptores de quimiocinas quiméricas, pueden prepararse en una variedad de formas. La idoneidad de cada procedimiento descrito en este documento o conocido para aquellos expertos en la materia será evidente para aquellos expertos en la materia tras la consideración de la presente divulgación. En los párrafos que siguen se describen varios procedimientos de producción de un polipéptido de la presente invención.
- Los polipéptidos de la presente invención, que incluyen tanto receptores de quimiocinas naturales como quimeras, además de fragmentos de los mismos, pueden sintetizarse químicamente en conjunto o en parte usando técnicas que se conocen en la materia (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, (2ª ed.) W.H. Freeman & Co., Nueva York, (1993)).
- Adicionalmente, pueden emplearse procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia para construir vectores de expresión que comprenden un secuencia codificante de polipéptidos quiméricos y señales de control de la transcripción y de la traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, como se describen en este documento, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, USA (2001) y *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausubel y col., eds.), Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, Nueva York (2002). Por tanto, la presente invención engloba vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención, que puede ligarse operativamente a un promotor.
- Un vector de expresión formado con arreglo a la presente invención puede transferirse a una célula huésped por técnicas convencionales (por ejemplo, precipitación o electroporación), y las células transfectadas se cultivan entonces por técnicas convencionales para producir un polipéptido de la presente invención. Por tanto, la presente invención comprende células huésped que comprenden un vector que comprende un polinucleótido que codifica un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención, que puede ligarse operativamente a un promotor.
- Puede emplearse una variedad de sistemas de vectores de expresión en huésped para expresar un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención. Tales sistemas de expresión en huésped representan vehículos por los que una secuencia codificante de interés puede producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención *in situ*. Células adecuadas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o de ADN de

cósmido que contienen una secuencia codificante de receptores de quimiocinas quiméricas; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen una secuencia codificante de receptores de quimiocinas quiméricas; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia codificante de receptores de quimiocinas quiméricas; sistemas de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV); del mosaico del tabaco (TMV)) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen una secuencia codificante de receptores de quimiocinas quiméricas; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor del virus de la variolovacuna de 7,5K). Bajo algunas condiciones podría ser deseable que células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o células eucariotas, se usaran para la expresión de un polipéptido quimérico recombinante. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento principal del promotor de gen temprano intermedio del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz (Foecking y col., (1986) Gene 45:101; Cockett y col., (1990) Bio/Technology 8:2).

En sistemas bacterianos pueden emplearse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el polipéptido quimérico que se expresa. Por ejemplo, si va a producirse una gran cantidad de una proteína tal, por ejemplo, para la generación de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido quimérico (tal como un polipéptido quimérico de CCR3/CCR2 o CCR2/CCR3, como se describe en este documento), pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., (1983) EMBO J. 2:1791), en el que una secuencia codificante de receptores de quimiocinas quiméricas puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificante lac Z de manera que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, (1985) Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, (1989) J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa de la matriz, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de las proteasas trombina o factor Xa de manera que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insecto puede usarse el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus se cultiva en células de *Spodoptera frugiperda*. Una secuencia codificante de polipéptidos quiméricos puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la poliedrina) del virus y situarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la poliedrina).

En células huésped de mamífero pueden emplearse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, una secuencia codificante de polipéptidos quiméricos de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico puede entonces insertarse en el genoma de l adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y que puede expresar el polipéptido quimérico en huéspedes infectados (véase, por ejemplo, Logan & Shenk, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:355-359). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la eficiente traducción de secuencias codificantes de receptores de quimiocinas quiméricas insertados. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de la traducción eógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción apropiados, etc. (véase, por ejemplo, Bittner y col., (1987) Method Enzymol. 153:51-544).

Además, puede elegirse una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en el modo específico deseado. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteínas pueden ser importantes para la función de la proteína. Células huésped diferentes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento pos-traduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, líneas de células de cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y la línea de células de la glándula mamaria normal tal como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de las proteínas recombinantes, la expresión estable es frecuentemente deseable. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN extraño, puede permitirse que células manipuladas se cultiven durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y se cultiven para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este procedimiento puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan un receptor de quimiocina quimérica. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de compuestos que interactúan directamente o indirectamente con un receptor de quimiocina quimérica.

Pueden usarse varios sistemas de selección en el procedimiento de expresar un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención. Tales sistemas pueden indicar un acontecimiento de transformación satisfactorio. Por ejemplo, pueden emplearse genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., (1977) Cell 11:223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48:202), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., (1980) Cell 22:817) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Por tanto, puede usarse la resistencia a antimetabolitos como base de selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler y col., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:357; O'Hare y col., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1527); *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2072); *neo*, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu & Wu, (1991) Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, (1993) Science 260:926-932; y Morgan & Anderson, (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; TIB TECH 11(5):155-215, mayo, 1993); e *hygro*, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y col., (1984) Gene 30:147). Pueden aplicarse procedimientos conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales procedimientos se describen, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds.), Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, Nueva York (2002); Kriegerler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, Nueva York, Nueva York, USA (1990); Current Protocols in Human Genetics, (Dracopoli y col., eds.), John Wiley & Sons, Nueva York, Nueva York, USA (1994), Capítulos 12 y 13; y Colberre-Garapin y col., (1981) J. Mol. Biol. 150:1.

Los niveles de expresión de un receptor de quimiocina quimérica pueden aumentarse por la amplificación de vectores (para una revisión véase Bebbington & Hentschel, en DNA Cloning, vol. 3, Academic Press, Nueva York (1987)). Si un marcador en el sistema de vector que expresa un polipéptido quimérico es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada al gen del polipéptido quimérico, también aumentará la producción del polipéptido quimérico (Crouse y col., (1983) Mol. Cell. Biol. 3:257).

Dependiendo del sistema de huésped/vector utilizado, en el vector de expresión pueden usarse distintos elementos de transcripción y traducción adecuados, que incluyen promotores constitutivos e inducibles. Como se ha indicado, por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden emplearse promotores inducibles tales como pL de bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido de ptrp-lac) y similares. Si se clona en sistemas de células de insecto pueden emplearse promotores tales como el promotor de la poliedrina del baculovirus. Si se clona en sistemas de células de mamífero pueden emplearse promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus o el promotor del virus de la varicelovacuina de 7,5K). Si se generan líneas celulares que contienen múltiples copias del ADN del dominio de tirosina cinasa, pueden usarse vectores basados en SV40, BPV y EBV con un marcador de selección apropiado. Procedimientos representativos de la producción de un polipéptido de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras la consideración de la presente divulgación, y también se describen en este documento.

Una vez se ha producido, se ha sintetizado químicamente o se ha expresado recombinantemente un polipéptido quimérico de la presente invención por un animal, puede purificarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de una proteína, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía por interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita, cromatografía en lectina, intercambio iónico, cromatografía en columna de exclusión molecular, cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC"), etc.), centrifugación, solubilidad diferencial, o cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, un polipéptido quimérico de la presente invención o fragmentos del mismo pueden unirse a secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en este documento o de otro modo conocidas en la técnica, para facilitar la purificación.

En algunas realizaciones, un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención puede purificarse según procedimientos convencionales de la materia, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, precipitación con etanol, extracción con ácido, cromatografía de afinidad, electroforesis en gel y similares (véase, genéricamente, Protein Purification: Principles and Practice (3ª ed.), Springer-Verlag, Nueva York (1994)).

Los polipéptidos de la presente invención, que incluyen sus formas secretadas, también puede recuperarse de: productos purificados de fuentes naturales que incluyen fluidos corporales, tejidos y células, tanto directamente aislados como cultivados; productos de procedimientos de síntesis química; y productos producidos por técnicas recombinantes de un huésped procarionta o eucariota que incluyen, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insecto y de mamífero.

Como se observa en este documento anteriormente, los polipéptidos de la presente invención no necesitan expresarse recombinantemente y pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, véase Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Principles* (2ª ed.) W.H. Freeman & Co., Nueva York, (1993), y Hunkapiller y col., (1984) *Nature* 310:105-111). Por ejemplo, un polipéptido que comprende un fragmento de una secuencia de polipéptidos de la presente invención puede sintetizarse empleando un sintetizador de péptidos.

Si se desea, los aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos pueden introducirse como una sustitución o adición en la secuencia de polipéptidos. Aminoácidos no clásicos representativos incluyen, pero no se limitan a, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como β -metilaminoácidos, C α -metilaminoácidos, N α -metilaminoácidos, y análogos de aminoácidos en general. Además, un aminoácido incorporado puede ser D (dextrógiro) o L (levógiro).

La presente invención engloba receptores de quimiocinas quiméricas que se modifican de forma diferente durante o después de la traducción, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Las modificaciones químicas pueden llevarse a cabo por técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄; acetilación, formilación, oxidación, reducción; síntesis metabólica en presencia de tunicamicina; etc.

Las modificaciones pos-traduccionales adicionales englobadas por la invención incluyen, por ejemplo, cadenas de hidratos de carbono ligadas a N o ligadas a O, procesamiento del extremo N o extremo C, unión de restos químicos al esqueleto de aminoácido, modificaciones químicas de cadenas de hidratos de carbono ligadas a N o ligadas a O y adición o delección de un residuo de metionina del extremo N como resultado de la expresión de células huésped procariontas. Los polipéptidos también pueden modificarse con una marca detectable, tal como una marca enzimática, fluorescente, isotópica o de afinidad para permitir la detección y aislamiento de la proteína, la adición de fragmentos de péptidos marcados con epítopo (por ejemplo, FLAG, HA, GST, tiroredoxina, proteína de unión a maltosa, etc.), unión de marcas de afinidad tales como biotina y/o estreptavidina, la unión covalente de restos químicos al esqueleto del aminoácido, procesamiento del extremo N o C de los extremos de polipéptidos (por ejemplo, procesamiento proteolítico), delección del residuo de metionina del extremo N, etc.

También se proporciona por la presente invención derivados químicamente modificados de los polipéptidos de la presente invención que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como aumento de la solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación del polipéptido, o disminución de la inmunogenicidad (véase la patente de E.E.UU. n° 4.179.337). Los restos químicos para la derivatización pueden seleccionarse de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) y similares. Los polipéptidos pueden modificarse en posiciones al azar dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos.

Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) pueden unirse a la proteína con consideración del efecto sobre dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Hay varios procedimientos de unión disponibles para aquellos expertos en la materia (véanse, por ejemplo, EP 0 401 384 (acoplamiento de PEG a G-CSF) y Malik y col., (1992) *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (que informa de la PEGilación de GM-CSF usando cloruro de tresilo)). Por ejemplo, el polietilenglicol puede unirse covalentemente a residuos de aminoácido por un grupo reactivo tal como un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que puede unirse una molécula de polietilenglicol activada. Los residuos de aminoácido que tienen un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y los residuos de aminoácido del extremo N; aquellos que tienen un grupo carboxilo libre puede incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo de aminoácidos del extremo C. Los grupos sulfhidrilo también pueden usarse como grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol. Para fines terapéuticos puede ser deseable la unión a un grupo amino, tal como la unión al extremo N o grupo de lisina.

Pueden desearse específicamente proteínas químicamente modificadas en el extremo N. Usando polietilenglicol como ilustración de la presente composición, de una variedad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.) puede seleccionarse la proporción de moléculas de polietilenglicol con respecto a moléculas de proteína (polipéptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de PEGilación que va a realizarse y el procedimiento de obtención de la proteína PEGilada del extremo N seleccionada. El procedimiento de obtener la preparación PEGilada del extremo N (es decir, separando este resto de otros restos monoPEGilados si fuera necesario) puede ser por purificación del material PEGilado del extremo N de una población de moléculas de

5 proteína PEGilada. Las proteínas selectivas químicamente modificadas en la modificación del extremo N pueden formarse por alquilación reductiva que explota la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al extremo N) disponibles para la derivatización en una proteína particular. Bajo las condiciones de reacción apropiadas se logra la derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N con un polímero que contiene grupo carbonilo.

10 Como con los diversos polímeros ejemplificados anteriormente, se contempla que los residuos poliméricos puedan comprender grupos funcionales además de, por ejemplo, aquellos normalmente implicados en el enlace de los residuos poliméricos a los polipéptidos de la presente invención. Tales funcionalidades incluyen, por ejemplo, grupos carboxilo, amina, hidroxilo y tiol. Estos grupos funcionales en los residuos poliméricos pueden hacerse reaccionar adicionalmente, si se desea, con materiales que generalmente son reactivos con tales grupos funcionales y que pueden ayudar en la reacción como diana de tejidos específicos en el cuerpo que incluyen, por ejemplo, tejido enfermo. Materiales a modo de ejemplo que pueden hacerse reaccionar con los grupos funcionales adicionales incluyen, por ejemplo, proteínas que incluyen anticuerpos, hidratos de carbono, péptidos, glucopéptidos, glicolípidos, lectinas y nucleósidos.

15 Además, la presente invención también engloba la derivatización de los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, con un lípido (incluyendo cationico, aniónico, polimerizado, cargado, sintético, saturado, insaturado, y cualquier combinación de los anteriores, etc.) y/o un agente estabilizante.

VI. Aplicaciones representativas de un polipéptido quimérico de la presente invención

20 Un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención puede emplearse en una variedad de aplicaciones. Una lista representativa, pero no limitante, de aplicaciones para un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención incluye el uso de estos receptores de quimiocinas en ensayos de cribado de ligandos candidatos, composiciones farmacéuticas y ensayos de señalización. Otras aplicaciones incluyen procedimientos de diagnóstico y terapéuticos.

25 Como se trata más abajo en más detalle, un polipéptido quimérico de la presente invención (es decir, una quimera CCR2/3) puede emplearse en una aplicación tanto sola como en combinación con otras composiciones.

A continuación se hace más discusión de algunas aplicaciones representativas de polipéptidos quiméricos de la presente invención.

VIA. Ensayos de cribado

30 Por consiguiente, en este documento también se describe que las quimeras de receptores de quimiocinas de la presente invención pueden emplearse en diversos ensayos de cribado. Por ejemplo, un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención puede emplearse en un ensayo diseñado para identificar compuestos que inhiben o potencian la unión de una quimiocina relacionada con un receptor de quimiocina que forma un elemento del receptor de quimiocina quimérica (por ejemplo, el segmento del extremo N extracelular o el segmento del extremo C intracelular).

35 Puede llevarse a cabo un ensayo de unión a ligando usando un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención, se proporcionan una quimiocina marcada (por ejemplo, ¹²⁵I-RANTES y/o ¹²⁵I-MIP-1) y un compuesto de prueba sin marcar. Inicialmente se determina un nivel de referencia de unión de quimiocina, contra el cual se calculan los posteriores experimentos de unión de quimiocinas. Las células que expresan un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención pueden lavarse con PBS y resuspenderse, después de que la quimiocina marcada y el compuesto de prueba sin marcar puedan ponerse en contacto con las células. Pueden emplearse estructuras distintas de células, en tanto que el receptor de quimiocina quimérica esté presente. Después de un periodo de incubación, las células pueden lavarse para eliminar la quimiocina sin unir. La cantidad de quimiocina marcada asociada a la quimera puede determinarse cuantificando la cantidad de marca asociada a la quimera. Si se emplea una radiomarca, la cuantificación puede comprender evaluar la cantidad de radiactividad asociada a la quimera. Puede hacerse una medición del efecto del compuesto de prueba sobre la unión de quimiocina comparando la unión de quimiocina en presencia y ausencia del compuesto de prueba; un menor grado de unión de quimiocina indica un grado de inhibición debido a la presencia del compuesto de prueba, mientras que un mayor grado de unión de quimiocina indica unión potenciada de la quimiocina debido a la presencia del compuesto de prueba. Adicionalmente, también pueden realizarse ensayos de unión a ligando competitivos. Tales ensayos pueden incorporar un ligando conocido por unirse a un segmento del receptor de quimiocina y un compuesto de prueba. Los procedimientos para realizar e interpretar los resultados de un ensayo de unión a ligando competitivo son conocidos para aquellos expertos en la materia. Generalmente, la unión de quimiocina a las células diana, tales como eosinófilos, puede llevarse a cabo usando metodología conocida (véase, por ejemplo, Van Riper, (1993) J. Exp. Med. 177:851-856). La unión puede evaluarse con respecto a tanto el segmento extracelular de un receptor de quimiocina quimérica como el segmento intracelular de un receptor de quimiocina quimérica.

Los receptores de quimiocinas quiméricas de la presente invención también pueden emplearse en ensayos de señalización intracelular. Más particularmente, las quimeras pueden emplearse para determinar un grado de señalización intracelular que se induce por un compuesto de prueba. Los ensayos de señalización intracelular

pueden ser de cualquier forma, aunque frecuentemente se emplea fosforilación o defosforilación de una molécula de señalización intracelular conocida y ofrece un enfoque conveniente para determinar cuantitativamente los niveles de señalización.

5 En un ejemplo de un ensayo de señalización intracelular, la hidrólisis de GTP a GDP puede ensayarse por metodología convencional. La hidrólisis de GTP es un aspecto de la actividad de señalización mediada por proteína G. El GTP se asocia a proteínas G y la hidrólisis de GTP a GDP, además del intercambio de GDP por GTP. Este último procedimiento se basa en un receptor, tal como un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención.

10 En un ensayo de señalización intracelular como también se ha descrito en este documento puede emplearse el GTP marcado y la hidrólisis de GTP a GDP puede emplearse como un indicador de la señalización inducida. En un ejemplo de un ensayo tal puede determinarse un nivel de referencia (control) de la hidrólisis de GTP dependiente de proteína G para un sistema dado. Un compuesto de prueba puede ponerse en contacto con una quimérica de la presente invención, y se determina un grado de hidrólisis de GTP. Entonces pueden compararse los dos niveles (es decir, en la presencia y ausencia del compuesto de prueba) y puede evaluarse el efecto del compuesto de prueba sobre la señalización. Pueden emplearse diversas marcas, tales como GTP radiomarcado. En un aspecto relacionado también puede monitorizarse el intercambio de GDP por GTP.

15 Otro ensayo de señalización que puede emplearse implica monitorizar los niveles de un mensajero secundario tal como, por ejemplo, calcio o diacilglicerol. Con respecto a niveles de calcio citosólico, un acontecimiento de señalización se asocia normalmente a un aumento transitorio en los niveles de calcio citosólico. Los ensayos para determinar un aumento tal se conocen en la técnica y pueden emplearse para ensayar el efecto de un compuesto de prueba sobre la señalización intracelular. Un ejemplo de un sistema para medir el aumento en los niveles de calcio citosólico se proporciona en Van Riper, (1993) J. Exp. Med. 177:851-856.

20 En un ejemplo de un procedimiento que puede emplearse puede medirse un nivel de referencia de calcio intracelular. Entonces, un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención, que puede disponerse en una célula u otra estructura, se pone en contacto con un compuesto de prueba. El nivel de calcio intracelular puede entonces determinarse por cualquier procedimiento conveniente y compararse los niveles. Si un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención está dispuesto en una célula, bajo condiciones de ensayo apropiadas puede emplearse un sistema tal como FACS para evaluar los niveles de calcio intracelular. También puede realizarse una etapa adicional de normalización de cualquier fluorescencia observada. Véase, por ejemplo, Van Riper, (1993) J. Exp. Med. 177:851-856 y/o Dahinden y col., (1994) J. Exp. Med. 179:751-756.

30 También puede emplearse un ensayo de quimiotaxia en un procedimiento de cribado que también se ha descrito en este documento. Tales ensayos se basan generalmente en el hecho de que se sabe que un acontecimiento de receptor de unión a ligando/quimiocina puede inducir la migración de células. Se describen ensayos adecuados, por ejemplo, en Nelson y col., (1975) J. Immunol. 115:1650; Matsushima y col., (1989) J. Exp. Med. 169:1485; Jose y col., (1994) J. Exp. Med. 179:881-887; Kavanaugh y col. (1991) J. Immunol. 146:4149-4156. En un ensayo de quimiotaxia como se describe en este documento también puede emplearse el conocimiento de que un acontecimiento de receptor de unión a ligando/quimiocina induce la migración de leucocitos.

35 En un ensayo de quimiotaxia particular, una célula que expresa un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención se pone en contacto con un compuesto de prueba. El efecto quimiotáctico del compuesto de prueba puede ensayarse examinando la migración, si la hay, de la célula tras la puesta en contacto. El uso de equipo adaptado para el análisis quimiotáctico, tal como un inserto TRANSWELL (Costar, Cambridge, Massachusetts), puede facilitar el ensayo, localizándose las células migratorias en el área debajo del inserto y localizándose las células no migratorias en la cámara superior del inserto.

40 Por tanto, la activación de receptores (es decir, señalización intracelular) puede determinarse por técnicas descritas en este documento o de otro modo conocidas en la técnica. Por ejemplo, la activación de receptores puede determinarse detectando la fosforilación (por ejemplo, tirosina o serina/treonina) del receptor o su sustrato por inmunoprecipitación, seguido de análisis de transferencia Western. Un ejemplo representativo de un ensayo de señalización se presenta en el Ejemplo 6 en este documento más adelante.

VIB. Composiciones farmacéuticas

45 Como además se ha descrito en este documento, el receptor de quimiocina quimérica de la presente invención, con o sin un agente terapéutico conjugado con él, administrado solo o en combinación con un factor citotóxico, una citocina u otro resto biológicamente activo que incluye una molécula pequeña, puede usarse como agente terapéutico.

50 Un receptor de quimiocina quimérica puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión de metal radiactivo, por ejemplo, un alfa-emisor tal como ²¹³Bi. Los términos "citotoxina" y "agente citotóxico" incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos de citotoxinas y agentes citotóxicos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, etamina, mitomicina, etoposido, teniposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitamicina, actinomicina D, 17 β -deshidrotestosterona,

glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina, y análogos u homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos representativos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptoporina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo-decarbazona), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa-clorambucilo, melfalan, capecitabina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además de una función como agente terapéutico, en este documento también se describen quimeras de la presente invención conjugadas con un agente de diagnóstico para su uso en operaciones de diagnóstico. Las quimeras pueden usarse diagnósticamente, por ejemplo, para monitorizar la señalización o unión a ligando, por ejemplo, para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento dada. La detección puede facilitarse opcionalmente acoplando la quimera a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen enzimas y hormonas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones de metales paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse tanto directamente con la quimera como indirectamente con un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un ligador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Ejemplos de enzimas adecuadas para la conjugación con una quimera incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

Las composiciones farmacéuticas que también se han descrito en este documento pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de una quimera de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" puede significar autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerada en la farmacopea americana u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. La formulación debería adaptarse al modo de administración.

Una composición puede formularse según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotópico estéril. Si es necesario, una composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran tanto por separado como mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Si una composición va a administrarse por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Si una composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de manera que los componentes puedan mezclarse antes de la administración.

Los compuestos también descritos en este documento pueden formularse como formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como aquellos derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellos formados con cationes tales como aquellos derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

La cantidad del compuesto también descrito en este documento que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado a expresión y/o actividad aberrante de un polipéptido de la presente invención puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse según el juicio del médico y cada una de las circunstancias del sujeto. Dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistema de prueba *in vitro* o de modelos animales.

Una composición farmacéutica puede administrarse conjuntamente con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para lograr cualquiera de los usos y efectos terapéuticos anteriormente descritos. Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender agonistas, antagonistas, activadores o inhibidores. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente o reactivo tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril que incluye, pero no se limita a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse a un paciente solas, o en combinación con otros agentes, fármacos, hormonas o modificadores de las

respuestas biológicas

Las composiciones farmacéuticas para su uso como se describen en este documento pueden administrarse por cualquier número de vías que incluyen, pero no se limitan a, medios orales, intravenosos, intramusculares, intraarteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, transdérmicos, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicos, sublinguales, vaginales o rectales.

Además de los principios activos, las composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables/fisiológicamente adecuados que comprenden auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Más detalles sobre las técnicas para la formulación y administración se proporcionan en Remington's Pharmaceutical Sciences, (Gennaro, ed.) 20ª ed., Mack Publishing, Easton, Pensilvania, (2000).

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden formularse en disoluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o solución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones para inyección acuitosa apropiadas. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, aceites de ácido graso sintéticos tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

Las composiciones farmacéuticas también descritas en este documento pueden prepararse de un modo que se conoce en la técnica, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de comprimidos recubiertos de azúcar, trituración, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Una composición farmacéutica puede proporcionarse como un sal y puede formarse con muchos ácidos que incluyen, pero no se limitan a, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico y similares. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que las formas libres de base correspondientes. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo liofilizado que puede contener cualquiera o todos de los siguientes: histidina 1-50 mM, 0,1%-2% de sacarosa y 2-7% de manitol, a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, combinados con un tampón antes de uso. Después de prepararse las composiciones farmacéuticas, pueden colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada. Para la administración de un modulador, tal etiquetado puede incluir orientación sobre la cantidad, frecuencia y procedimiento de administración.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso que también se han descrito en este documento incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin previsto. La determinación de una dosis o cantidad eficaz está dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente tanto en ensayos en cultivo celular, por ejemplo, usando células neoplásicas, como en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Tal información puede entonces usarse y extrapolarse para determinar dosis y vías útiles para la administración a seres humanos.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de principio activo (por ejemplo, un modulador de la presente invención) que mejora, reduce, disminuye o elimina los síntomas o afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis de efectos tóxicos con respecto a terapéuticos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las composiciones farmacéuticas que presentan grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se usan en la determinación de un intervalo de dosificaciones para uso humano. Una dosificación representativa contenida en una composición farmacéutica está dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

El médico, quien considerará los factores relacionados con un individuo que requiere tratamiento, determinará la dosificación exacta. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del componente activo, o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad del individuo; la salud general del paciente; la edad, peso y sexo del paciente; dieta; momento y frecuencia de administración; combinación (combinaciones) de fármacos; sensibilidades a reacciones; y tolerancia/respuesta a terapia. Como guía general, las composiciones farmacéuticas de acción prolongada pueden administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas, dependiendo de la semivida y la tasa de eliminación de la formulación particular. Variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas convencionales para la optimización, como es bien entendido en la materia.

5 Como guía, cantidades de dosificación normales pueden variar de 0,1 a 100.000 microgramos (μg), hasta una dosis total de aproximadamente 1 gramo (g), dependiendo de la vía de administración. La orientación para dosificaciones particulares y procedimientos de administración se proporciona en la bibliografía y generalmente está disponible para médicos en la materia. Aquellos expertos en la materia emplearán formulaciones diferentes para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores o activadores. Similarmente, la administración de polinucleótidos o polipéptidos será específica para células particulares, afecciones, localizaciones y similares.

10 En este documento también se describe un paquete farmacéutico o kit que comprende uno o más recipientes cargados con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Opcionalmente, un aviso puede asociarse a tal(es) recipiente(s) en la forma prescrita por un agencia gubernamental que regula la preparación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la preparación, uso o venta para administración humana. Un aviso tal también puede proporcionar orientación sobre cómo usar el paquete o kit.

VLC. Kits para aplicaciones de diagnóstico, terapia e investigación

15 En este documento también se describen diversos kits. Dependiendo de la configuración, los kits de la presente invención pueden emplearse en aplicaciones de diagnóstico, terapéuticas y de investigación.

20 Un kit puede comprender un receptor de quimiocina quimérica de la presente invención. El polipéptido puede suministrarse en un tampón estéril o puede expresarse en una línea celular, que por sí misma puede formar un componente de un kit. Un kit también puede comprender tampones, ligandos conocidos, reactivos para detectar señalización intracelular y otros componentes. Si un kit se adapta a una aplicación de diagnóstico, el kit también puede comprender material impreso que proporciona orientación en la realización de una determinación tal como la presencia, ausencia o probabilidad de adquirir una afección dada.

25 Por ejemplo, se sabe que la disfunción de uno o más GPCR (es decir, receptores de quimiocina) puede contribuir a enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson, diabetes, enanismo, daltonismo, retinosis pigmentosa o asma. Los GPCR (es decir, receptores de quimiocinas) también participan en depresión, esquizofrenia, insomnio, hipertensión, ansiedad, estrés, insuficiencia renal y en varios otros trastornos cardiovasculares, metabólicos, neurales, de oncología e inmunitarios (Horn & Vriend, (1998) J. Mol. Med. 7 6:464-468). También se ha demostrado que desempeñan una función en la infección por el VIH (Feng y col., (1996) Science 272:872-877). Por tanto, estas y otras afecciones pueden tratarse y/o diagnosticarse empleando un kit de la presente invención. Un kit también puede emplearse como una herramienta de investigación para estudiar la asociación de las afecciones enumeradas con un receptor de quimiocina y un kit también puede emplearse como una herramienta terapéutica y/o de diagnóstico adaptada para identificar y/o tratar una afección, tal como aquellas enumeradas.

Ejemplos

35 Se han incluido los siguientes ejemplos para ilustrar modos representativos de la presente invención. Ciertos aspectos de los siguientes ejemplos se describen en términos de técnicas y procedimientos encontrados o contemplados por los presentes inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Estos ejemplos se demuestran por el uso de prácticas de laboratorio convencionales de los inventores.

Ejemplo 1

Clonación de CCR3 natural de monocitos humanos

40 Las secuencias usadas para generar cebadores de PCR para clonar el receptor CCR3 endógeno de eosinófilos humanos se basaron en secuencias de ácidos nucleicos de Combadiere y col. (Combadiere y col., (1995) J. Biol. Chem. 270 (27) 16491-16494; nº de acceso U28694). Los cebadores de PCR se enumeraron más adelante; sin embargo, se usaron para clonar CCR3 de una biblioteca de ADNc de monocitos humanos y no de eosinófilos. El receptor CCR3 se clonó en mitades que se solapaban que luego se unieron por la reacción de ligación por solapamiento de PCR como se describe por Peiper y col. (Peiper y col., (1997) Method Enzymol. 288:56-70). Los cebadores usados fueron del siguiente modo:

5' CCR3 (sitio EcoRI en minúscula):

5' CGgaattcATGACAACCTCACTAGATACA 3' (SEC ID Nº: 7)

3' CCR3 intermedio:

5' GGACAATGGCCACCTACC 3' (SEC ID Nº: 8)

50 5' CCR3 intermedio:

5' GCATGTGTAAGCTCCTCTC 3' (SEC ID Nº: 9)

3' CCR3 (sitio XbaI en minúsculas):

5' GCtctagaCTAAACACAATAGAGAGTTCC (SEC ID N°: 10)

Los productos de PCR de 5' y 3' se purificaron y se unieron como se indica anteriormente para dar un marco de lectura abierto de CCR3 de longitud completa con sitios de restricción EcoRI y XbaI únicos en los extremos 5' y 3', respectivamente (ref: DMP 1953-177). El marco de lectura abierto de longitud completa de CCR3 humano natural obtenido de monocitos humanos se digirió con sitios de restricción EcoRI y XbaI y se clonó en el vector pcDNA3(His) (ref: DMP 1953-191). Posteriormente, un sitio HindIII (en minúscula) (aagcttATG) (SEC ID N°: 25) se añadió al codón de iniciación (ATG) de CCR3 y el marco de lectura abierto del inserto (HindIII-XbaI) se clonó en marco en el vector pFLAG CMV-1 obtenido de Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri) de manera que se añadió una secuencia señal de PreProTripsina al extremo 5' del marco de lectura abierto. La secuencia del marco de lectura abierto anotada completa dentro del vector pFLAG-CMV-1 se proporciona en las Figuras 2A y 2B. El MCS (sitio de clonación múltiple) del vector representa un área en la que las construcciones de ADNc pueden insertarse usando cualquier único o cualquier combinación de los sitios de restricción mostrados. En este ejemplo, el sitio de clonación de 5' fue HindIII y el sitio de clonación de 3' fue XbaI, como se indica en las Figuras 2A y 2B.

Ejemplo 2

15 Clonación de CCR2B natural de monocitos humanos

Las secuencias usadas para generar cebadores de PCR con el fin de clonar el receptor de la isoforma B de CCR2 humana (CCR2B) se basaron en la publicación de 1994 de Charo y col. (Charo y col., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91(7) 2752-2756, n° de acceso de GenBank U03905). La secuencia del cebador usado para amplificar CCR2B en su extremo 5' fue CGGggtaccATGCTGTCCACATCTCGTTCT (SEC ID N°: 11; un sitio de restricción KpnI introducido se indica por letras en minúscula). La secuencia del cebador usado para amplificar CCR2B en su extremo 3' fue CGGggtaccTCCTCGTTTTATAAAACCAGCC (SEC ID N°: 12; un sitio de restricción KpnI introducido se indica por letras en minúscula). Se amplificó ADNc de CCR2B de longitud completa de una biblioteca de ADNc de monocitos humanos. El producto de PCR resultante se digirió con KpnI y se clonó en el sitio KpnI localizado dentro del sitio de clonación múltiple (MCS) de pFLAG-CMV-1 (Figura 2A).

25 Ejemplo 3

Ensamblaje del clon de ADNc del receptor de CCR3/2 quimérico

Como se observa anteriormente, ADNc para los receptores de quimiocinas humanas CCR3 y CCR2B se clonaron a partir de una biblioteca de ADNc de monocitos. Los productos de PCR solapantes que consistían en el gen de CCR3 humano del extremo N hasta el séptimo dominio transmembrana y el gen de CCR2B humano del séptimo dominio transmembrana hasta el extremo C se cortaron y se empalmaron juntos como se describe más adelante.

Usando pFLAG-CMV1/CCR3 como molde, los siguientes cebadores se usaron para amplificar un ADNc de CCR3 parcial que engloba el codón de INICIACIÓN (en negrita) hasta el séptimo dominio transmembrana:

Cebador de 5':

CCCAaagctt**ATG**ACAACCTCACTAGATAC (sitio HindIII en minúsculas) (SEC ID N°: 13)

35 Cebador de 3':

GCaatattCCGGAACCTCTCTCCAAC (sitio SspI de extremos romos en minúsculas) (SEC ID N°: 14)

Usando pFLAG-CMV1/CCR2B como molde, los siguientes cebadores se usaron para amplificar un ADNc de CCR2B parcial que engloba el séptimo dominio transmembrana hasta el codón de TERMINACIÓN (secuencia inversa en negrita):

Cebador de 5':

GGGatattCTCGGTGTTCTTCCGAAAG (sitio EcoRV de extremos romos en minúsculas) (SEC ID N°: 15)

Cebador de 3':

45 CGgatccTCTAGATTATAAAC (sitio BamHI en minúsculas) (SEC ID N°: 16)

El producto de CCR3 parcial en 5' se digirió con HindIII y SspI y el producto de CCR2B parcial en 3' se digirió con EcoRV y BamHI y cada producto digerido se purificó posteriormente en gel. Estos productos parciales se ligaron en un vector pFLAG-CMV-3 (Figura 3A) que previamente se había digerido con BamHI y HindIII. Las dos regiones de extremos romos (EcoRV y SspI) van juntas y completan el ensamblaje de la molécula quimérica CCR3/2 intacta que contiene siete regiones transmembrana y una cola citoplásmica en el vector pFLAG-CMV-3.

50

Este receptor de quimiocina quimérica, que se clonó en el vector pFLAG-CMV3, se diferencia sustancialmente de las secuencias de tanto CCR3 como CCR2 humanos en tanto el nivel de ácidos nucleicos como de aminoácidos. Al nivel de aminoácidos, la localización del corte y empalme del extremo C entre CCR3 humano y CCR2 humano se produce de forma que los aminoácidos 1-310 de la secuencia de CCR3 de 355 aminoácidos son retenidos y se unen con los residuos 316-360 de la secuencia de aminoácidos de CCR2B, con un residuo de tirosina común a ambos y formando un sitio de unión. Por tanto, en la molécula quimérica, aproximadamente el 87% de la composición de aminoácidos de CCR3/2 se deriva de CCR3 y aproximadamente el 13% de la secuencia de aminoácidos se deriva de CCR2B. La longitud total de la molécula quimérica CCR3/2 descrita en este documento tiene 356 aminoácidos que se diferencian tanto de los 355 aminoácidos encontrados en CCR3 como de los 360 aminoácidos encontrados en la isoforma B de CCR2.

Al nivel de ácidos nucleicos, la localización del corte y empalme del extremo C entre CCR3 humano y CCR2 humano se produce de forma que se retienen los nucleótidos 1-929 (la posición del nucleótido 930 es sintética, no produciéndose ni en CCR2 ni en CCR3) del marco de lectura abierto de 1065 nucleótidos (ORF) de CCR3. Por tanto, en la molécula quimérica, aproximadamente el 87% de la secuencia de nucleótidos se deriva de CCR3 y aproximadamente el 13% de la secuencia de nucleótidos se deriva de CCR2B. Los nucleótidos 931-1068 (aproximadamente el 13%) del marco de lectura abierto de la molécula quimérica se derivan de CCR2B. La Figura 3B representa un alineamiento de CCR2B, CCR3 y la proteína quimérica CCR2B/CCR3. En la figura, las líneas negras indican identidad, mientras que las líneas grises indican similitud. Los términos "similitud" e "identidad" se definen en este documento.

Ejemplo 4

Preparación y expansión de células que expresan CCR3/2 quimérico

Se cultivaron células de ovario de hámster chino (CHO-K1, Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Virginia) en medio F10 Ham (Life Technologies, Grand Island, Nueva York) complementado con 10% de SBF (HyClone, Logan, Utah), glutamina 2 mM y penicilina G/estreptomocina (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). Las transfecciones se realizaron usando el reactivo LIPOFECTAMINE™ (Life Technologies, Grand Island, Nueva York). Se sembraron CHO-K1 (también denominadas en este documento simplemente "células CHO") sobre placas de cultivo de tejido de 100 mm 24 horas antes de la transfección. Entonces, las células se lavaron con medio de suero reducido con OPTI-MEM™ (Life Technologies, Grand Island, Nueva York), se incubaron con mezcla de transfección (10 µg de ADN de vector pCMV3-FLAG-CCR3/2 y 50 µl del reactivo LIPOFECTAMINE™) durante 6 horas a 37°C en una estufa de incubación con CO₂, y se lavaron una vez con PBS antes de sustituirse con medio de crecimiento F10 Ham. Las células se lavaron 24 horas después de la transfección antes de añadirse medio fresco. Después de 24 horas adicionales se añadió G418 (Life Technologies, Grand Island, Nueva York) a una concentración final de 600 µg/ml. Después de 13 días en cultivo, las colonias que sobrevivieron a la selección (es decir, habían retenido la construcción de transfección) se recogieron para la expansión y evaluación de sus niveles de expresión de CCR3/2. Las colonias se transfirieron inicialmente a pocillos individuales de una placa de 96 pocillos y luego se transfirieron a pocillos duplicados de una placa de 24 pocillos cuando fueron confluentes. A partir de placas de 24 pocillos confluentes, las células se expandieron directamente sobre placas de 60 mm y posteriormente de 100 mm. Los pocillos duplicados de cada clon se congelaron de nuevo antes de la expansión y la prueba para la expresión del receptor quimérico. No se espera que las células CHO expresen ningún CCR3, por tanto, cualquier CCR3 detectado sería en realidad del receptor quimérico CCR3/2 que se transfectó en las células.

Ejemplo 5

Análisis de la expresión en la superficie celular de CCR3/2

La experiencia previa ha demostrado que sólo las células que demuestran altos niveles de expresión de receptores de quimiocinas actúan adecuadamente en ensayos de unión a ligando. El cribado para altos niveles de expresión por análisis de FACS ha demostrado una forma fidedigna para evaluar niveles de expresión de moléculas de la superficie celular de interés en células transfectadas. Después de la expansión, cada uno de los 24 cultivos transfectados se lavó con PBS libre de Ca²⁺ y de Mg²⁺ y se sacó de las placas por incubación en PBS libre de Ca²⁺ y de Mg²⁺ que contenía EDTA 2 mM. Las células sacadas se resuspendieron a 5 x 10⁶ células/ml en PBS libre de Ca²⁺ y de Mg²⁺ y se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal de rata marcado con ficoeritrina (PE) dirigido contra CCR3 humano (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, nº de cat. FAB155P) o contra un control de anticuerpo IgG de rata marcado con PE del mismo isotipo (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, nº de cat. IC005P) como control para la tinción de referencia no específica. Se usó un FACScan de Becton-Dickinson para cribar células que se expresan altamente comparando los niveles de fluorescencia de células marcadas de control (las líneas células de prueba de CHO/CCR3/2 se incubaron con un anticuerpo de control de isotipo marcado con ficoeritrina (PE) no específico como prueba de adhesión no específica) y comparando estos resultados con la cantidad de tinción fluorescente detectada cuando un anticuerpo anti-CCR3 humano marcado con PE específico se usó para marcar las mismas células de prueba (Figura 4, panel superior). También se compararon los datos obtenidos para un clon de CHO que expresa CCR3 humano recombinante teñido con anti-CCR3 humano marcado con PE (Figura 4, panel inferior).

De las 24 líneas celulares transfectadas originales, dos (clones 5 y 12) mostraron altos niveles de expresión de CCR3/2 y éstos se subclonaron posteriormente y se volvieron a cribar por el mismo procedimiento. Los resultados presentados en la Figura 4 demuestran detección significativa de CCR3/2 por un anticuerpo monoclonal anti-CCR3 humano marcado con PE para marcar receptor en células CHO recombinantes. Los subclones 5.5 y 5.12 mostraron coherentemente altos niveles de expresión y se tomó la decisión de expandir y congelar de nuevo ambas líneas celulares, a la vez que se basaba en la línea 5.5 para los cribados de unión a ligando continuos. El subclon 5.5 se ha sometido a más de 30 pases sin pérdida aparente en los niveles de expresión de CCR3/2.

Ejemplo 6

Prueba de la capacidad de células que expresan CCR3 o CCR3/2 para unirse a eotaxina

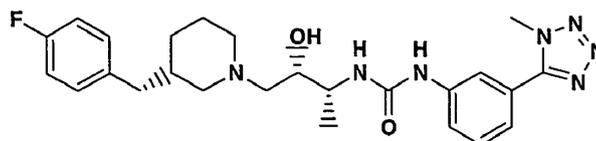
El CCR3 se encuentra normalmente en eosinófilos y otras células y se ha demostrado que se une específicamente a eotaxina (Ponath y col., (1996) J. Clin. Invest. 97:604). Se realizó un ensayo de unión con el fin de comparar la capacidad de células que expresan moléculas de CCR3/2 humanas quiméricas con la de células que expresan CCR3 humano endógeno para la unión a eotaxina. Dependiendo de las cuestiones que se preguntan, las células en cuestión fueron tanto eosinófilos humanos como de ratón, células CHO-K1 que expresan CCR3 o CCR3/2 recombinante, células CHO-K1 parentales u otro tipo de células. Todas las etapas de ensayo se realizaron a temperatura ambiente. Se incubaron placas de ensayo Multiscreen (n° MABVN1250, Millipore Inc., Marlborough, Massachusetts) con 100 µl/pocillo de disolución de bloqueo (7,5 µg/ml de protamina en PBS) para bloquear la unión no específica. Después de 20 minutos, la disolución de bloqueo se eliminó y se sustituyó con 100 µl de tampón de unión (RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, Nueva York) que contenía 0,1% de albúmina de suero bovino y tampón HEPES 20 mM) y se incubó durante al menos 10 minutos adicionales.

Cuando se estuvo preparado listo para usar placa(s), se empleó el siguiente procedimiento. Eliminar el tampón de unión y añadir lo siguiente a los tipos de pocillos indicados:

- A pocillos de unión TOTAL añadir 50 µl de tampón de unión;
- A pocillos de unión NO ESPECÍFICA añadir 50 µl de eotaxina humana sin marcar a concentración final de 100 nM y 1 000 nM (eotaxina humana recombinante – n° 320-EO/CF, R & D Systems, Minneapolis, Minnesota) en 50 µl de tampón de unión;
- A pocillos de PRUEBA añadir 50 µl de compuesto diluido en tampón de unión (concentración final <0,5% de DMSO);
- A los pocillos de control de la PLACA añadir 100 µl de tampón de unión;
- A TODOS los pocillos, excepto a los pocillos de la PLACA, añadir 50 µl de células a una concentración de $3,0 \times 10^5$ células/pocillo; y
- A TODOS los pocillos añadir 50 µl de eotaxina humana marcada con ^{125}I a concentración final de 0,15 nM (eotaxina marcada con ^{125}I , n° NEX-314 Perkin Elmer Life Sciences Inc.).

Golpear la placa para mezclar e incubar a TA durante 30 a 60 minutos. Colocar la placa en un colector vacío, aplicar vacío y lavar la placa tres veces con 200 µl de tampón de lavado (2,4% de NaCl en tampón de unión) para cada lavado. Eliminar el faldón de plástico de la placa y dejar que la placa se seque al aire. Perforar los pocillos y contar las emisiones gamma para cada perforación.

Los datos de unión se analizaron usando Microsoft EXCEL y luego se representaron gráficamente usando GRAPHPAD PRISM™. Los datos indican altos niveles de unión específica a eotaxina en células CHO que expresan CCR3/2 humano (Figura 1) y además que las curvas de inhibición de fármaco generadas por la competición de la eotaxina marcada (caliente) con el Compuesto 1 (N-((1R,2S)-3-[(3S)-3-(4-fluorobencil)-1-piperidinil]-2-hidroxi-1-metilpropil)-N'-[3-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)fenil]urea; véase la solicitud de patente de EE.UU. n° 60/410.198) son comparables, independientemente de si se usan eosinófilos humanos nativos o el clon 5.5 de CCR3/2 de CHO (Figuras 5A y 5B). El Compuesto 1 tiene la estructura



Estos datos indican que el clon de CCR3/2 de CHO puede ser un sustituto adecuado para eosinófilos humanos en la búsqueda de compuestos que pueden inhibir la unión de eotaxina a CCR3.

Ejemplo 7

Ensayos de señalización

Se ha demostrado que una quimera CCR3/2 puede unirse a eotaxina de un modo muy similar al presentado por el receptor intacto natural en eosinófilos. En la Figura 6 se ilustra una ruta de transducción de señales genérica. Sólo

para fines ilustrativos, en el presente ejemplo, el agente de señalización se considera que es eotaxina y el receptor es tanto CCR3 como CCR3/2. Otros receptores de quimiocinas quiméricas forman elementos de la presente invención y la enumeración del par de eotaxina/CCR3/2 en el presente ejemplo es sólo para fines de ilustración. Pares de quimiocina/receptor adicionales serán conocidos para aquellos expertos en la materia tras la consideración de la presente divulgación.

Parte de la cascada de señalización en la dirección 3' implica la actividad de cinasas (proteínas que añaden grupos fosfato a residuos específicos en proteínas celulares, haciendo así que emprendan nuevas actividades y funciones celulares). En el presente ejemplo, la fosforilación de Erk (un miembro de una cascada de señalización de proteínas cinasas) se considera que es una indicación de que la unión de eotaxina en la superficie celular es reconocida por la maquinaria de reconocimiento de la señalización celular que se encuentra dentro del citoplasma y el núcleo. Por tanto, sería útil demostrar que no sólo la eotaxina se une a CCR3/2, sino que puede transmitir una señal generada en respuesta al acontecimiento de unión al interior de la célula.

Por tanto, la presente invención proporciona además que cuando un receptor de quimiocina quimérica (por ejemplo, el receptor CCR3/2 quimérico) se expresa en células puede señalizar en la dirección 3' cuando se une a su ligando relacionado (por ejemplo, eotaxina). Una señalización tal en la dirección 3' implica la ruta de la MAP cinasa, más específicamente la fosforilación de Erk1 y Erk2 posterior a la unión de eotaxina por tanto CCR3 como CCR3/2.

El análisis de la estimulación de células para el análisis de fosfo-ERK por transferencia Western se hizo como se describe previamente (Scherle y col., (1998) J. Immunol. 161(10):5681-86), con la excepción de que las células se estimularon específicamente por exposición a eotaxina (exposiciones nanomolares a eotaxina enumeradas en las partes inferiores de las Figuras 7A y 7B) en lugar del lipopolisacárido estimulante más genérico como se describe en Sherle y col. (Scherle y col., (1998) J. Immunol. 161(10):5681-86).

El resultado global de estos estudios indica que el receptor CCR3/2 quimérico no sólo se une a eotaxina con alta afinidad (como en eosinófilos humanos nativos), sino que puede transmitir una señal (en este caso fosforilación de Erk) al interior de la célula en un modo similar al que se observa para el receptor natural en eosinófilos humanos. Tales células de receptor quimérico podrían sustituir células que expresan receptor natural en estudios de unión a ligando y fármaco diseñados para tratar muchos asuntos fisiológicos y biológicos que rodean el desarrollo del inhibidor de fármaco receptor específico.

Ejemplo 8

Ensamblaje de un clon de ADNc de receptor CCR2/3 quimérico

Como se observa anteriormente, los ADNc para receptores de quimiocinas humanas CCR2B y CCR3 se clonaron a partir de una biblioteca de ADNc de monocitos. Los productos de PCR solapantes que consistían en el gen de CCR2B humano del extremo N hasta el séptimo dominio transmembrana y el gen de CCR3 humano del séptimo dominio transmembrana hasta el extremo C se cortaron y se empalmaron juntos como se describe más adelante.

Usando pFLAG-CMV1/CCR2B como molde, los siguientes cebadores se usaron para amplificar un ADNc de CCR2B parcial que engloba el codón de INICIACIÓN (en negrita) hasta el séptimo dominio transmembrana:

Cebador de 5':

CCCaagctt**ATG**CTGTCCACATCTCG (sitio HindIII en minúsculas) (SEC ID N°: 17)

Cebador de 3':

CCgatatcTTCTGAACTTCTCCCAACG (sitio EcoRV en minúsculas) (SEC ID N°: 18)

Usando pFLAG-CMV1/CCR3 como molde, los siguientes cebadores se usaron para amplificar un ADNc de CCR3 parcial que engloba el séptimo dominio transmembrana hasta el codón de TERMINACIÓN (secuencia inversa en negrita):

Cebador de 5':

CGaatattTGCGCCACTTCTCCACAGG (sitio SspI en minúsculas) (SEC ID N°: 19)

Cebador de 3':

CGgatccTCTAGACTAAAACAC (sitio BamHI en minúsculas) (SEC ID N°: 20)

El producto de CCR2B parcial en 5' se digirió con HindIII y EcoRV y el producto de CCR3 parcial en 3' se digirió con SspI y BamHI. Cada producto se purificó posteriormente en gel. Los productos de ADNc parciales se ligaron en un vector pFLAG-CMV-3 (Figura 2A).

Las dos regiones de extremos romos (EcoRV y SspI) van juntas para volver a crear el codón existente para tirosina

(Y) en la unión indicada, como se representa en las Figuras 8A y 8B. Esto completó el ensamblaje de la molécula quimérica CCR2/3 intacta que contiene 7 regiones transmembrana y una cola citoplásmica en el vector pFLAG-CMV-3.

5 Este receptor de quimiocina quimérica se diferencia de las secuencias de tanto CCR2B como CCR3 humanos en el nivel de ácidos nucleicos como se indica a continuación y en la Figura 8A. En el caso de la comparación de nucleótidos, el cambio de CCR2 a CCR3 se produce en el nucleótido 943 de los 1083, que significa que aproximadamente el 87% de la molécula se deriva de la isoforma B de CCR2.

10 Con respecto a la secuencia de aminoácidos, los residuos 1-314 de CCR2B comprenden el extremo N, produciéndose el sitio de unión en el aminoácido 315 de la secuencia de aminoácidos CCR2B de 360 residuos. Un residuo de tirosina, que es común a CCR2B y CCR3, es el sitio de unión. Por tanto, aproximadamente el 87,5% de la proteína quimérica CCR2/3 se deriva del polipéptido de la isoforma B de CCR2.

15 El número de nucleótido 942 es sintético, no produciéndose ni en CCR2B ni en CCR3. Este nucleótido se cambió para acomodar el uso de un EcoRV en el extremo 3' del producto de ADNc parcial del extremo N y se hizo así sin cambiar la secuencia de proteínas implicada (es decir, **AGG**, secuencia endógena y **AGA**, secuencia sintética en negrita, ambas codifican el aminoácido arginina, R).

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de quimiocina quimérica aislada que comprende:

- 5 (a) un primer segmento de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que se extiende desde el primer residuo del extremo N de un primer receptor de quimiocina hasta al menos el último residuo de la séptima hélice transmembrana del primer receptor de quimiocina; y
(b) un segundo segmento de polipéptido unido a la primera secuencia de polipéptido, comprendiendo la segunda secuencia de polipéptido una secuencia de aminoácidos contigua que comprende toda o una parte del extremo C de un segundo receptor de quimiocina,

en el que el receptor de quimiocina quimérica comprende la secuencia de aminoácidos definida en SEC ID N°: 24.

10 2. Un polinucleótido aislado que codifica el receptor de quimiocina quimérica de la reivindicación 1.

3. El polinucleótido de la reivindicación 2, en el que la secuencia de polinucleótido se define en SEC ID N°: 23.

4. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2 ó 3.

5. Un polinucleótido aislado que es complementario al polinucleótido de longitud completa de la reivindicación 2 ó 3.

6. Un vector de ADN que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2 ó 3.

15 7. Un procedimiento para producir un receptor de quimiocina quimérica que comprende:

- (a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 en un medio nutritivo adecuado para producir el receptor de quimiocina quimérica; y
(b) aislar el receptor de quimiocina quimérica de la célula o medio.

FIG. 1

Saturada caliente sobre células CHO de hCCR3/2
Clon 5.5

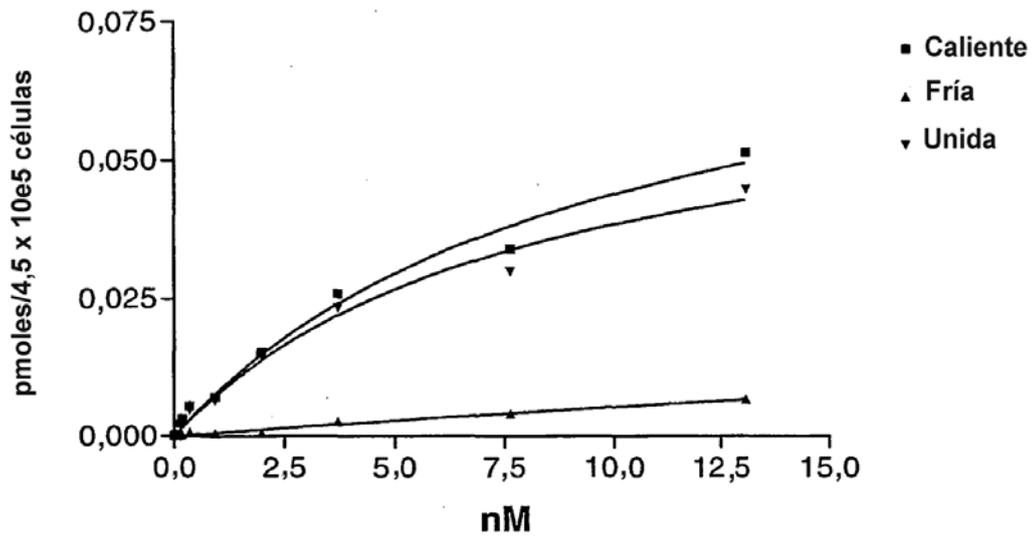


FIG. 2A

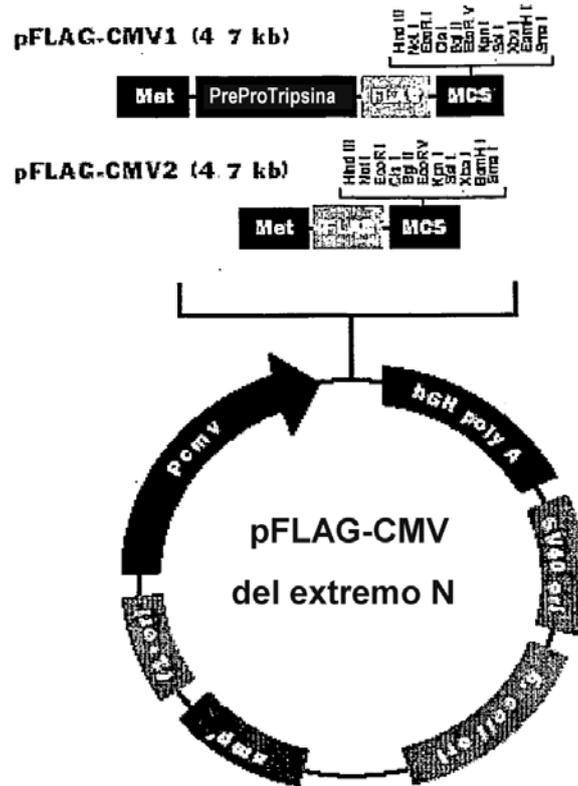


FIG. 2B

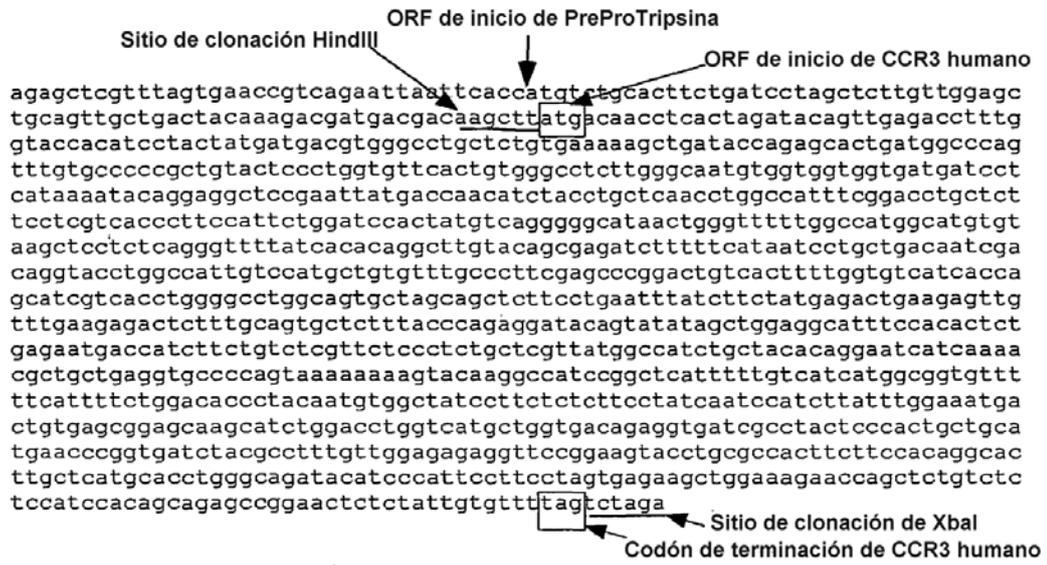


FIG. 3A

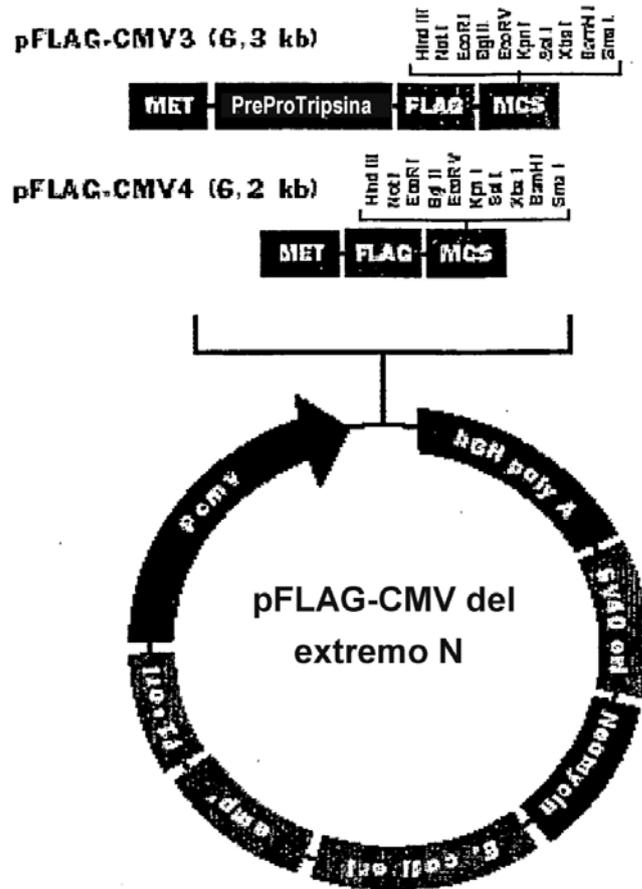


FIG. 4

FACScan del subclón 5.5 que expresa CCR3/2 de CHO, 22/02/02

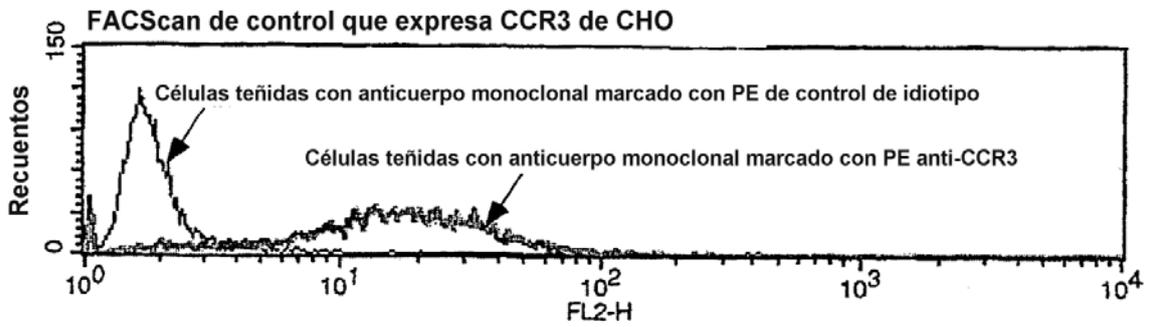
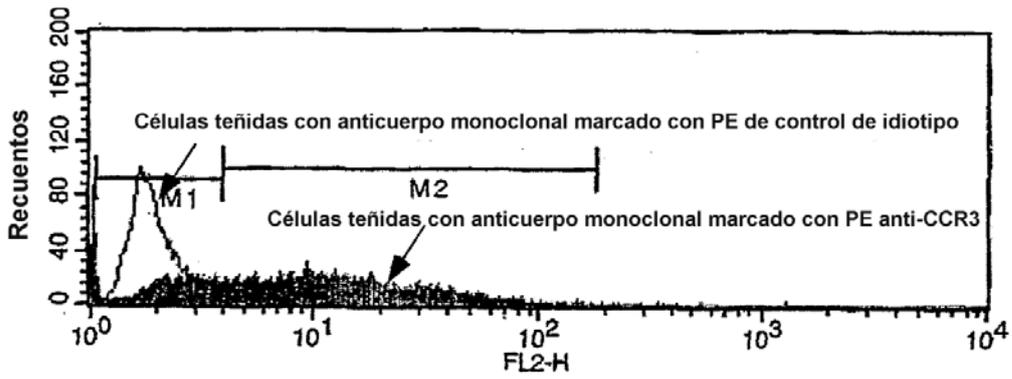


FIG. 5A

**AF0640: Unión de CCR3 sobre eosinófilos humanos
(Curva acumulada, n=2)**

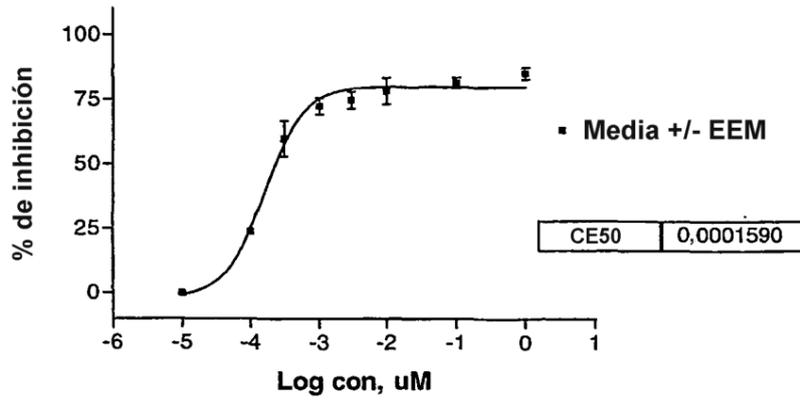


FIG. 5B

**AF0640: Unión de CCR3 sobre células 5.5 de CHO/CCR3-2
(Curva acumulada, n=8)**

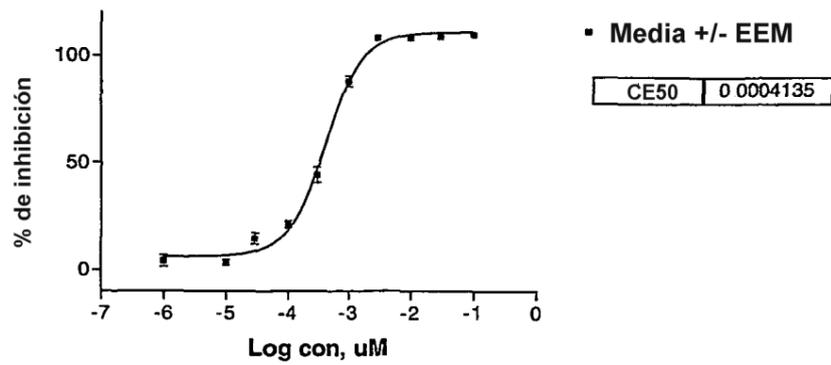


FIG. 6

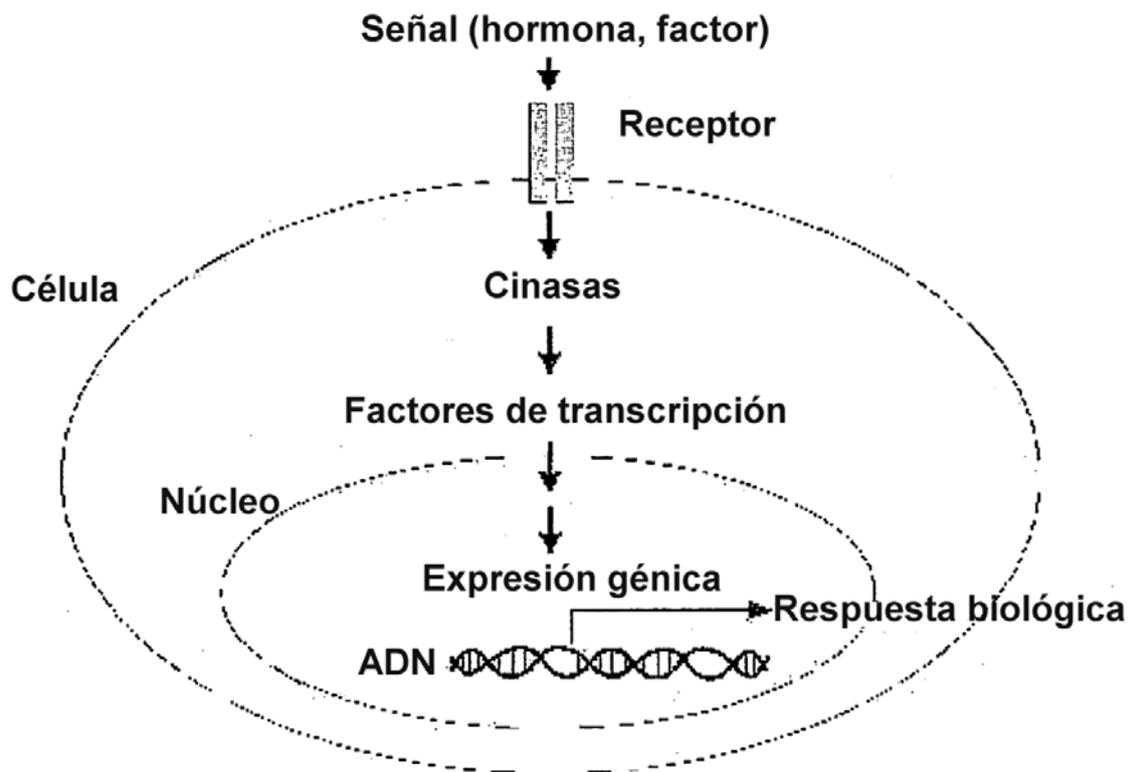
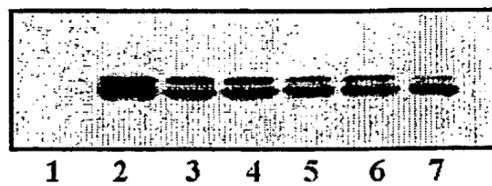


FIG. 7A

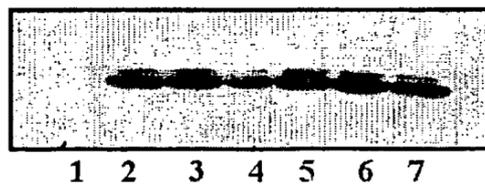
Valoración de eotaxina sobre eosinófilos humano



Carril 1-7: eotaxina (nm): 0, 3, 30, 30, 100, 300 y 1000

FIG. 7B

Valoración de eotaxina sobre CHO/CCR3-2hu



Carril 1-7: eotaxina (nm): 0, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000

FIG. 8A

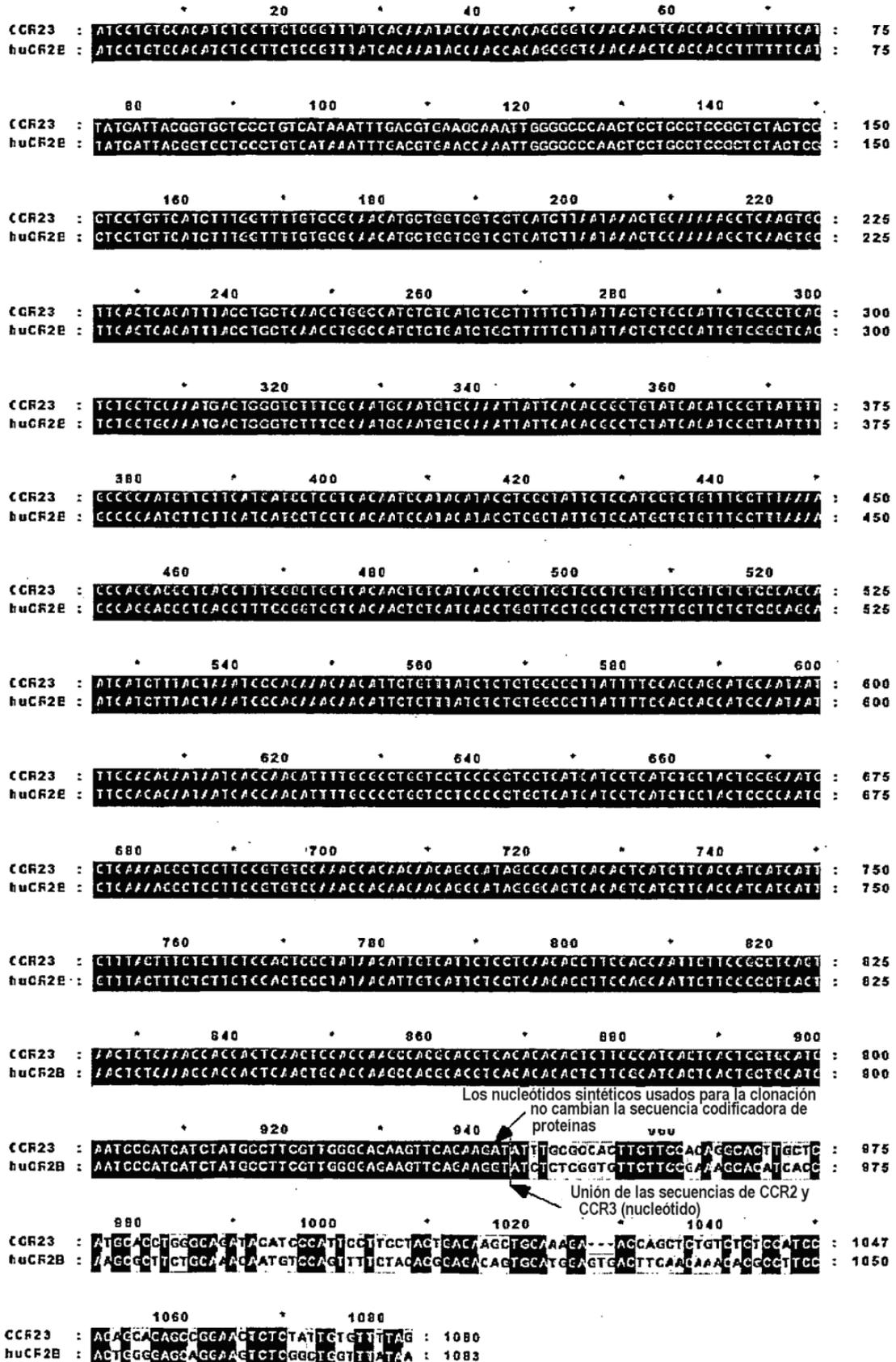


FIG. 8B

```

*      *      *      *      *      *      *      *
CCH23 : H-BSSSEFLRNTHESGQEVITPPDYCYGAFCHYPIVRQIGACILFPLYSLVPIVGIYVGSMLAVSLIIRCKKLLKLT : 78
hUCH2B : H-BSSSEFLRNTHESGQEVITPPDYCYGAFCHYPIVRQIGACILFPLYSLVPIVGIYVGSMLAVSLIIRCKKLLKLT : 78

*      *      *      *      *      *      *      *
CCH23 : INLENIATISDLLPLITLPIVANEFAANEVYVGGDZPCCKLPTGLSHHIGYPGQIPFZLITITRYLAIVEFVIALKARIYVF : 156
hUCH2B : INLENIATISDLLPLITLPIVANEFAANEVYVGGDZPCCKLPTGLSHHIGYPGQIPFZLITITRYLAIVEFVIALKARIYVF : 156

*      *      *      *      *      *      *      *
CCH23 : GAVTEGVITAVVPAASVFGIIPTRCKQKEDDEVVCGPYPFRCHNRPHTIHRHIEGLVILLIPIVICYSUILLKTLDRCKK : 234
hUCH2B : GAVTEGVITAVVPAASVFGIIPTRCKQKEDDEVVCGPYPFRCHNRPHTIHRHIEGLVILLIPIVICYSUILLKTLDRCKK : 234

*      *      *      *      *      *      *      *
CCH23 : RKRKHIFVRRVLPINLVVFLPNTFYNIVELLNTFOBFPLSHCEGTSQLEDCATVETIGMT-HCCFHPILYVFGEX : 312
hUCH2B : RKRKHIFVRRVLPINLVVFLPNTFYNIVELLNTFOBFPLSHCEGTSQLEDCATVETIGMT-HCCFHPILYVFGEX : 312

*      *      *      *      *      *      *      *
CCH23 : RRYLRHPPERRH-LMMMLGRVIFLLESGKLLER-TSSVBBB-ASPBELSYV* : 359
hUCH2B : RRYLSVPPERH-LKRFCKCCPVFRRZIVDGVTSITIPSTIGQBEVAGL~ : 360

```

Las secuencias se fusionan en el medio del residuo Y,
aa 315 de 359