(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 399 403**

(51) Int. CI.:

G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2004 E 04795907 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1692102**

(54) Título: **Composiciones y métodos para detectar y tratar enfermedades y estados patológicos relacionados con los receptores de quimiocinas**

(30) Prioridad:

30.10.2003 US 698541
04.08.2004 US 912638

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2013

(73) Titular/es:

CHEMOCENTRYX, INC. (100.0%)
1539 INDUSTRIAL ROAD
SAN CARLOS, CA 94070, US

(72) Inventor/es:

BURNS, JENNIFER, M.;
SUMMERS, BRETTON;
HOWARD, MAUREEN, C.;
SCHALL, THOMAS, J. y
MIAO, ZHENHUA

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para detectar y tratar enfermedades y estados patológicos relacionados con los receptores de quimiocinas.

Antecedentes de la invención

Las quimiocinas constituyen una familia de pequeñas citocinas que son producidas en la inflamación y regulan el reclutamiento, activación y proliferación de leucocitos (Baggiolini, M. et al., Adv. Immunol. 55: 97-179 (1994); Springer, T. A., Annu. Rev. Physiol. 57: 827-872 (1995); y Schall, T. J. y K. B. Bacon, Curr. Opin. Immunol. 6: 865-873 (1994)). Las quimiocinas son capaces de inducir selectivamente quimiotaxia de los elementos formados de la sangre (distintos de los glóbulos rojos), incluyendo leucocitos tales como neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, y linfocitos, incluyendo células T y células B. Además de estimular la quimiotaxia, se pueden inducir selectivamente otros cambios mediante quimiocinas en células sensibles, incluyendo cambios en la forma de las células, elevaciones transitorias en la concentración de iones calcio (Ca^{2+}) libres intracelulares, exocitosis de gránulos, aumento de integrinas, formación de lípidos bioactivos (por ejemplo, leucotrienos) y estallido respiratorio, asociado con la activación de leucocitos. De este modo, las quimiocinas son desencadenantes tempranos de la respuesta inflamatoria, provocando liberación de mediadores inflamatorios, quimiotaxia y extravasación a sitios de infección o inflamación.

Se distinguen dos subfamilias de quimiocinas, denominadas quimiocinas CXC y CC, por la disposición de los primeros dos de cuatro restos de cisteína conservados, que están separados por un aminoácido (como en las quimiocinas CXC SDF-1, IL-8, IP-10, MIG, PF4, ENA-78, GCP-2, GROα, GROβ, GROγ, NAP-2, NAP-4, I-TAC) o son restos adyacentes (como en las quimiocinas CC MIP-1α, MIP-1β, RANTES, MCP-1, MCP-2, MCP-3, I-309). La mayoría de las quimiocinas CXC atraen leucocitos neutrófilos. Por ejemplo, las quimiocinas CXC interleucina 8 (IL-8), el factor plaquetario 4 (PF4), y el péptido 2 activador de neutrófilos (NAP-2) son potentes quimioatrayentes y activadores de neutrófilos. Las quimiocinas CXC designadas MIG (monocina inducida por gamma interferón) e IP10 (proteína de 10 kDa inducida por interferón-γ) son particularmente activas induciendo quimiotaxia de linfocitos de sangre periférica activados. Las quimiocinas CC son generalmente menos selectivas y pueden atraer a una variedad de tipos celulares de leucocitos, incluyendo monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos T y células asesinas naturales. Las quimiocinas CC, tales como proteínas 1-3 quimiotácticas de monocitos humanos (MCP-1, MCP-2 y MCP-3), RANTES (quimiocina expresada y segregada por células T normales y regulada por activación), y las proteínas inflamatorias 1α y 1β de macrófagos (MIP-1α y MIP-1β), se han caracterizado como quimioatrayentes y activadoras de monocitos o linfocitos, pero no parecen ser quimioatrayentes para neutrófilos.

Las quimiocinas CC y CXC actúan a través de receptores que pertenecen a una superfamilia de siete receptores acoplados a proteínas G que comprenden la transmembrana (Murphy, P. M., Pharmacol Rev. 52:145-176 (2000)). Esta familia de receptores acoplados a proteínas G comprende un gran grupo de proteínas de membrana integrales, que contienen siete regiones que comprenden la transmembrana. Los receptores están acoplados a proteínas G, que son proteínas reguladoras heterotrímeras capaces de unirse a GTP y mediar la transducción de señales a partir de receptores acoplados, por ejemplo mediante la producción de mediadores intracelulares.

Hablando de forma general, las interacciones de quimiocinas y receptores de quimiocinas tienden a ser promiscuas por cuanto una quimiocina se puede unir a muchos receptores de quimiocinas, y a la inversa, un único receptor de quimiocinas puede interaccionar con varias quimiocinas. Existen pocas excepciones a esta regla; una de tales excepciones ha sido la interacción entre SDF-1 y CXCR4 (Bleul et al., J Exp Med, 184(3): 1101-9 (1996); Oberlin et al., Nature, 382(6594): 833-5 (1996)). Originalmente identificada como un factor estimulante del crecimiento de células pre-B (Nagasawa et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91(6): 2305-9 (1994)), SDF-1 ha sido el único ligando humano dado a conocer para CXCR4. El gen de SDF-1 codifica dos proteínas, denominadas SDF-1α y SDF-1β, mediante ayuste alternativo. Estas dos proteína son idénticas excepto por los cuatro restos de aminoácidos que están presentes en el término carboxi de SDF-1β y ausentes en SDF-1α.

Existen muchos aspectos de la señalización y selectividad de receptores de quimiocinas por ligandos que no se comprendieron previamente. Por ejemplo, existe un número de receptores huérfanos para los que no se ha determinado previamente ninguna función. RDC1, por ejemplo, aunque se pensó previamente que era un receptor para el péptido intestinal vasoactivo (VIP), es considerado actualmente como un receptor huérfano debido a que no se ha identificado su ligando endógeno. *Véase, por ejemplo*, Cook et al., FEBS Letts. 300 (2):149-152 (1992).

La presente invención se refiere a estos y a otros problemas.

Breve sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para identificar un agente que se une a CCX-CKR2 en una célula. En algunas formas de realización, el método comprende poner en contacto una pluralidad de agentes con un polipéptido de CCX-CKR2 que comprende un dominio extracelular al menos 95% idéntico a un dominio extracelular

de SEC ID nº:2, o un fragmento de unión a SDF1 o I-TAC del mismo; y seleccionar un agente que compite con I-TAC o SDF1 por la unión al polipéptido de CCX-CKR2 o su fragmento, identificando de ese modo un agente que se une a CCX-CKR2 en una célula.

En algunas realizaciones, la célula es una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el método comprende además ensayar el agente seleccionado en busca de la capacidad para unirse a, o inhibir el crecimiento de, una célula. En algunas realizaciones, la célula es una célula cancerosa.

En algunas realizaciones, el método comprende además ensayar el agente seleccionado en busca de la capacidad para cambiar la adhesión celular a células endoteliales.

En algunas realizaciones, el agente es menor que 1.500 daltons. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente es un polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de CCX-CKR2 comprende la secuencia presentada en SEC ID nº:2.

La presente invención también proporciona métodos para determinar la presencia o ausencia de una célula cancerosa. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una muestra que comprende una célula con un agente que se une específicamente con SEC ID nº:2: y detectar la unión del agente a un polipéptido en la muestra, en el que la unión del agente a la muestra indica la presencia de una célula cancerosa.

En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente tiene menos de 1500 daltons. En algunas realizaciones, el agente es un polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido detectado es SEC ID nº:2. En algunas realizaciones, la muestra procede de un ser humano. En algunas realizaciones, el método se usa para diagnosticar cáncer en un ser humano. En algunas realizaciones, el método se usa para proporcionar un pronóstico de cáncer en un ser humano. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, linfoma, glioblastomas, cáncer de próstata, y leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer no es sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica o linfoma de efusión primaria asociado a SIDA. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite con SDF1 e I-TAC por la unión a SEC ID nº:2.

La presente invención también proporciona métodos para proporcionar un diagnóstico o pronóstico de un individuo que tiene cáncer. En algunas realizaciones, los métodos comprenden detectar la presencia o ausencia de expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de CCX-CKR2 en una célula de un individuo, en el que el polipéptido de CCX-CKR2 se une a I-TAC y/o SDF1, y el polipéptido de CCX-CKR2 es al menos 95% idéntico a SEC ID nº:2, diagnosticando de ese modo un cáncer en el individuo.

En algunas realizaciones, el polipéptido de CCX-CKR2 se presenta en SEC ID nº:2. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, linfoma, glioblastomas, cáncer de próstata, y leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer no es sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica o linfoma de efusión primaria asociado a SIDA.

La presente invención también proporciona anticuerpos que compiten específicamente con SDF1 e I-TAC por la unión a SEC ID nº:2. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

La presente invención también proporciona métodos que comprenden poner en contacto una célula con un agente que se une específicamente a SEC ID nº:2, en el que el agente compite con SDF1 e I-TAC por la unión a un polipéptido de CCX-CKR2, y en el que la célula expresa un polipéptido de CCX-CKR2 que comprende un dominio extracelular al menos 95% idéntico a un dominio extracelular de SEC ID nº:2, uniendo de ese modo el agente al polipéptido de CCX-CKR2 en la célula.

En algunas realizaciones, el agente es menor que 1.500 daltons. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente es un polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de CCX-CKR2 es como se presenta en SEC ID nº:2. En algunas realizaciones, el agente se identifica mediante un método que comprende poner en contacto una pluralidad de agentes con un polipéptido de CCX-CKR2 que comprende un dominio extracelular al menos 95% idéntico a un dominio extracelular de SEC ID nº:2, o un fragmento de unión a SDF1 o I-TAC del mismo; y seleccionar un agente que compite con I-TAC o SDF-1 por la unión al polipéptido de CCX-CKR2 o su fragmento, identificando de ese modo un agente que se une a una célula cancerosa.

Se describen en la presente memoria métodos para tratar cáncer en un individuo. En algunos casos, los métodos comprenden administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que inhibe la expresión de un polinucleótido de CCX-CKR2. En algunas realizaciones, el polinucleótido de CCX-CKR2 codifica SEC ID nº:2. En algunas realizaciones, el polinucleótido de CCX-CKR2 comprende SEC ID nº:1. En algunas realizaciones, el polinucleótido administrado inhibe la expresión vía un siRNA.

Se describen en la presente memoria métodos para tratar cáncer en un individuo. En algunos casos, los métodos comprenden administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que compite con SDF1 e I-TAC por la unión a SEC ID nº:2. En algunas realizaciones, el agente tiene menos de 1.500 daltons. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente es un polipéptido. En algunas realizaciones, el agente se identifica mediante un método que comprende poner en contacto una pluralidad de agentes con un polipéptido de CCX-CKR2 que comprende un dominio extracelular al menos 95% idéntico a un dominio extracelular de SEC ID nº:2, o un fragmento de unión a SDF1 o I-TAC del mismo; y seleccionar un agente que compite con I-TAC o SDF-1 por la unión al polipéptido de CCX-CKR2 o su fragmento, identificando de ese modo un agente que se une a una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, linfoma, glioblastomas, cáncer de próstata, y leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer no es sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica o linfoma de efusión primaria asociado a SIDA.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-I ilustran datos de unión que demuestran una “huella” de unión de desplazamiento de SDF-1 distinta en diferentes tipos celulares. Perfil de competición de unión usando ^{125}I SDF-1α como la sonda de radioligando en (a) CEM-NKr (Figuras 1A-C) y (b) MCF-7 (Figuras 1D-F), así como ^{125}II-TAC (Figuras 1G-I) usado como la sonda de radioligando en (c) MCF-7, en un experimento de unión con un conjunto amplio de >90 quimiocinas y variantes de quimiocinas virales, humanas y murinas como competidores fríos. El porcentaje de inhibición de la unión del radioligando se muestra como una gráfica de barras, y revela que SDF-1α e I-TAC están desplazados de forma cruzada en células MCF-7 pero no CEM-NKr. Barras blancas, afinidad elevada potencial (inhibición >80%); barras grises, afinidad moderada a baja potencial (inhibición entre 60-79%); barras negras, poca afinidad o ninguna (inhibición <60%). Los resultados son la media de tres determinaciones. Por claridad, se omiten las barras de error.

La Figura 2 ilustra una comparación de la afinidad y especificidad de la unión del ligando en CEM-NKr y MCF-7. Se escogieron ligandos de afinidad elevada potenciales seleccionados identificados en la Figura 2 para la competición de respuesta frente a la dosis en CEN-NKr (cuadrados en blanco) y MCF-7 (cuadrados en negro). En cada competición, ^{125}I SDF-1α compite con una quimiocina competidora fría como se indica.

La Figura 3 ilustra que la unión de ^{125}II-TAC en células MCF-7 no es debida a una interacción de unión de CXCR3 clásica. La capacidad de ^{125}I-TAC para competir con las quimiocinas indicadas se examinó en presencia de tampón solamente (cuadrados en negro), MIG en exceso (para inhibir cualquier unión mediada por CXCR3; triángulos en blanco), o SDF-1α en exceso (asteriscos).

La Figura 4 ilustra que el fenotipo de unión descrito en la presente memoria se puede recapitular en una estirpe celular que no expresa endógenamente este receptor. La estirpe celular de tumor de mama transfectada de forma estable con CCX-CKR2 MDA MB 435s muestra unión de ^{125}I SDF-1α. Esta unión se puede competir con SDF-1α e I-TAC frías. Por comparación, las células de tipo salvaje (no transfectadas) no dan una señal de unión de ^{125}I SDF-1α productiva.

La Figura 5 ilustra datos de unión competitiva. Dos pequeñas moléculas, CCX0803 (círculos negros) y CCX7923 (círculos blancos), compiten específicamente con ^{125}I SDF-1α, en tipos celulares discretos; no se detecta competición cruzada. También se incluyó SDF-1α (asteriscos) como un competidor frío de la unión de ^{125}I SDF-1α tanto en MCF-7 como CEM-NKr. En el recuadro se muestran las estructuras químicas de CCX0803 y CCX7923. Los valores predichos de IC_{50} de la competición de SDF-1α y antagonista de CXCR4 se proporcionan en la tabla adjunta.

La Figura 6 ilustra el efecto del tratamiento de células de carcinoma mamario, que expresan CCX-CKR2, con un antagonista de CCX-CKR2 de pequeña molécula, en comparación con células no tratadas con el antagonista.

La Figura 7 ilustra que el antagonista de CCX-CKR2 3451 (*véase*, Tabla 1, Compuesto nº 49) inhibe la adhesión de células que expresan CCX-CKR2 a una monocapa endotelial vascular.

La Figura 8 ilustra que el antagonismo de CCX-CKR2 sobre células de carcinoma mamario reduce el velocidad tumoral.

Definiciones

“Quimiocina” o “ligando de quimiocina” se refiere a una pequeña proteína compuesta de aproximadamente 50 a 110 aminoácidos y que comparte homología de secuencia con otras quimiocinas conocidas (*véase*, por ejemplo, Murphy, P. M., Pharmacol Rev. 52:145-176 (2000)). Las quimiocinas se clasifican según las posiciones relativas del primer par de cisteínas (Cs) encontradas en la secuencia de aminoácidos primaria. En las quimiocinas CXCL, el primer par de cisteínas está separado por cualquier aminoácido individual. Las quimiocinas CCL tienen cisteínas adyacentes. En las quimiocinas CX3CL, el primer par de cisteínas está separado por 3 aminoácidos. Las quimiocinas CL

contienen sólo una única cisteína en la posición homóloga. Las quimiocinas pueden disparar funciones biológicas mediante la unión a y la activación de receptores de quimiocinas.

Un “receptor de quimiocina” se refiere a un polipéptido que interacciona específicamente con una molécula de quimiocina. Un receptor de quimiocina es típicamente un receptor acoplado a proteína G con siete dominios transmembránicos. Los receptores de quimiocinas pueden poseer varios rasgos estructurales comunes, incluyendo un dominio N-terminal muy ácido; la secuencia de aminoácidos DRYLAIVHA (o una pequeña variación de esa secuencia) encontrada en el segundo bucle extracelular de muchos receptores de quimiocinas; un tercer bucle intracelular corto con una carga básica global; un resto de cisteína en cada uno de los cuatro dominios extracelulares. Típicamente, los receptores de quimiocinas tienen un tamaño global de aproximadamente 340-370 restos de aminoácidos. *Véanse, por ejemplo*, revisado en Murphy, P.M. Chemokine Receptors; Overview, Academic Press 2000; y Loetscher P. y Clark-Lewis I. J. Leukocyte Biol. 69:881 (2001). Los receptores de quimiocinas ejemplificativos incluyen, por ejemplo, receptores de quimiocinas CC (incluyendo CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, y CCR10), receptores de quimiocinas CXC (incluyendo CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 y CCX-CKR2 (por ejemplo, SEC ID nº:2)), CX3CR1, CXR1, CCXCKR (CCR11), los receptores de quimiocinas codificados víricamente, US28, ECRF3, el herpesvirus asociado al sarcoma Kaposi GPCR (ORF74), receptores acoplados a proteína G unidos a membranas de poxvirus; D6, y DARC.

Las respuestas definidas que se pueden estimular mediante receptores de quimiocinas incluyen señalización transmembránica, activación de cascadas de señalización citoplásmica, reordenación citoesquelética, adhesión, quimiotaxia, invasión, metástasis, producción de citocinas, inducción génica, represión génica, inducción de expresión proteica, o modulación del crecimiento y diferenciación celulares, incluyendo el desarrollo de cáncer.

“RDC1”, designado en la presnte memoria como “CCX-CKR2”, se refiere a un receptor acoplado a proteína G supuesto de siete dominios transmembránicos (GPCR). El ortólogo de perro de CCX-CKR2 se identificó originalmente en 1991. *Véase*, Libert et al. Science 244:569-572 (1989). La secuencia de perro se describe en Libert et al., Nuc. Acids Res. 18(7):1917 (1990). La secuencia de ratón se describe en, por ejemplo, Heesen et al., Immunogenetics 47:364-370 (1998). La secuencia humana se describe, por ejemplo, en Sreedharan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4986-4990 (1991), que erróneamente describió la proteína como un receptor de péptido intestinal vasoactivo. “CCX-CKR2” incluye secuencias que son sustancialmente similares a o variantes conservadoramente modificadas de SEC ID nº:1, SEC ID nº:2, SEC ID nº:3, SEC ID nº:4, SEC ID nº:5, SEC ID nº:6, SEC ID nº:7, SEC ID nº:8, SEC ID nº:9, o SEC ID nº:10.

Los términos “peptidomimético” y “mimético” se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y funcionales de antagonistas o agonistas de un receptor de quimiocina. Los análogos peptídicos se usan normalmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan “mimético peptídico” o “peptidomiméticos” (Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber y Freidinger TINS p. 392 (1985); y Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987)). Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles se pueden usar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o mejorado. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos por un enlace seleccionado del grupo que consiste, por ejemplo, en -CH2NH-, -CH2S-, -CH2-CH2-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH2-, -CH(OH)CH2-, y - CH2SO-. El mimético puede estar completamente compuesto de análogos sintéticos no naturales de aminoácidos, o es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales, en tanto que tales sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético. Por ejemplo, un mimético puede imitar la unión de SDF-1 o I-TAC a CCX-CKR2. Por ejemplo, una composición mimética está comprendida en el alcance de la invención si es capaz de inhibir o incrementar la actividad o función de CCX-CKR2.

“Anticuerpo” se refiere a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen inmunoglobulínico o genes inmunoglobulínicos, o sus fragmentos, que se unen específicamente y reconocen un analito (antígeno). Los genes inmunoglobulínicos reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural inmunoglobulínica (anticuerpo) ejemplificativa comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kD) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). El término N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsables del reconocimiento antigénico. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. De este modo, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces de disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que propiamente es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 mediante un enlace de disulfuro. El $F(ab)'_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace de disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de ese modo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (*véase*, Paul (Ed.) Fundamental Immunology, Tercera Edición, Raven Press, NY (1993)). Aunque diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, el experto apreciará que tales fragmentos se pueden sintetizar *de novo* ya sea químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. De este modo, el término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (*por ejemplo*, Fv monocatenario).

Anticuerpos "humanizados" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que deriva sustancialmente de una inmunoglobulina procedente de una especie no humana, y el resto de la estructura inmunoglobulínica de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados sobre dominios constantes, o solamente las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno serán de tipo salvaje o modificados mediante una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo modificados para asemejarse lo más posible a inmunoglobulina humana. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDRS (uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis), que están alteradas con respecto a anticuerpo original.

La frase "se une específicamente (o selectivamente) a un anticuerpo" o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. De este modo, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular y no se unen en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína particular. Por ejemplo, se pueden seleccionar anticuerpos generados frente a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los polinucleótidos de la invención para obtener anticuerpos específicamente inmunorreactivos con esa proteína y no con otras proteínas, excepto para variantes polimórficas, por ejemplo proteínas al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idénticas a SEC ID nº:2. Para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular, se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayos. Por ejemplo, habitualmente se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida, transferencias Western, o inmunohistoquímica para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. *Véase*, Harlow y Lane Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, NY (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayos y condiciones que se pueden usar para determinar inmunorreactividad específica. Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos el doble de la señal de fondo o ruido, y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

Un "ligando" se refiere a un agente, por ejemplo un polipéptido u otra molécula, capaz de unirse a un receptor de quimiocina.

Como se usa en la presente memoria, "un agente que se une a un receptor de quimiocina" se refiere a un agente que se une al receptor de quimiocina con una afinidad elevada. "Afinidad elevada" se refiere a una afinidad suficiente para inducir una respuesta farmacológicamente relevante, por ejemplo la capacidad para competir significativamente por la unión con un ligando de quimiocina natural a un receptor de quimiocina a concentraciones farmacéuticamente relevantes (por ejemplo, a concentraciones menores que alrededor de 10^{-5} M). *Véase, por ejemplo*, Ejemplo 1 y Figura 5. Algunos agentes ejemplificativos con afinidad elevada se unirán a un receptor de quimiocina con una afinidad mayor que 10^{-6} M, y algunas veces mayor que 10^{-7} M, o 10^{-8} M. En el contexto de la invención, un agente que no compite por la unión con un ligando de receptor natural cuando el agente está en concentraciones menores que 10^{-4} M se considerará que "no se une".

La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, y sus polímeros, en forma monocatenaria o bicatenaria. Excepto que se limite específicamente, el término comprende ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a nucleótidos de origen natural. Excepto que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también cmprende implícitamente sus variantes modificadas de forma conservadora (*por ejemplo*, sustituciones de codones degenerados y secuencias complementarias así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados está sustituida con restos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Cassol et al. (1992); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes

8:91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Como se usa en la presente memoria, los términos comprenden cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa (*es decir*, antígenos), en las que los restos de aminoácidos están enlazados mediante enlaces peptídicos covalentes.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, *por ejemplo* hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácido se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica como un aminoácido de origen natural, *es decir*, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, *por ejemplo* homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (*por ejemplo*, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. “Miméticos de aminoácidos” se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural.

Los aminoácidos se pueden citar en la presente memoria por sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Igualmente, los nucleótidos se pueden citar por sus códigos de una sola letra habitualmente aceptados.

“Variantes modificadas de forma conservadora” se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, “variantes modificadas de forma conservadora” se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un número de secuencias de ácidos nucleicos codificará cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codificarán todos ellos el aminoácido alanina. De este modo, en cualquier posición en la que una alanina esté especificada por un codón, el codón se puede alterar en cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente memoria que codifica un polipéptido también describe cualquier posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que se puede modificar cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, peptídica, polipeptídica o proteica que alteren, añadan o supriman un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de forma conservadora”, en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. En la técnica son bien conocidas las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Tales variantes modificadas de forma conservadora son, además de y no excluyen, variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

1) Alanina (A), Glicina (G);

2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);

6) Fenilalanina (F), Tirosina (I), Triptófano (W);

7) Serina (S), Treonina (T); y

8) Cisteína (C), Metionina (M)

(*véase, por ejemplo*, Creighton, Proteins (1984)).

El "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en el que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (*es decir*, saltos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por cien para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "idéntico" o por ciento de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (*es decir*, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad a lo largo de una región específica, por ejemplo de todas las secuencias polipeptídicas de la invención o los dominios extracelulares de los polipéptidos de la invención), cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación, o región designada según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Tales secuencias se afirma entonces que son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de ensayo. Opcionalmente, la identidad existe a lo largo de una región que tiene al menos alrededor de 50 nucleótidos de longitud, o más preferiblemente a lo largo de una región que tiene 100 a 500 ó 1000 o más nucleótidos de longitud.

El término "similitud", o por ciento de "similitud", en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos que son iguales o similares como se define en las ocho sustituciones de aminoácidos conservadoras definidas anteriormente (*es decir*, 60%, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% similares a lo largo de una región específica o toda la secuencia de un polinucleótido, por ejemplo de todas las secuencias polipeptídicas de la invención tales como CCX-CKR2 (por ejemplo, SEC ID nº:2) o los dominios extracelulares de los polipéptidos de la invención, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación, o región designada según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Se afirma entonces que tales secuencias son "sustancialmente similares". Opcionalmente, esta identidad existe a lo largo de una región que es al menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o más preferiblemente a lo largo de una región que es al menos de aproximadamente 100 a 500 ó 1000 o más aminoácidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Se pueden usar parámetros del programa por defecto, o se puede designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en, por ejemplo, una secuencia de longitud completa o de 20 a 600, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 aminoácidos o nucleótidos, en el que una secuencia se puede comparar a una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas. Los métodos de alineamiento de las secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede llevar a cabo, *por ejemplo*, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (*véase, por ejemplo*, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia incluye los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul, et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 y Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que coinciden o satisfacen cierta puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T se define como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul (1990), *más arriba*). Estos resultados de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Los resultados de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como se pueda incrementar la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los resultados de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo disminuye en la cantidad X desde su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa va hasta cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cada secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) usa como defectos una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra de 3, y expectativas (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (*véase* Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (*véase, por ejemplo*, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual se produciría por casualidad un emparejamiento entre dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es todavía más preferentemente inferior a 0,2, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01, y todavía más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico reacciona inmunológicamente de forma cruzada con los anticuerpos provocados frente al polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más abajo. De este modo, un polipéptido es típicamente idéntico de forma sustancial a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo en sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones restrictivas, como se describe a continuación. Aún otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que se pueden usar los mismos cebadores para amplificar las secuencias.

"Moduladores" de la actividad de CCX-CKR2 se usa para referirse a moléculas que incrementan o disminuyen la actividad de CCX-CKR2 directa o indirectamente, e incluyen aquellas moléculas identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo* para la unión o señalización de CCX-CKR2. La actividad de CCX-CKR2 se puede incrementar, por ejemplo, poniendo en contacto el polipéptido de CCX-CKR2 con un agonista y/o, en algunos casos, expresando CCX-CKR2 en una célula. Agonistas se refiere a moléculas que incrementan la actividad de CCX-CKR2. Los agonistas son agentes que, por ejemplo, se unen a, estimulan, incrementan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o elevan la actividad de CCX-CKR2. Los moduladores pueden competir por la unión a CCX-CKR2 con ligandos de CCX-CKR2 conocidos tales como SDF-1 e I-TAC y pequeñas moléculas como se describe en la presente memoria.

Antagonistas se refiere a moléculas que inhiben la actividad de CCX-CKR2, por ejemplo bloqueando la unión de agonistas tales como I-TAC o SDF-1. Los antagonistas son agentes que, *por ejemplo*, se unen a, bloquean parcial o totalmente la estimulación, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan, o disminuyen la actividad de CCX-CKR2.

Los moduladores incluyen agentes que, *por ejemplo*, alteran la interacción de CCX-CKR2 con: proteínas que se unen a activadores o inhibidores, receptores, incluyendo receptores acoplados a proteínas B (GPCRs), cinasas, etc. Los moduladores incluyen versiones genéticamente modificadas de ligandos de receptores de quimiocinas de origen natural, *por ejemplo*, con actividad alterada, así como ligandos sintéticos de origen natural, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas, siRNA y similares. Los ensayos para inhibidores y activadores incluyen, *por ejemplo*, aplicar compuestos moduladores putativos a una célula que expresa CCX-CKR2 y determinar después los efectos funcionales sobre la señalización de CCX-CKR2, por ejemplo fosforilación de ERK1 y/o ERK2 o activación de miembros de la ruta de transcripción de señales de ERK1 o ERK2, y/u otros efectos como se describen en la presente memoria. Las muestras o ensayos que comprenden CCX-CKR2 que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador, para examinar el grado de inhibición. A las muestras de control (no tratadas con inhibidores) se les asigna un valor de actividad de receptor de quimiocina relativo de 100%. La inhibición de CCX-CKR2 se logra cuando el valor de la actividad o

expresión de CCX-CKR2 con respecto al control es menor que alrededor de 95%, opcionalmente alrededor de 90%, opcionalmente alrededor de 80%, opcionalmente alrededor de 50% o alrededor de 25-0%. La activación de CCX-CKR2 se logra cuando el valor de la actividad o expresión de CCX-CKR2 con respecto al control es al menos alrededor de 105%, alrededor de 110%, opcionalmente al menos alrededor de 105%, alrededor de 150%, opcionalmente al menos alrededor de 105%, alrededor de 200-500%, o al menos alrededor de 105%, alrededor de 1000-3000% o mayor.

"siRNA" se refiere a ARN pequeños de interferencia, que son capaces de provocar interferencia con la expresión génica y pueden provocar el silenciamiento postranscripcional de genes específicos en células, por ejemplo células de mamífero (incluyendo células humanas), y en el cuerpo, por ejemplo cuerpos de mamíferos (incluyendo seres humanos). El fenómeno de interferencia de ARN se describe y explica en Bass, Nature 411: 428-29 (2001); Elbahir et al., Nature 411: 494-98 (2001); y Fire et al., Nature 391: 806-11 (1998); y en el documento WO 01/75164, en el que también se explican métodos para obtener ARN de interferencia. Los siRNA basados en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los productos génicos descritos en la presente memoria tienen típicamente unos pocos menos de 100 pares de bases y pueden tener, por ejemplo, alrededor de 30 pbs o más cortos, y se pueden obtener mediante enfoques conocidos en la técnica, incluyendo el uso de hebras de ADN complementario o enfoques sintéticos. Los siRNA son capaces de provocar interferencia y pueden provocar el silenciamiento postranscripcional de genes específicos en células, por ejemplo células de mamífero (incluyendo células humanas), y en el cuerpo, por ejemplo cuerpos de mamíferos (incluyendo seres humanos). Los siRNA ejemplares según la invención podrían tener hasta 29 pbs, 25 pbs, 22 pbs, 21 pbs, 20 pbs, 15 pbs, 10 pbs, 5 pbs o cualquier número entero próximo o producto intermedio. Las herramientas para diseñar siRNA inhibidores óptimos incluyen aquellos disponibles de DNAengine Inc. (Seattle, WA) y Ambion, Inc. (Austin, TX).

Otra técnica de RNAi emplea constructos genéticos en los cuales secuencias sentido y antisentido se colocan en regiones que flanquean una secuencia intrónica en orientación de ayuste apropiada con sitios de ayuste dadores y aceptores. Como alternativa, se pueden emplear secuencias espaciadoras de diversas longitudes para separar regiones autocomplementarias de secuencia en el constructo. Durante el procesamiento del transcrito del constructo génico, las secuencias intrónicas se empalman, permitiendo que las secuencias sentido y antisentido, así como las secuencias de unión de ayuste, se unan formando ARN bicatenario. Las ribonucleasas seleccionadas se unen entonces a y escinden el ARN bicatenario, iniciando de ese modo la cascada de sucesos que conducen a la degradación de secuencias génicas de ARNm específicas, y silenciando genes específicos.

El término "compuesto" se refiere a una molécula específica, e incluye sus enantiómeros, diastereómeros, polimorfos y sales de la misma.

El término "heteroátomo" se refiere a un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre enlazado.

El término "sustituido" se refiere a un grupo que está enlazado a una molécula o grupo progenitor. De este modo, un anillo bencénico que tiene un sustituyente metilo es un benceno sustituido con metilo. De forma similar, un anillo bencénico que tiene 5 sustituyentes de hidrógeno sería un grupo fenilo no sustituido cuando se enlaza a una molécula progenitora.

La expresión "heteroátomo sustituido" se refiere a un grupo en el que un heteroátomo está sustituido. El heteroátomo puede estar sustituido con un grupo o átomo, incluyendo, pero sin limitarse a, hidrógeno, halógeno, alquilo, alquileno, alquenilo, alquinilo, arilo, arileno, cicloalquilo, cicloalquileno, heteroarilo, heteroarileno, heterociclilo, carbociclo, hidroxi, alcoxi, ariloxi, y sulfonilo. Los heteroátomos sustituidos representativos incluyen, a título de ejemplo, ciclopropilaminilo, isopropilaminilo, bencilaminilo, y fenoxi.

El término "alquilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo saturado monovalente que puede ser lineal o ramificado. Excepto que se defina de otro modo, tales grupos alquilo contienen típicamente de 1 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquilo representativos incluyen, a título de ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, y similares.

El término "alquileno" se refiere a un grupo de hidrocarburo saturado bivalente que puede ser lineal o ramificado. Excepto que se defina de otro modo, tales grupos alquileno contienen típicamente de 1 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquileno representativos incluyen, a título de ejemplo, metileno, etano-1,2-diílo ("etileno"), propano-1,2-diílo, propano-1,3-diílo, butano-1,4-diílo, pentano-1,5-diílo, y similares.

El término "alquenilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo insaturado monovalente que puede ser lineal o ramificado, y que tiene al menos un, y típicamente 1, 2 ó 3, dobles enlaces carbono-carbono. Excepto que se defina de otro modo, tales grupos alquenilo contienen típicamente de 2 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquenilo representativos incluyen, a título de ejemplo, etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-but-2-enilo, n-hex-3-enilo, y similares.

El término "alquinilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo insaturado monovalente que puede ser lineal o ramificado y que tiene al menos un, y típicamente 1, 2 ó 3, triples enlaces carbono-carbono. Excepto que se defina de otro

modo, tales grupos alquinilo contienen típicamente de 2 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquinilo representativos incluyen, a título de ejemplo, etinilo, n-propinilo, n-but-2-inilo, n-hex-3-inilo, y similares.

El término “arilo” se refiere a un hidrocarburo aromático monovalente que tiene un solo anillo (es decir, fenilo) o anillos condensados (es decir, naftaleno). Excepto que se defina de otro modo, tales grupos arilo contienen típicamente de 6 a 10 átomos anulares de carbono. Los grupos arilo representativos incluyen, a título de ejemplo, fenilo y naftaleno-1-ilo, naftaleno-2-ilo, y similares.

El término “arileno” se refiere a un hidrocarburo aromático divalente que tiene un solo anillo (es decir, fenileno) o anillos condensados (es decir, naftalenodiílo). Excepto que se defina de otro modo, tales grupos arileno contienen típicamente de 6 a 10 átomos anulares de carbono. Los grupos arileno representativos incluyen, a título de ejemplo, 1,2-fenileno, 1,3-fenileno, 1,4-fenileno, naftaleno-1,5-diílo, naftaleno-2,7-diílo, y similares.

El término “aralquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido con arilo. Los grupos aralquilo representativos incluyen bencilo.

El término “cicloalquilo” se refiere a un grupo de hidrocarburo carbocíclico saturado monovalente que tiene un solo anillo o anillos condensados. Excepto que se defina de otro modo, tales grupos cicloalquilo contienen típicamente de 3 a 10 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo representativos incluyen, a título de ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares.

El término “cicloalquileno” se refiere a un grupo de hidrocarburo carbocíclico saturado divalente que tiene un solo anillo o anillos condensados. Excepto que se defina de otro modo, tales grupos cicloalquileno contienen típicamente de 3 a 10 átomos de carbono. Los grupos cicloalquileno representativos incluyen, a título de ejemplo, ciclopropano-1,2-diílo, ciclobutil-1,2-diílo, ciclobutil-1,3-diílo, ciclopentil-1,2-diílo, ciclopentil-1,3-diílo, ciclohexil-1,2-diílo, ciclohexil-1,3-diílo, ciclohexil-1,4-diílo, y similares.

El término “heteroarilo” se refiere a un grupo aromático monovalente sustituido o no sustituido que tiene un único anillo o anillos condensados y que contiene en el anillo al menos un heteroátomo (típicamente 1 a 3 heteroátomos) seleccionado de nitrógeno, oxígeno o azufre. Excepto que se defina de otro modo, tales grupos heteroarilo contienen típicamente de 5 a 10 átomos anulares totales. Los grupos heteroarilo representativos incluyen, a título de ejemplo, especies monovalentes de pirrol, imidazol, tiazol, oxazol, furano, tiofeno, triazol, pirazol, isoxazol, isotiazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina, triazina, indol, benzofurano, benzotiofeno, bencimidazol, benztiazol, quinolina, isoquinolina, quinazolina, quinoxalina y similares, en los que el punto de unión está en cualquier átomo anular de carbono o de nitrógeno disponible.

El término “heteroarileno” se refiere a un grupo aromático divalente que tiene un solo anillo o anillos condensados y que contiene al menos un heteroátomo (típicamente 1 a 3 heteroátomos) seleccionado de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo. Excepto que se defina de otro modo, tales grupos heteroarileno contienen típicamente de 5 a 10 átomos anulares totales. Los grupos heteroarileno representativos incluyen, a título de ejemplo, especies divalentes de pirrol, imidazol, tiazol, oxazol, furano, tiofeno, triazol, pirazol, isoxazol, isotiazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina, triazina, indol, benzofurano, benzotiofeno, bencimidazol, benztiazol, quinolina, isoquinolina, quinazolina, quinoxalina y similares, en los que el punto de unión está en cualquier átomo anular de carbono o de nitrógeno disponible.

Los términos “heterociclo” o “grupo heterocíclico” se refieren a un grupo saturado o insaturado (no aromático) monovalente sustituido o no sustituido que tiene un único anillo o múltiples anillos condensados, y que contiene en el anillo al menos un heteroátomo (típicamente 1 a 3 heteroátomos) seleccionado de nitrógeno, oxígeno o azufre. Excepto que se defina de otro modo, tales grupos heterocíclicos contienen típicamente de 2 a 9 átomos anulares totales. Los grupos heterocíclicos representativos incluyen, a título de ejemplo, especies monovalentes de pirrolidina, morfolina, imidazolidina, pirazolidina, piperidina, 1,4-dioxano, tiomorfolina, piperazina, 3-pirrolina y similares, en los que el punto de unión está en cualquier átomo anular de carbono o de nitrógeno disponible.

El término “carbociclo” se refiere a un anillo aromático o no aromático en el que cada átomo en el anillo es carbono. Los carbociclos representativos incluyen ciclohexano, ciclohexeno, y benceno.

Los términos “halo” o “halógeno” se refieren a fluoro (-F), cloro (-Cl), bromo (-Br), y yodo (-I).

El término “hidroxi” o “hidroxilo” se refiere a un grupo –OH.

El término “alcoxi” se refiere a un grupo –OR, en el que R puede ser un alquilo, alquileno, cicloalquilo o cicloalquileno sustituido o no sustituido. Los sustituyentes adecuados incluyen halo, ciano, alquilo, amino, hidroxi, alcoxi, y amido. Los grupos alcoxi representativos incluyen, a título de ejemplo, metoxi, etoxi, isopropiloxi, y trifluorometoxi.

El término “ariloxi” se refiere a un grupo –OR, en el que R puede ser un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido. Los grupos ariloxi representativos incluyen fenoxi.

El término “sulfonilo” se refiere a un grupo -S(O)2- o -S(O)2R, en el que R puede ser alquileno, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, cicloalquileno, heteroarilo, heteroarileno, heterocíclico, o halógeno. Los grupos sulfonilo representativos incluyen, a título de ejemplo, sulfonato, sulfonamida, haluros de sulfonilo, y dipropilamida sulfonato.

El término “condensación” se refiere a una reacción en la que dos o más moléculas se unen covalentemente. Igualmente, los productos de condensación son los productos formados mediante la reacción de condensación.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La presente invención proporciona el descubrimiento de que el receptor huérfano RDC1, denominado en la presente memoria como CCX-CKR2, se une a los ligandos de quimiocinas SDF1 e I-TAC. Además, la presente invención proporciona el descubrimiento sorprendente de la implicación de CCX-CKR2 en el cáncer. De este modo, la invención proporciona métodos para diagnosticar cáncer detectando CCX-CKR2. La invención también proporciona métodos para inhibir cáncer mediante la administración de un modulador de CCX-CKR2 a un individuo con cáncer.

II. Polipéptidos y polinucleótidos de CCX-CKR2

En numerosas realizaciones de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de CCX-CKR2 de interés se pueden aislar y clonar usando métodos recombinantes. Tales realizaciones se usan, por ejemplo, para aislar polinucleótidos de CCX-CKR2 (por ejemplo, SEC ID nº:1, SEC ID nº:3, SEC ID nº:5, SEC ID nº:7, y SEC ID nº:9)) para la expresión proteica o durante la generación de variantes, derivados, casetes de expresión, u otras secuencias derivadas de un polipéptido de CCX-CKR2 (por ejemplo, SEC ID nº:2, SEC ID nº:4, SEC ID nº:6, SEC ID nº:8, y SEC ID nº:10)), para monitorizar la expresión génica de CCX-CKR2, para el aislamiento o detección de secuencias de CCX-CKR2 en diferentes especies, con fines de diagnóstico en un paciente, *por ejemplo* para detectar mutaciones en CCX-CKR2 o para detectar la expresión de ácidos nucleicos de CCX-CKR2 o polipéptidos de CCX-CKR2. En algunas realizaciones, las secuencias que codifican CCX-CKR2 están enlazadas operablemente a un promotor heterólogo. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención proceden de cualquier mamífero, incluyendo, en particular, *por ejemplo*, un ser humano, un ratón, una rata, un perro, etc.

En algunos casos, los polipéptidos de CCX-CKR2 de la invención comprenden los aminoácidos extracelulares de la secuencia de CCX-CKR2 humana (por ejemplo, de SEC ID nº:2, SEC ID nº:4, SEC ID nº:6, SEC ID nº:8, y SEC ID nº:10)), mientras que otros restos están alterados o ausentes. En otras realizaciones, los polipéptidos de CCX-CKR2 comprenden fragmentos de CCX-CKR2 que se unen a ligandos. Por ejemplo, en algunos casos, los fragmentos se unen a I-TAC y/o SDF1. La estructura de receptores con siete dominios transmembránicos (de los cuales CCX-CKR2 es uno de ellos) es bien conocida para los expertos en la materia, y por lo tanto los dominios transmembránicos se pueden determinar fácilmente. Por ejemplo, se pueden encontrar en internet algoritmos de hidrofobia fácilmente disponibles en la G Protein-Coupled Receptor Data Base (GPCRDB), por ejemplo http://www.gpcr.org/7tm/seq/DR/RDC1_HUMAN.TABDR.html o http://www.gpcr.org/7tm/seq/vis/swac/P25106.html.

Esta invención se basa en técnicas habituales en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994)).

Los cebadores y sondas apropiados para identificar los genes que codifican CCX-CKR2 a partir de tejidos de mamíferos pueden derivar de las secuencias proporcionadas en la presente memoria (por ejemplo, SEC ID nº:1). Para un repaso general de la PCR, *véase*, Innis et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego (1990).

III. Desarrollo de compuestos terapéuticos específicos

Las moléculas que se unen a CCX-CKR2, incluyendo moduladores de la función de CCX-CKR2, es decir, agonistas o antagonistas o agentes de la actividad de CCX-CKR2, son útiles para tratar un número de enfermedades de mamíferos, incluyendo cáncer.

Las enfermedades o estados patológicos de seres humanos u otras especies que se pueden tratar con antagonistas de un receptor de quimiocina u otros inhibidores de la función del receptor de quimiocina incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, carcinomas, gliomas, mesoteliomas, melanomas, linfomas, leucemias, adenocarcinomas, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, leucemia, linfoma, cáncer de próstata, y linfoma de Burkitt, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar de células no microcíticas, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer del esófago, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer hepatobiliar, cáncer de la vesícula biliar, cáncer del intestino delgado, cáncer rectal, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer uretral, cáncer testicular, cáncer de cuello uterino, cáncer vaginal,

cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer adrenal, cáncer endocrino pancreático, cáncer carcinoide, cáncer óseo, cáncer de piel, retinoblastomas, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (*véase*, CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE (DeVita, V.T. et al. eds 1997) para cánceres adicionales); así como disfunción cerebral y neuronal, tal como enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple; disfunción renal; artritis reumatoide; rechazo de aloinjerto cardíaco; aterosclerosis; asma; glomerulonefritis; dermatitis de contacto; enfermedad inflamatoria del intestino; colitis; psoriasis; lesión por reperfusión; así como otros trastornos y enfermedades descritos en la presente memoria.

Alternativamente, un agonista de CCX-CKR2 se puede usar para tratar enfermedad, por ejemplo en disfunción renal, cerebral o neuronal, así como en casos en los que la movilización de células madre es terapéutica.

A. Métodos para identificar moduladores de receptores de quimiocinas

Se puede utilizar un número de diferentes protocolos de cribado para identificar agentes que modulan el nivel de actividad o función de CCX-CKR2 en células, particularmente en células de mamíferos, y especialmente en células humanas. En términos generales, los métodos de cribado implican cribar una pluralidad de agentes para identificar un agente que interacciona con CCX-CKR2 (o un dominio extracelular del mismo), por ejemplo uniéndose a CCX-CKR2, evitando que un ligando (por ejemplo, I-TAC y/o SDF1) se una a CCX-CKR2, o activando CCX-CKR2. En algunas realizaciones, un agente se une a CCX-CKR2 con al menos alrededor de 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 300, 500, o 1.000 veces la afinidad del agente por otra proteína.

1. Ensayos de unión a receptores de quimiocinas

En algunas realizaciones, los moduladores de CCX-CKR2 se identifican cribando moléculas que compiten con un ligando de CCX-CKR2 tal como SDF1 o I-TAC. Los expertos en la materia reconocerán que existen varias maneras para llevar a cabo análisis de competición. En algunas realizaciones, muestras con CCX-CKR2 se preincuban con un ligando de CCX-CKR2 marcado, y entonces se ponen en contacto con una molécula competidora potencial. La alteración (por ejemplo, una disminución) de la cantidad de ligando unido a CCX-CKR2 indica que la molécula es un modulador potencial de CCX-CKR2.

Se pueden llevar a cabo cribados preliminares cribando agentes capaces de unirse a una CCX-CKR2, ya que al menos algunos de los agentes así identificados probablemente son moduladores de receptores de quimiocinas. Los ensayos de unión implican habitualmente poner en contacto CCX-CKR2 con uno o más agentes de ensayo, y permitir un tiempo suficiente para que la proteína y los agentes de ensayo formen un complejo de unión. Cualesquiera complejos de unión formados se pueden detectar usando cualquier número de técnicas analíticas establecidas. Los ensayos de unión de proteínas incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión inmunohistoquímicos, citometría de flujo, unión de radioligando, unión de ligando marcado con europio, unión de ligando marcado con biotina, u otros ensayos que mantienen la conformación de CCX-CKR2. El receptor de quimiocina utilizado en tales ensayos se puede expresar de forma natural, se puede clonar o se puede sintetizar. Por ejemplo, poniendo en contacto CCX-CKR2 con un agonista potencial y midiendo la actividad de CCX-CKR2, es posible identificar aquellas moléculas que estimulan la actividad de CCX-CKR2.

2. Células y reactivos

Los métodos de cribado de la invención se pueden llevar a cabo como ensayos *in vitro* o a base de células. Los ensayos *in vitro* se llevan a cabo, por ejemplo, usando fracciones de membranas o células completas que comprenden CCX-CKR2. Los ensayos a base de células se pueden llevar a cabo en cualquier célula en la que se exprese CCX-CKR2.

Los ensayos a base de células implican células completas o fracciones celulares que contienen CCX-CKR2 para cribar la unión del agente o la modulación de la actividad de CCX-CKR2 por el agente. Los tipos celulares ejemplificativos que se pueden usar según los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, cualesquiera células de mamífero, incluyendo leucocitos tales como neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, y linfocitos, tales como células T y células B, leucemias, linfomas de Burkitt, células tumorales, células endoteliales, fibroblastos, células cardíacas, células musculares, células de tumor de mama, carcinomas de cáncer ovárico, carcinomas de cuello uterino, glioblastomas, células hepáticas, células de riñón, y células neuronales, así como células fúngicas, incluyendo levadura. Las células pueden ser células primarias o células tumorales, u otros tipos de estirpes celulares inmortales. Por supuesto, CCX-CKR2 se puede expresar en células que no expresan una versión endógena de CCX-CKR2.

En algunos casos, se pueden usar fragmentos de CCX-CKR2, así como fusiones proteicas, para el cribado. Cuando se desean moléculas que compiten por la unión con ligandos de CCX-CKR2, los fragmentos de CCX-CKR2 usados son fragmentos capaces de unirse a los ligandos (por ejemplo, capaces de unirse a I-TAC o SDF1). Como alternativa, se puede usar cualquier fragmento de CCX-CKR2 como una diana para identificar moléculas que se unen a CCX-CKR2. Los fragmentos de CCX-CKR2 pueden incluir cualquier fragmento de, por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50 aminoácidos hasta una proteína que contiene todos menos un aminoácido de CCX-CKR2.

Típicamente, los fragmentos de unión a ligandos comprenderán regiones transmembránicas y/o la mayoría o todos los dominios extracelulares de CCX-CKR2.

3. Actividad de señalización

En algunas realizaciones, la señalización disparada por la activación de CCX-CKR2 se usa para identificar moduladores de CCX-CKR2. La actividad de señalización de los receptores de quimiocinas se puede determinar de muchas maneras. Por ejemplo, la señalización se puede determinar detectando la adhesión celular mediada por receptores de quimiocinas. Las interacciones entre quimiocinas y receptores de quimiocinas pueden conducir a una adhesión rápida a través de la modificación de la afinidad y avidez de integrina. *Véase, por ejemplo*, Laudanna, Immunological Reviews 186:37-46 (2002).

La señalización también se puede medir determinando, cualitativa y cuantitativamente, mensajeros secundarios, tales como AMP cíclico o fosfatos de inositol, así como también se pueden monitorizar sucesos de fosforilación o desfosforilación. *Véanse, por ejemplo*, Premack, et al. Nature Medicine 2: 1174-1178 (1996) y Bokoch, Blood 86:1649-1660 (1995).

Los ejemplos proporcionan resultados que demuestran que la actividad de CCX-CKR2 está mediada por la ruta de MAPK, específicamente que CCX-CKR2 promueve la fosforilación de las proteínas MAPK ERK1 y ERK2. En el número de acceso de GenBank p27361 se proporciona una secuencia nativa ejemplificativa ERK1; en el número de acceso de GenBank p28482 se proporciona una secuencia nativa ejemplificativa ERK2. De este modo, algunos ensayos se diseñan para detectar una señal en la ruta de MAPK. El término “señal”, como se usa con respecto a la ruta de MAPK, se refiere a un componente que es parte de la ruta y/o cierta actividad o manifestación asociada con la ruta. El componente puede ser cualquier molécula (por ejemplo, una proteína) implicada (por ejemplo, producida, utilizada o modificada) en la ruta de transducción de señales de MAPK. En algunos casos, la señal es la detección de la fosforilación de una proteína MAPK, tal como ERK1 o ERK2. Otras señales que se pueden detectar incluyen los componentes que se forman y/o utilizan aguas abajo de la fosforilación de ERK1 o ERK2, así como actividades asociadas con la formación y utilización de estos componentes. Algunos ensayos se pueden llevar a cabo para detectar componentes que se forman y/o utilizan aguas arriba de la fosforilación de ERK1 o ERK2, así como actividades asociadas con la producción o utilización de tales componentes aguas arriba. Como se indica anteriormente, en el caso de ERK1 o ERK2, los componentes aguas arriba incluyen, por ejemplo, Ras, una MKKK (por ejemplo, c-Raf1, B-Raf, y A-Raf), y una MKK (por ejemplo, MKK1 y MKK2). Los componentes aguas abajo incluyen, por ejemplo, la proteína p90RSK, c-JUN, c-FOS, CREB y STAT. De este modo, cada uno de estos componentes se puede detectar en ciertos ensayos y/o la modificación (por ejemplo, fosforilación) de estos componentes. Además, también se podría detectar el perfil de expresión génica y la secreción de proteínas.

Algunos de los ensayos de cribado que se proporcionan implican detectar la fosforilación de ERK1 y/o ERK2. La fosforilación de estas proteínas depende de ligandos (por ejemplo, SDF1, ITAC). De este modo, los ensayos en ciertos métodos de cribado se llevan a cabo en presencia de ITAC o SDF1 para promover la fosforilación de ERK1 y ERK2. Cuando se llevan a cabo ensayos con ITAC y SDF1, el ensayo se puede simplificar usando células que no expresan CXCR3 o CXCR4 por las razones descritas anteriormente.

La determinación de si ERK1 o ERK2 se ha fosforilado se puede llevar a cabo usando diversos enfoques. Una opción es lisar las células después de que se han incubado con un ligando de CCX-CKR2 y un agente de ensayo. El lisado resultante se puede analizar entonces mediante transferencia Western sometiendo a electroforesis el lisado para separar proteínas en un gel y sondando después el gel con anticuerpos que se unen específicamente a la forma fosforilada de ERK1 o ERK2. Tales anticuerpos están comercializados por Cell Signaling Technologies de Beverly, MA. La cantidad total de ERK1 o ERK2 presente se puede determinar opcionalmente usando anticuerpos que se unen específicamente tanto a las formas fosforiladas como no fosforiladas de ERK1 y ERK2. En los ejemplos se exponen detalles adicionales con respecto a este enfoque. Otra opción que es adecuada para el cribado de alto rendimiento es usar un método de ELISA que usa anticuerpos que se unen específicamente a las formas fosforiladas de ERK1 y ERK2. Los kits para llevar a cabo tales ensayos en formatos de alto rendimiento están también disponibles en Cell Signaling Technologies de Beverly, MA (véase, por ejemplo, el kit de ELISA de sándwich de fosfo-p44/42 MAPK (T202/Y204) PathScan™).

Se podrían usar transferencia Western y técnicas de ELISA similares para detectar la presencia de proteínas que son componentes de la ruta de MAPK aguas abajo de la fosforilación de ERK1 y ERK2 usando anticuerpos que reconocen específicamente los componentes que están implicados en la ruta. Por ejemplo, la fosforilación de p90RSK se puede evaluar usando anticuerpos comercialmente disponibles específicos de fósforo análogos a la detección Western de ERK2 fosforilada o ERK2.

Además, también se pueden monitorizar otros sucesos aguas abajo de la activación de CCX-CKR2 para determinar la actividad de señalización. Los sucesos aguas abajo incluyen aquellas actividades o manifestaciones que se producen como resultado de la estimulación de un receptor de quimiocina. Los sucesos aguas abajo ejemplificativos incluyen, por ejemplo, cambio de estado de una célula (por ejemplo, de célula normal a célula cancerosa, o de célula cancerosa a célula no cancerosa). Las respuestas celulares incluyen adhesión de células (por ejemplo, a células

endoteliales). Las cascadas de señalización establecidas implicadas en la angiogénesis (por ejemplo, señalización mediada por VEGF) también se pueden monitorizar en busca de los efectos provocados por moduladores de CCX-CKR2. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de membrana corioalantoica (CAM) para evaluar los efectos sobre la angiogénesis, o, por ejemplo, el ensayo de Miles, para estudiar efectos sobre la permeabilidad vascular.

En otro ejemplo, la supervivencia celular se puede medir como un sustituto de la actividad de CCX-CKR2. Como se describe con mayor detalle en los ejemplos, la expresión de CCX-CR2 da como resultado la supervivencia celular prolongada de células que expresan CCX-CR2 que se hacen crecer en condiciones con bajo contenido de suero, en comparación con células que no expresan CCX-CR2 que se hacen crecer en las mismas condiciones. De este modo, se espera que el antagonismo de CCX-CR2 reduzca la supervivencia celular, mientras que se espera que la activación (por ejemplo, vía agonistas) incremente la supervivencia celular. En consecuencia, la supervivencia y apoptosis celulares pueden servir como una lectura de la actividad de CCX-CR2.

Para identificar moduladores de CCX-CR2, se puede incorporar una amplia variedad de ensayos de muerte celular y apoptosis en los métodos de cribado. En general, los ensayos de este tipo implican típicamente someter una población de células a condiciones que inducen la muerte celular o apoptosis, habitualmente tanto en presencia como ausencia de un compuesto de ensayo que es un modulador potencial de la muerte celular o apoptosis. Entonces se lleva a cabo un ensayo con las células, o un extracto de las mismas, para evaluar qué efecto tiene el agente de ensayo sobre la muerte celular o apoptosis comparando el grado de muerte celular o apoptosis en presencia o ausencia del agente de ensayo. En lugar de ensayar la muerte celular o apoptosis, se puede llevar a cabo el tipo opuesto de ensayo, a saber, el ensayo de la supervivencia celular, así como actividades relacionadas tales como crecimiento celular y proliferación celular. Independientemente del tipo particular de ensayo, algunos ensayos se llevan a cabo en presencia de un ligando que activa CCX-CR2, tal como I-TAC o SDF-1.

En los presentes métodos de cribado, se puede evaluar una variedad de diferentes parámetros que son característicos de la muerte celular y apoptosis. Los ejemplos de tales parámetros incluyen, pero no se limitan a, monitorización de la activación de rutas celulares para respuestas toxicológicas mediante análisis de la expresión génica o proteica, fragmentación de ADN, cambios en la composición de las membranas celulares, permeabilidad de la membrana, activación de componentes de receptores de la muerte o rutas de señalización aguas abajo (por ejemplo, caspasas), respuestas a estrés genérico, activación de NF-kappa B, y respuestas a mitógenos.

A partir de la función que CCX-CKR2 desempeña reduciendo la apoptosis, otro enfoque es ensayar lo opuesto a la apoptosis y a la muerte celular, a saber, llevar a cabo cribados en los que se detecta la supervivencia celular o proliferación celular. Por ejemplo, la supervivencia celular se puede detectar monitorizando la duración de tiempo durante el cual las células permanecen viables, la duración de tiempo durante el cual un cierto porcentaje de las células originales permanecen vivas, o un incremento en el número de células. Estos parámetros se pueden monitorizar visualmente usando técnicas establecidas.

Otro ensayo para evaluar la apoptosis implica el marcaje de células con anexina V (conjugado con el colorante Alexa Fluor(r) 488) y yoduro de propidio (PI) (Molecular Probes, Eugene, Oregón). PI, un colorante fluorescente rojo que se une al ácido nucleico, es impermeable tanto a células vivas como apoptóticas. PI sólo marca células necróticas mediante la unión fuerte a los ácidos nucleicos en la célula. La anexina V aprovecha el hecho de que las células apoptóticas translocan fosfatidilserina (PS) a la superficie externa de la célula. La anexina V es un anticoagulante humano con elevada afinidad por (PS). Las células apoptóticas, pero no las células vivas, expresan PS en su superficie exterior. La anexina V (marcada con el colorante Alexa Fluor(r) 488) marca estas células con fluorescencia verde. Las células se pueden analizar entonces en un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) para evaluar la fluorescencia en los canales rojo y verde: las células apoptóticas (positivas a anexina, negativas a PI) fluorescen solamente en el canal verde; las células vivas (negativas a anexina, negativas a PI) presentan baja fluorescencia tanto en los canales rojo como verde; y las células necróticas o muertas (positivas a anexina, positivas a PI) son fuertemente positivas tanto en los canales rojo como verde.

Otros métodos de cribado se basan en la observación de que la expresión de ciertas proteínas reguladoras es inducida por la presencia o activación de CCX-CR2. La detección de tales proteínas se puede usar así para determinar directamente la actividad de CCX-CR2. Como se describe con mayor detalle en los ejemplos a continuación, se llevaron a cabo una serie de investigaciones de ELISA para comparar la concentración relativa de diversas proteínas segregadas en los medios de cultivo celular para células transfectadas con CCX-CR2 y células no transfectadas. Mediante estos estudios se determinó que CCX-CR2 induce la producción de un número de proteínas reguladoras diversas, incluyendo factores de crecimiento, quimiocinas, metaloproteinasas e inhibidores de metaloproteinasas. De este modo, algunos de los métodos de cribado que se proporcionan implican determinar si un agente de ensayo modula la producción de ciertos factores de crecimiento, quimiocinas, metaloproteinasas e inhibidores de metaloproteinasas por CCX-CR2. En algunos casos, los ensayos se llevaron a cabo con células (o sus extractos) que se han hecho crecer en condiciones de suero limitantes, ya que se encontró que esto incrementa la producción de las proteínas inducidas por CCX-CR2 (véanse los ejemplos).

Las siguientes proteínas son ejemplos de las diversas clases de proteínas que se detectaron, así como proteínas específicas dentro de cada clase: (1) factores de crecimiento (por ejemplo, GM-CSF); (2) quimiocinas (por ejemplo,

RANTES, MCP-1); (3) metaloproteinasa (por ejemplo, MMP3); y (4) inhibidor de metaloproteinasa (por ejemplo, TIMP-1). Se espera que también se puedan detectar otras proteínas en estas diversas clases.

Estas proteínas particulares se pueden detectar usando métodos de detección inmunológica estándar que son conocidos en la técnica. Un enfoque que es adecuado para uso en un formato de alta producción, por ejemplo, son los ELISAs, que se llevaron a cabo en placas de múltiples pocillos. Un kit de ELISA para detectar TIMP-1 está disponible en DakoCytomation (Número de Código de Producto EL513). En los ejemplos siguientes se proporcionan ejemplos adicionales de proveedores de anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas enunciadas anteriormente. Las proteínas tales como las metaloproteinasas, que son enzimas, también se pueden detectar mediante ensayos enzimáticos conocidos.

En otras realizaciones, los moduladores potenciales de CCX-CK2 se ensayan en busca de su capacidad para modular la adhesión celular. Se ha estudiado la adhesión de células tumorales a monocapas de células endoteliales como modelo de invasión metastásica (*véase, por ejemplo*, Blood y Zetter, Biovhem. Biophys. Acta, 1032, 89-119 (1990). Estas monocapas de células endoteliales imitan la vasculatura linfática y se pueden estimular con diversas citocinas y factores de crecimiento (por ejemplo, TNFalfa e IL-1beta). Las células que expresan CCX-CKR2 se pueden evaluar en busca de su capacidad para adherirse a esta monocapa tanto en ensayos de adhesión estáticos como también en ensayos en los que las células están en condiciones de flujo para imitar la fuerza de la vasculatura *in vivo*. Adicionalmente, también se pueden llevar a cabo in vivo ensayos para evaluar la adhesión (*véase, por ejemplo*, von Andrian, U.H. Microcirculation. 3(3):287-300 (1996)).

4. Validación

Los agentes que se identifican inicialmente mediante cualquiera de los métodos de cribado anteriores se pueden analizar adicionalmente para validar la actividad aparente. Preferiblemente, tales estudios se llevan a cabo con modelos de animales adecuados. El formato básico de tales métodos implica administrar un compuesto líder identificado durante un cribado inicial a un mamífero que sirve como modelo de enfermedad para seres humanos, y determinar después si la enfermedad (por ejemplo, cáncer) está de hecho modulada y/o la enfermedad o estado patológico mejora. Los modelos de animales utilizados en estudios de validación generalmente son mamíferos de cualquier tipo. Los ejemplos específicos de animales adecuados incluyen, pero no se limitan a, primates, ratones, ratas y pez cebra.

B. Agentes que interaccionan con CCX-CKR2

Los moduladores de CCX-CKR2 (por ejemplo, antagonistas o agonistas) pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos (incluyendo monoclonales, humanizados, u otros tipos de proteínas de unión que son conocidas en la técnica), moléculas orgánicas pequeñas, siRNA, polipéptidos de CCX-CKR2 o sus variantes, quimiocinas (incluyendo, pero sin limitarse a, SDF-1 y/o I-TAC), miméticos de quimiocinas, polipéptidos de quimiocinas, etc.

Los agentes analizados como moduladores de CCX-CKR2 pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como un polipéptido, azúcar, ácido nucleico o lípido. Como alternativa, los moduladores pueden ser versiones genéticamente alteradas, o versiones peptidomiméticas, de una quimiocina u otro ligando. Típicamente, los compuestos de ensayo serán moléculas químicas pequeñas y péptidos. Esencialmente se puede usar cualquier compuesto químico como modulador potencial o ligando en los ensayos de la invención, aunque se usan muy a menudo compuestos que se pueden disolver en disoluciones acuosas u orgánicas (especialmente a base de DMSO). Los ensayos se diseñan para cribar grandes librerías químicas automatizando las etapas del ensayo y proporcionando compuestos a partir de cualquier fuente conveniente a ensayos, que se llevan a cabo típicamente en paralelo (*por ejemplo*, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robóticos. Se apreciará que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza).

En algunas realizaciones, los agentes tienen un peso molecular menor que 1.500 daltons, y en algunos casos menor que 1.000, 800, 600, 500 ó 400 daltons. El tamaño relativamente pequeño de los agentes puede ser deseable debido a que las moléculas más pequeñas tienen una mayor probabilidad de tener propiedades fisioquímicas compatibles con buenas características farmacocinéticas, incluyendo absorción oral, que los agentes con mayor peso molecular. Por ejemplo, los agentes con menos probabilidad de éxito como fármacos basados en la permeabilidad y solubilidad se describieron por Lipinski et al. según lo siguiente: que tienen más de 5 dadores de enlaces de H (expresado como la suma de OHs y NHs); que tienen un peso molecular de alrededor de 500; que tienen un LogP de alrededor de 5 (o MLogP de alrededor de 4,15); y/o que tienen más de 10 aceptores de enlaces de H (expresado como la suma de Ns y Os). *Véase, por ejemplo*, Lipinski et al. Adv Drug Delivery Res 23:3-25 (1997). Las clases de compuestos que son sustratos para transportadores biológicos son típicamente excepciones a la regla.

En una forma de realización, los métodos de cribado de alto rendimiento implican producir una librería química o peptídica combinatoria que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos moduladores o ligandos potenciales). Tales “librerías químicas combinatorias” o “librerías de ligandos” se criban

entonces en uno o más ensayos, vini(especies químicas o subclases particulares) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como “compuestos líderes” convencionales, o ellos mismos se pueden usar como compuestos terapéuticos potenciales o reales.

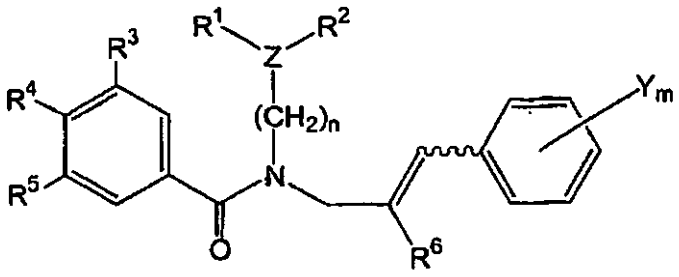
Una librería química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados mediante síntesis química o síntesis biológica, combinando un número de “bloques de construcción” químicos. Por ejemplo, una librería química combinatoria lineal, tal como una librería polipeptídica, se forma combinando un conjunto de bloques de construcción químicos (aminoácidos) en todas las formas posibles para una longitud dada de compuesto (*es decir*, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de tal mezclamiento combinatorio de bloques de construcción químicos.

La preparación y el cribado de librerías químicas combinatorias es bien conocido para los expertos en la materia. Tales librerías químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, librerías peptídicas (*véanse, por ejemplo*, patente US 5.010.175, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487-493 (1991) y Houghton et al., Nature 354:84-88 (1991)). También se pueden usar otras químicas para generar librerías de diversidad química. Tales químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (*por ejemplo*, Publicación PCT nº WO 91/19735), péptidos codificados (*por ejemplo*, Publicación PCT WO 93/20242), bio-oligómeros al azar (*por ejemplo*, Publicación PCT nº WO 92/00091), benzodiazepinas (*por ejemplo*, patente US nº 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de librerías de pequeños compuestos (Chen et al., J. Amer. Chem. Soc. 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho et al., Science 261:1303 (1993)), y/o fosfonatos de peptidilo (Campbell et al., J. Org. Chem. 59:658 (1994)), librerías de ácidos nucleicos (*véanse* Ausubel, Berger y Sambrook, todos ellos anteriormente), librerías de ácidos nucleicos peptídicos (*véase, por ejemplo*, patente US nº 5.539.083), librerías de anticuerpos (*véase, por ejemplo*, Vaughn et al., Nature Biotechnology, 14(3):309-314 (1996) y el documento PCT/US96/10287), librerías de hidratos de carbono (*véanse, por ejemplo*, Liang et al., Science, 274:1520-1522 (1996) y la patente US nº 5.593.853), librerías de pequeñas moléculas orgánicas (*véanse, por ejemplo*, benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides, patente US nº 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente U.S. 5.549.974; pirrolidinas. patentes US nº 5.525.735 y nº 5.519.134; compuestos morfolínicos, patente U.S. 5.506.337; benzodiazepinas, patente nº 5.288.514, y similares).

Los dispositivos para la preparación de librerías combinatorias están comercialmente disponibles (*véanse, por ejemplo*, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, numerosas librerías combinatorias están ellas mismas comercialmente disponibles (*véanse, por ejemplo*, ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.).

CCX7923 (*véase*, Figura 4) está comercializado y se puede obtener mediante la condensación de N-[3-(dimetilamino)propil]-N,N-dimetil-1,3-propanodiamina con bromometil-biciclo(2,2,1)hept-2-eno mediante métodos conocidos en la técnica. CCX0803 (*véase*, Figura 4) está comercialmente disponible y se puede obtener mediante condensación de 3-(2-bromoetil)-5-fenilmetoxi-indol y 2,4,6-trifenilpiridina mediante métodos bien conocidos en la técnica. *Véanse, por ejemplo*, Organic Function Group Preparations, 2ª Ed. Vol. 1, (S.R. Sander y W. Karo 1983); Handbook of Heterocyclic Chemistry (A.R. Katritzky, 1985); Encyclopedia of Chemical Technology, 4ª Ed. (J.L. Kroschwitz, 1996).

En una forma de realización, los compuestos activos (es decir, moduladores de CCX-CKR2) de la presente invención tienen la estructura general (I):



(I) ;

en la que

m es un número entero de 1 a 5, y cada Y que sustituye al anillo bencilo se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido con halo, alquileno, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquileno, halógeno, heterocíclico, arilo, arileno, heteroarilo, heteroarileno, hidroxi, alcoxi, y ariloxi;

n es 0, 1, 2 ó 3;

Z es -CH- o -N-;

R^1 y R^2 son, cada uno independientemente, alquilo o hidrógeno, o Z, en combinación con R^1 y R^2, forma un anillo de 5 ó 6 miembros que comprende al menos un nitrógeno y que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos adicionales, en el que dicho anillo de 5-6 miembros está opcional e independientemente sustituido con uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, fenilo, bencilo, sulfonilo, y heteroátomo sustituido;

R^3, R^4, y R^5 se seleccionan, cada uno independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido con halo, alquileno, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquileno, heterocíclico, arilo, arileno, heteroarilo, heteroarileno, hidroxi, alcoxi, y ariloxi; y

R^6 es alquilo o hidrógeno; con la condición de que si Z es nitrógeno y R^1 y R^2 junto con Z forman un grupo morfilinilo, entonces n sea 3, y al menos uno de R^3, R^4, y R^5 sea hidroxi, alvoci o ariloxi; o con la condición de que si n=1, Z sea carbono y R^1 y R^2 en combinación no sea $-CH_2CH_2NCH_2CH_2-$; o

con la condición de que si R^1 junto con R^2 es $-CH(CH_3)(CH_2)_4-$, entonces Z sea -CH-; o

con la condición de que si R^5 es t-butilo, entonces R^3 sea hidrógeno; o

con la condición de que si R^4 y R^5 forman juntos un anillo de 5 miembros, entonces al menos uno de los átomos enlazados al anillo fenilo sea carbono. *Véanse*, la solicitud de patente provisional US nº 60/434.912, presentada el 20 de diciembre de 2002 y la solicitud de patente provisional US nº 60/516.151, presentada el 20 de diciembre de 2003.

El enlace ondulado que conecta la olefina al anillo fenílico sustituido significa que el anillo puede estar en cis o en trans con respecto a R^6. En una realización preferida, n es 1, 2 ó 3. En otra realización preferida, n es 2 ó 3. En una realización preferida adicional, n es 3.

En otra realización, los compuestos preferidos tienen la estructura general (I), en la que R^6 es hidrógeno. En una realización adicional, los compuestos preferidos tienen la estructura general (I), en la que R^6 es metilo.

En otra realización, los compuestos preferidos tienen la estructura general (I), en la que R^3, R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno, hidroxi, alquilo, alcoxi, ariloxi, y alquilo sustituido con halo. Más preferiblemente, R^3, R^4 y R^5 son independientemente alcoxi o hidrógeno. En otra realización, los compuestos preferidos tienen la estructura general (I), en la que R^4 es hidrógeno y R^3 y R^5 son alcoxi (-OR), incluyendo grupos trifluoroalcoxi tales como trifluorometoxi y ($-OCH_2CF_3$). En una realización adicional, R^3 es hidrógeno y R^4 y R^5 son alcoxi. En cualquiera de estas realizaciones, el grupo alcoxi puede ser metoxi ($-OCH_3$) o etoxi ($-OCH_2CH_3$).

En otra realización, los compuestos preferidos tienen la estructura general (1), en la que R^4 y R^5 forman juntos un anillo heterocíclico, arilo o heteroarilo. En otra realización preferida, R^3 es hidrógeno y R^4 y R^5 son juntos $-O(CH_2)_3O-$, $-(CH)_4-$, o $-N(CH)_2N-$.

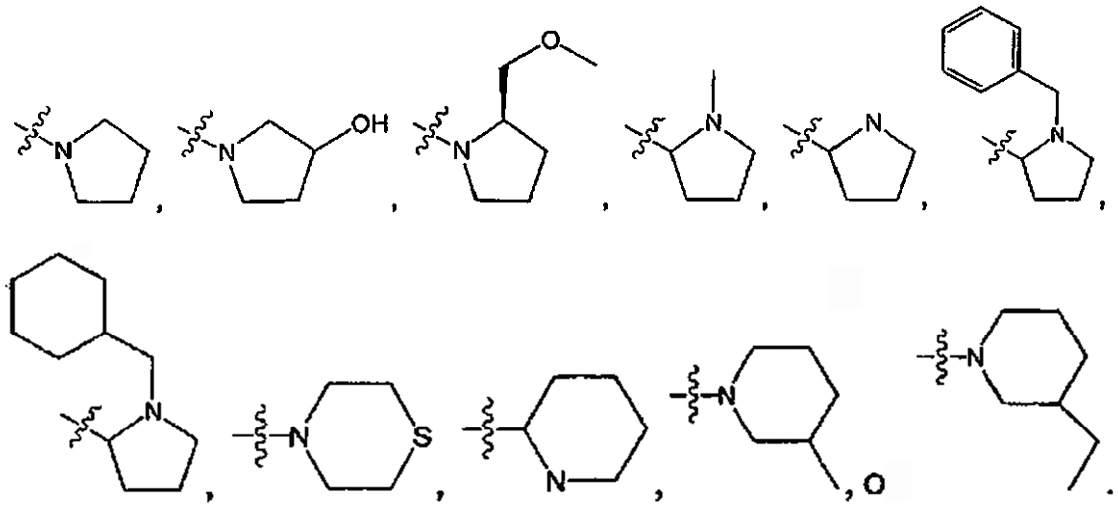
En otra realización, los compuestos preferidos tienen la estructura general (I), en la que Z es nitrógeno, y Z en combinación con R^1 y R^2 forma un grupo heteroarilo o heterocíclico. En una realización preferida, los compuestos tienen la fórmula estructural (I), en la que Z es CH, y Z en combinación con R^1 y R^2 forma un grupo heteroarilo o heterocíclico. Los compuestos más preferidos tienen la estructura general (I), en la que Z es CH, y Z en combinación con R^1 y R^2 forma un grupo heterocíclico que contiene nitrógeno. En una realización adicional, Z en combinación con R^1 y R^2 forma un grupo morfolinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, o piperazinilo sustituido o no sustituido.

Los sustituyentes preferidos para el grupo heteroarilo o heterocíclico incluyen alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alcoxi, hidroxi, heteroátomos, y haluros. En una realización especialmente preferida, el grupo heteroarilo o heterocíclico está sustituido con grupos bencilo, fenilo, metilo, etilo, ciclohexilo, metoximetilo ($-CH_2OCH_3$), o ciclohexilmetilo ($-CH_2(C_6H_{11})$).

En una realización, un compuesto preferido tiene la fórmula estructural (I), en la que Z en combinación con R^1 y R^2 es un grupo pirrolidinilo sustituido con alquilo o con metoximetilo; un grupo piperidinilo sustituido con bencilo, fenilo, metilo, etilo, o con heteroátomo sustituido; o un grupo piperazinilo sustituido con bencilo, fenilo o sulfonilo. Los grupos heteroátomos sustituidos especialmente preferidos incluyen alcoxi, aminilo, cicloalquilaminilo, alquilaminilo,

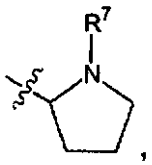
ciclopropilaminilo, isopropilaminilo, bencilaminilo, y fenoxi. Preferiblemente, el heteroátomo sustituido está en la posición 3 del anillo piperidinílico.

En otro aspecto, los compuestos preferidos tienen la estructura general (I), en la que Z en combinación con R^1 y R^2 es



Los compuestos preferidos que tienen la estructura general (I) también pueden tener Z como átomo de nitrógeno, tienen R^1 y R^2 cada uno como grupos alquilo o metilo, o tienen R^1 y R^2 que forman juntos -C(C(O)N(CH$_3$)$_2$)(CH$_2$)$_3$-.

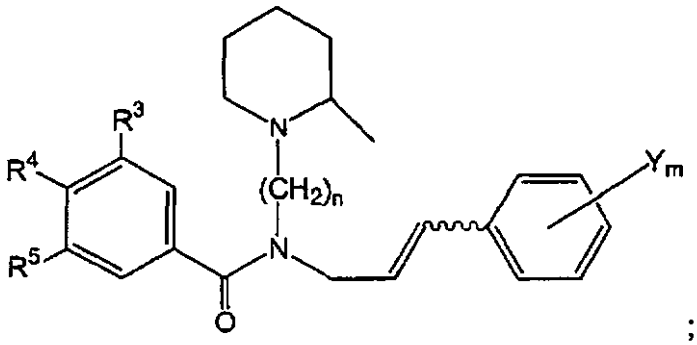
En otra realización, Z en combinación con R^1 y R^2 forma un anillo de 5 miembros que incluye nitrógeno y opcionalmente que incluye uno o más heteroátomos adicionales. En esta realización, n es preferiblemente 1 y Z es preferiblemente –CH-. En una realización especialmente preferida de este tipo, Z en combinación con R^1 y R^2 es



en la que R^7 es preferiblemente hidrógeno, alquilo, arilo, o aralquilo.

En otra realización preferida, R^7 puede ser un grupo bencilo o fenilo halogenado. En una realización adicional, R^7 es preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, bencilo, o para-fluoro-fenilo.

En otras realizaciones, los compuestos activos de la presente invención tienen la estructura general (II):



en la que

m es un número entero de 1 a 5;

cada Y que sustituye el anillo bencilo se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido con halo, alquileno, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquileno, halógeno, heterocíclico, arilo, arileno, heteroarileno, hidroxi, y alcoxi;

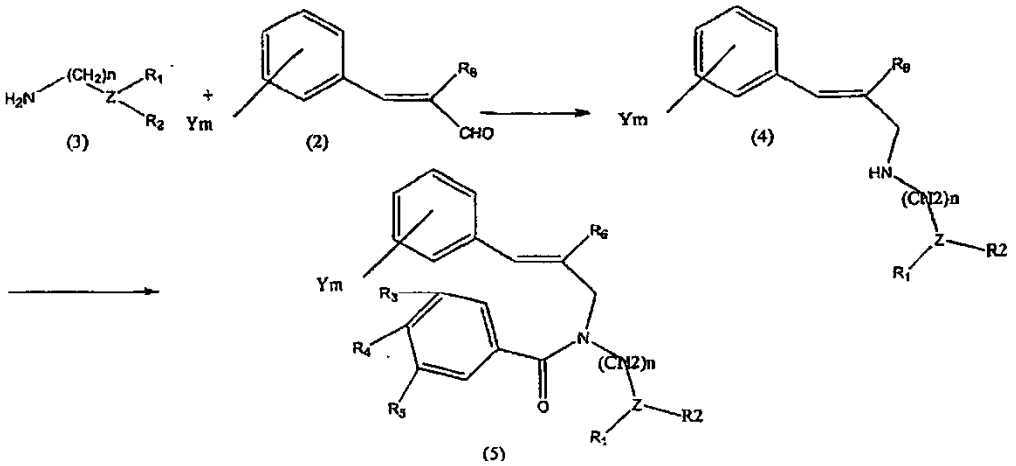
n es 1, 2 ó 3; y

R^3, R^4, y R^5 se seleccionan, cada uno independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido con halo, alquileno, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquileno, heterocíclico, arilo, arileno, heteroarilo, heteroarileno, hidroxi, alcoxi, y ariloxi.

Como en la estructura (I) anterior, el enlace ondulado que conecta la olefina al anillo fenílico sustituido significa que el anillo puede estar en *cis* o *trans*.

En otra realización, los compuestos preferidos pueden tener la estructura general (II), en la que n es 3. En otra realización, los compuestos preferidos pueden tener la estructura general (II), en la que R^3, R^4 y R^5 están sustituidos como se describe para la estructura (I) anterior. En el presente, los compuestos especialmente preferidos tienen la estructura general (II), en la que R^3, R^4 y R^5 son alcoxi o metoxi.

Aunque se pueden usar muchas rutas sintéticas conocidas por los expertos ordinarios en la materia para sintetizar los compuestos activos de la presente invención, en el Esquema I a continuación se proporciona un método de síntesis general.



Esquema I

En el Esquema I, el aldehído (2) sufre una reacción de condensación con amina primaria (3) vía aminación reductora. Las aminas primarias adecuadas están comercialmente disponibles de Aldrich, Milwaukee, WI, por ejemplo, o se pueden sintetizar mediante rutas químicas conocidas por los expertos ordinarios en la materia.

La reacción de aminación se puede llevar a cabo con un agente reductor en cualquier disolvente adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, tetrahidrofurano (THF), diclorometano, o metanol, para formar el producto intermedio (4). Los agentes reductores adecuados para la reacción de condensación incluyen, pero no se limitan a, cianoborohidruro de sodio (como se describe en Mattson, et al., J. Org. Chem. 1990, 55, 2552 y Barney, et al., Tetrahedron Lett. 1990, 31, 5547); triacetoxiborohidruro de sodio (como se describe en Abdel-Magid, et al., Tetrahedron Lett. 31:5595 (1990)); borohidruro de sodio (como se describe en Dribble; Nutaitis Synthesis. 709 (1987)); pentacarbonilhierro y KOH alcohólico (como se describe en Watabane, et al., Tetrahedron Lett.1879 (1974)); y BH3-piridina (como se describe en Pelter, et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:717 (1984)).

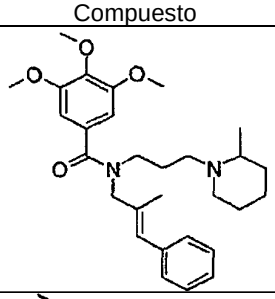
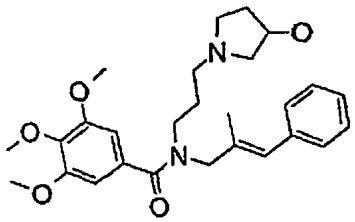
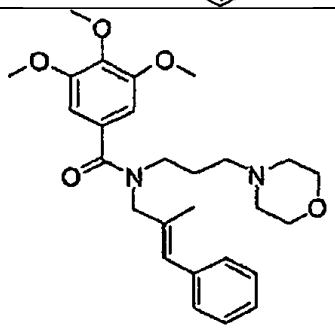
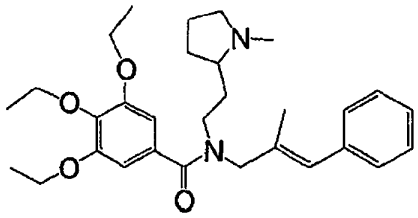
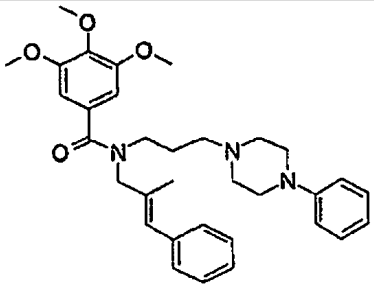
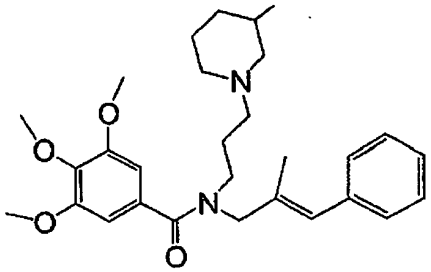
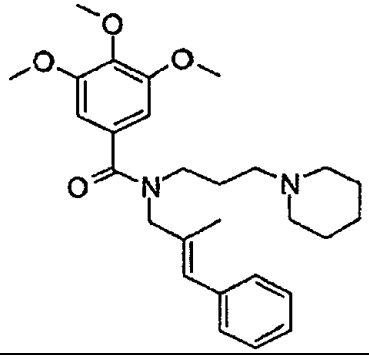
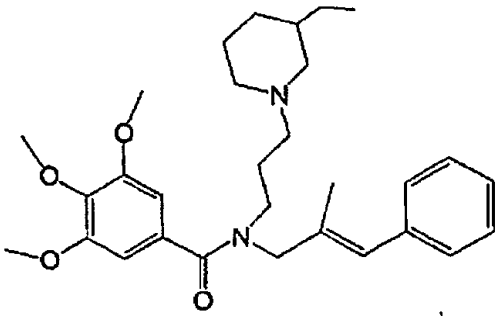
La transformación del producto intermedio (4) en el compuesto (5) se puede llevar a cabo en cualquier disolvente adecuado, tal como tetrahidrofurano o diclorometano, con un cloruro de acilo adecuadamente sustituido en presencia de una base. Se prefieren las bases de aminas terciarias. Las bases especialmente preferidas incluyen trietilamina y base de Hunig.

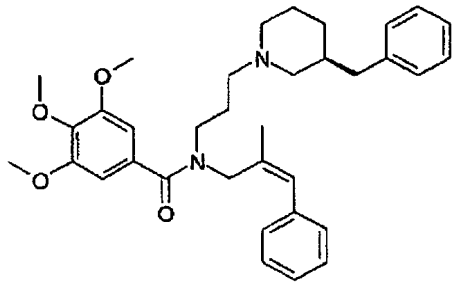
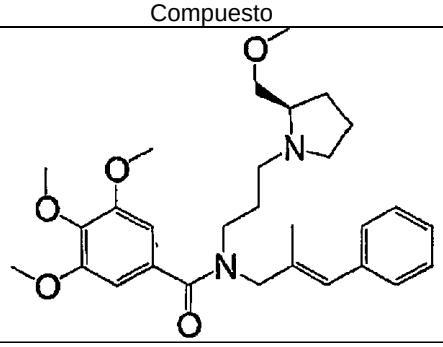
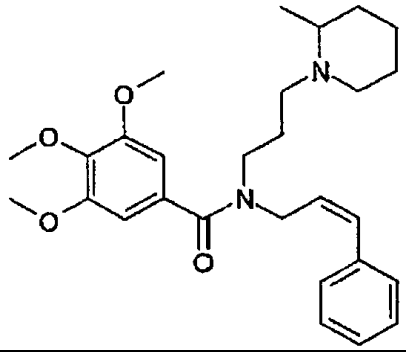
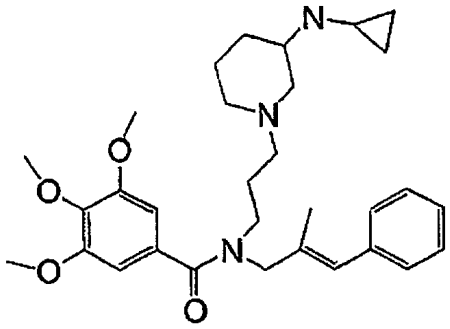
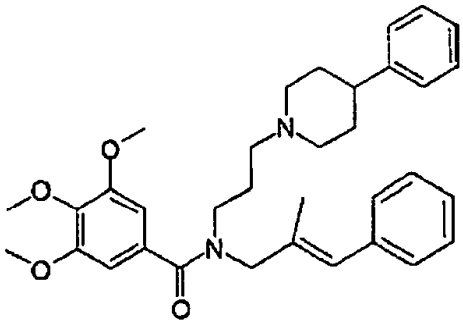
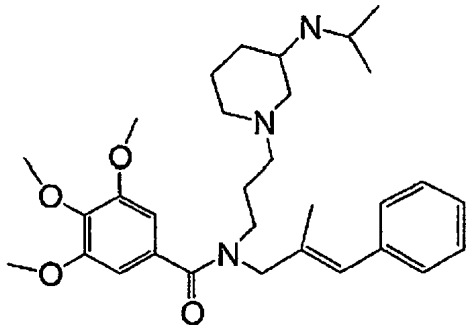
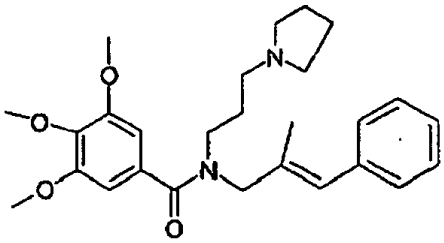
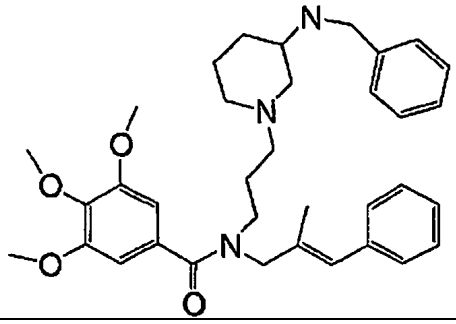
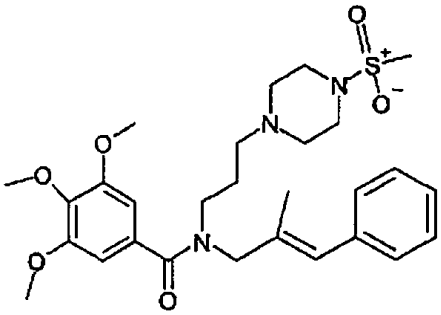
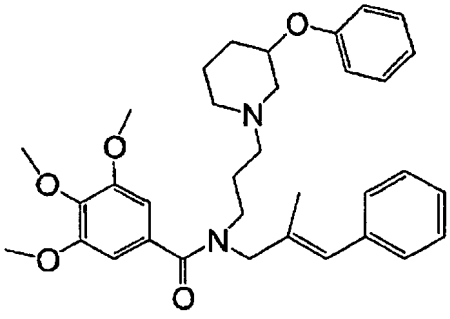
Como alternativa, la transformación del producto intermedio (4) en el compuesto (5) también se puede obtener con un agente de acoplamiento adecuado, tal como 1-etil-3-(3-dimetilbutilpropil)carbodiimida o diciclohexil-carbodiimida (como se describe en B. Neises y W. Steglich, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 17:522 (1978)), en presencia de un catalizador, tal como 4-N,N-dimetilamino-piridina, o en presencia de hidroxibenzotriazol (como se describe en K. Horiki, Synth. Commun. 7:251).

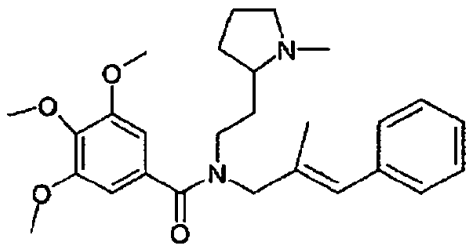
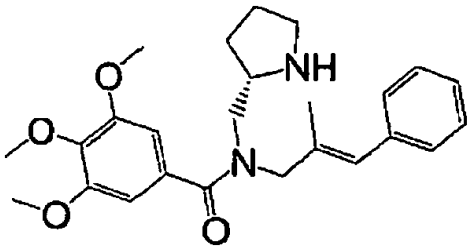
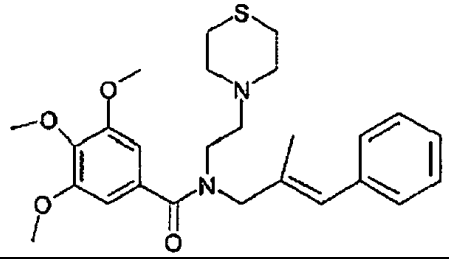
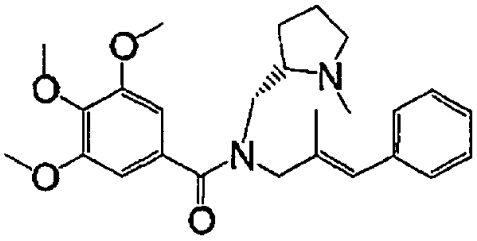
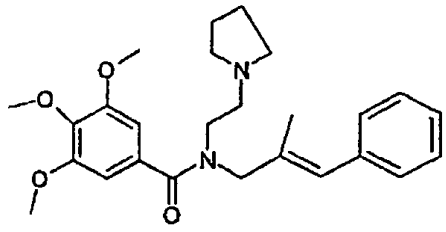
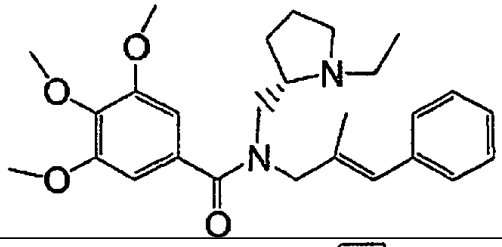
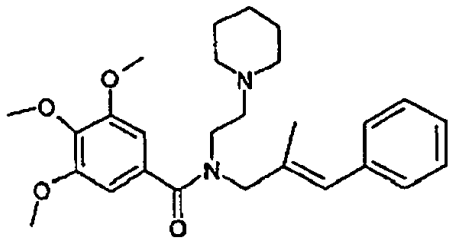
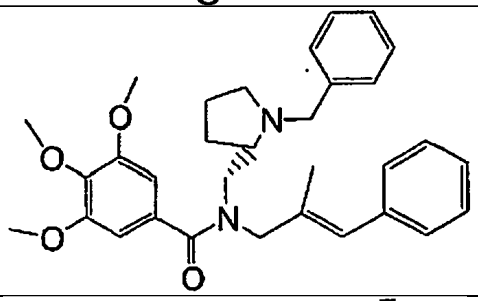
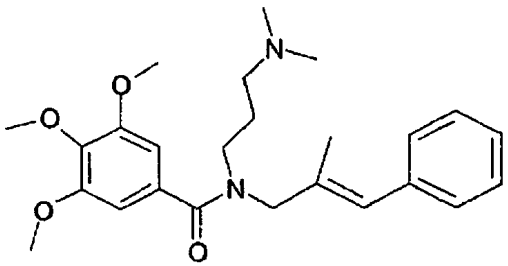
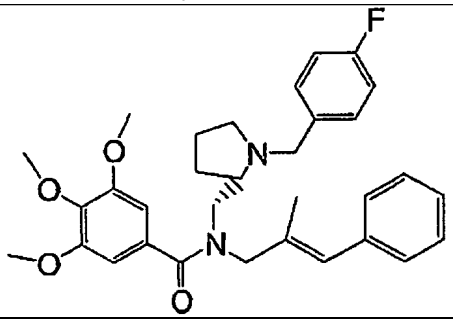
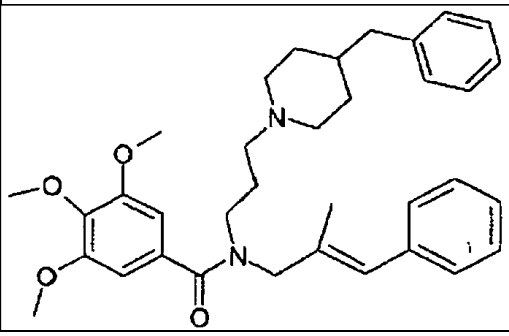
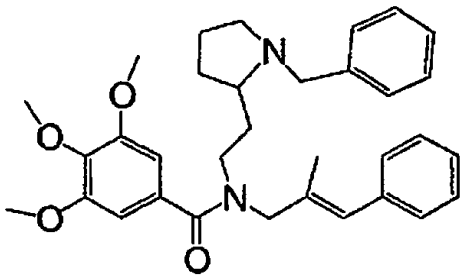
Para demostrar que los compuestos descritos anteriormente son antagonistas útiles para las quimiocinas SDF-1 e I-TAC, los compuestos se cribaron *in vitro* para determinar su capacidad para desplazar SDF-1 e I-TAC del receptor de CCX-CKR2 a múltiples concentraciones. Los compuestos se combinaron con células de glándula mamaria que expresan sitios del receptor de CCX-CKR2 en presencia de la quimiocina SDF-1 marcada con ^{125}I y/o ^{125}II-TAC. Entonces se determinó con el proceso de cribado la capacidad de los compuestos para desplazar la SDF-1 o I-TAC marcada de los sitios del receptor de CCX-CKR2 a múltiples concentraciones.

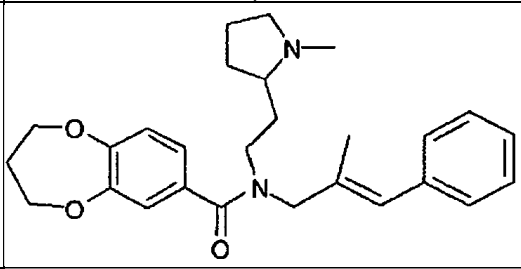
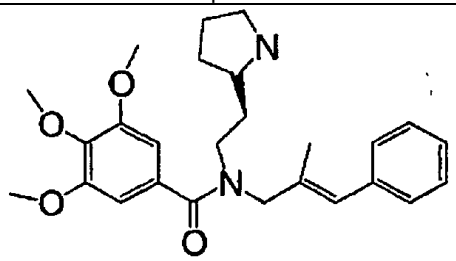
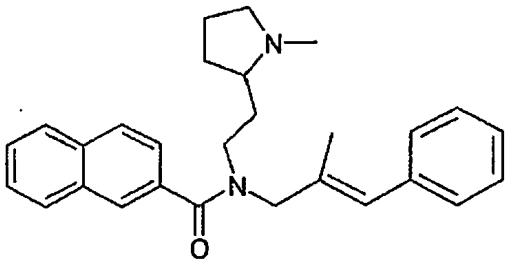
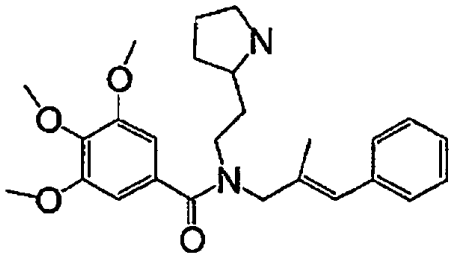
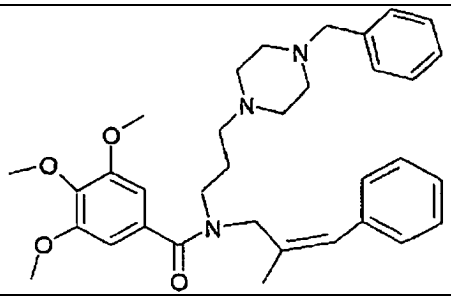
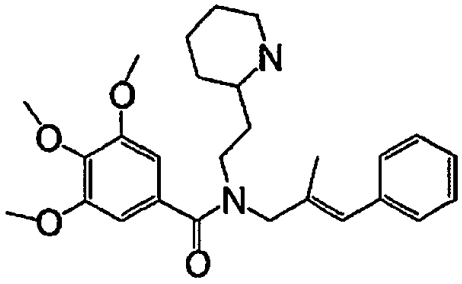
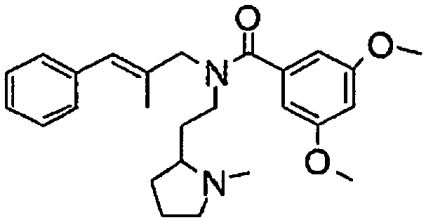
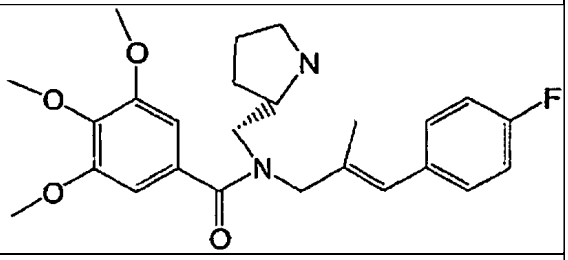
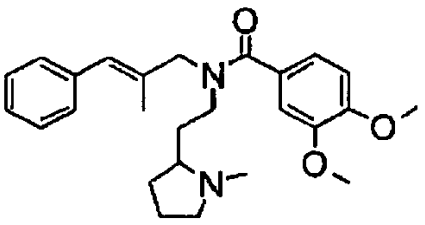
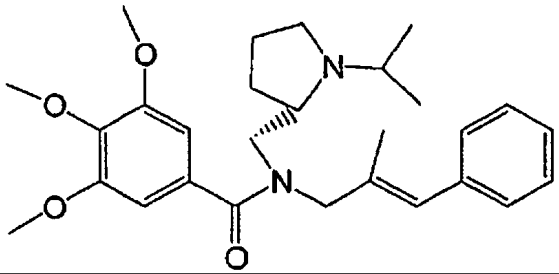
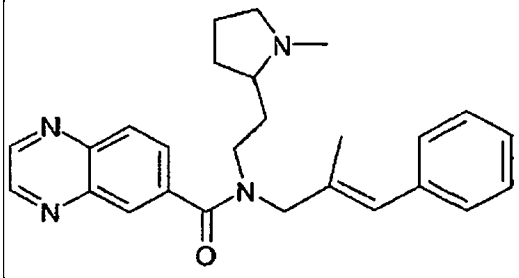
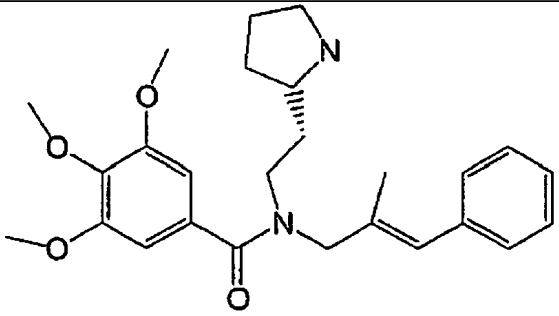
Los compuestos que se consideraron antagonistas eficaces de SDF-1 y I-TAC fueron capaces de desplazar al menos 50% de la quimiocina SDF-1 y/o I-TAC del receptor de CCX-CKR2 a concentraciones de o inferiores a 1,1 micromolar (μM), y más preferiblemente a concentraciones de o inferiores a 300 nanomolar (nM). En algunos casos, es deseable que los compuestos puedan desplazar al menos 50% de la SDF-1 y/o I-TAC del receptor de CCX-CKR2 a concentraciones de o por debajo de 200 nM. En la Tabla I a continuación se reproducen compuestos ejemplificativos que cumplen estos criterios.

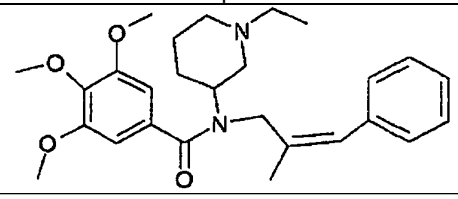
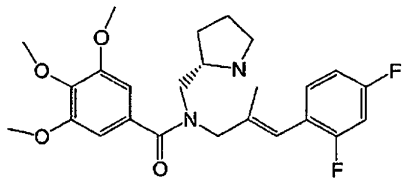
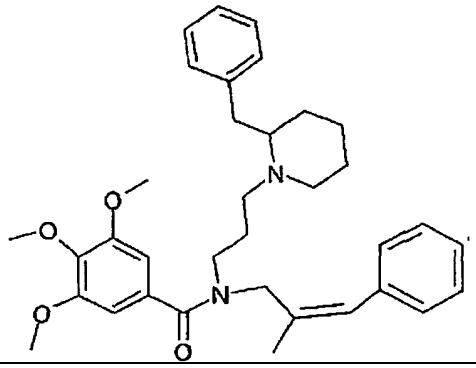
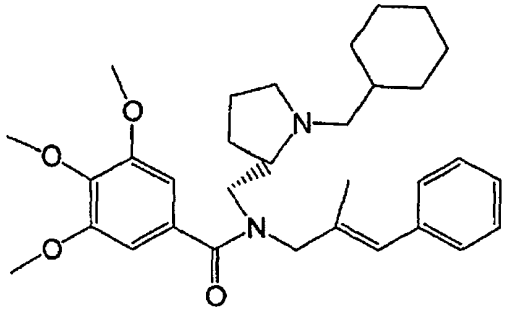
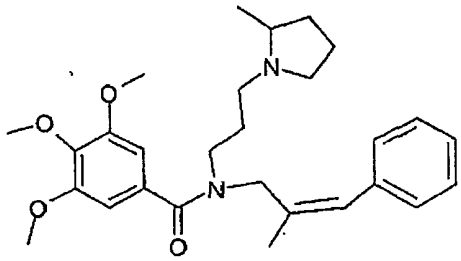
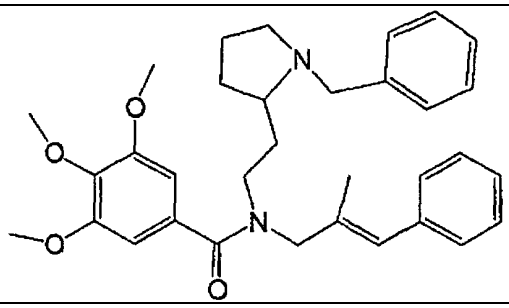
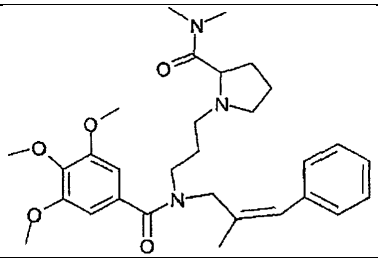
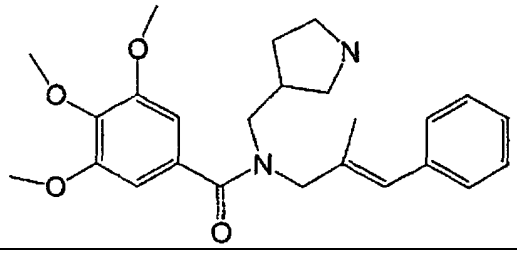
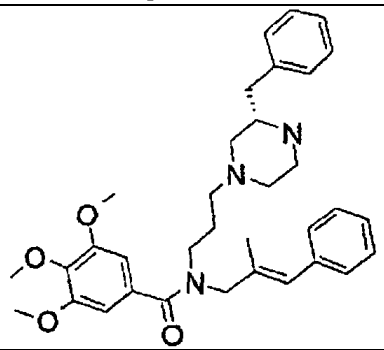
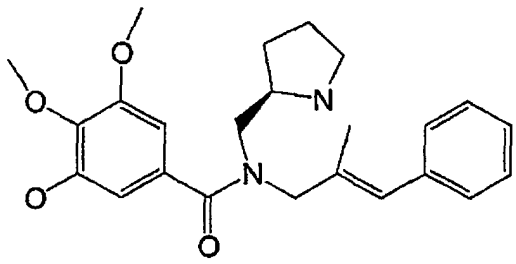
TABLA 1

nº	Compuesto	nº	Compuesto
1		27	
2		28	
3		29	
4		30	

nº	Compuesto	nº	Compuesto
5		31	
6		32	
7		33	
8		34	
9		35	

nº	Compuesto	nº	Compuesto
10		36	
11		37	
12		38	
13		39	
14		40	
15		41	

nº	Compuesto	nº	Compuesto
16		42	
17		43	
18		44	
19		45	
20		46	
21		47	

nº	Compuesto	nº	Compuesto
22		48	
23		49	
24		50	
25		51	
26		52	

C. Ensayos de alto rendimiento en fase sólida y soluble

En los ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible cribar hasta varios miles de moduladores o ligandos diferentes en un solo día. En particular, cada pocillo de una placa de microtitulación se puede usar para llevar a cabo un ensayo distinto frente a un modulador potencial seleccionado, o, si se van a observar los efectos de la concentración o del tiempo de incubación, cada 5-10 pocillos pueden ensayar un único modulador. De este modo, una única placa de microtitulación estándar puede analizar alrededor de 100 (*por ejemplo*, 96 moduladores). Si se usan placas de 1.536 pocillos, entonces una única placa puede analizar fácilmente de alrededor de 100 a alrededor de 1.500 compuestos diferentes. Es posible analizar varias placas diferentes por día; son posibles cribados de ensayo de hasta alrededor de 6.000-20.000 compuestos diferentes usando los sistemas integrados de la invención. Más recientemente, se han desarrollado enfoques microfluídicos para la manipulación de reactivos.

La invención proporciona ensayos *in vitro* para identificar, en un formato de alto rendimiento, compuestos que pueden modular la función o actividad de CCX-CKR2. Las reacciones de control que miden la actividad de CCX-CKR2 de la célula en una reacción que no incluye un modulador potencial son opcionales, ya que los ensayos son muy uniformes. Tales reacciones de control opcionales, sin embargo, incrementan la fiabilidad del ensayo.

En algunos ensayos será deseable tener controles positivos para asegurar que los componentes de los ensayos funcionan apropiadamente. Son apropiados al menos dos tipos de controles positivos. En primer lugar, se puede incubar un activador o ligando conocido de CCX-CKR2 con una muestra del ensayo, y el incremento resultante en la señal que resulta de una actividad incrementada de CCX-CKR2 (por ejemplo, como se determina según los métodos aquí). En segundo lugar, se puede añadir un inhibidor o antagonista de CCX-CKR2, y se puede detectar de forma similar la disminución resultante en la señal para la actividad del receptor de quimiocina. Se apreciará que los moduladores también se pueden combinar con activadores o inhibidores para encontrar moduladores que inhiben el incremento o disminución que está provocado de otro modo por la presencia del modulador conocido de CCX-CKR2.

IV. Expresión de CCX-CKR2 en un sujeto

El CCX-CKR2 se expresa en un sujeto, incrementando de ese modo la expresión de CCX-CKR2. Como alternativa, polinucleótidos inhibidores, incluyendo, por ejemplo, siRNA o secuencias antisentido, se pueden expresar *in vitro* o *in vivo* para inhibir la expresión de CCX-CKR2. En algunos casos, un polinucleótido que codifica CCX-CKR2 se introduce en una célula *in vitro*, y la célula se introduce subsiguientemente en un sujeto. En algunos de estos casos, las células se aíslan primeramente del sujeto y después se reintroducen en el sujeto después de que se introduce el polinucleótido. En otros casos, los polinucleótidos que codifican CCX-CKR2 se introducen directamente en las células en el sujeto *in vivo*.

En algunos casos, los polipéptidos que codifican CCX-CKR2 se introducen en células a partir de: (i) un tejido de interés, (ii) células exógenas introducidas en el tejido, o (iii) células vecinas que no están en el tejido. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la invención se introducen en células endoteliales. El tejido con el que están asociadas las células endoteliales es cualquier tejido en el que se desea potenciar la migración o expansión de endotelios.

Para introducir en células de mamíferos o en tejidos diana ácidos nucleicos que codifican polipéptidos manipulados de la invención, se pueden usar métodos convencionales de transferencia génica a base de virus o no basados en virus. Tales métodos se pueden usar para administrar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención (por ejemplo, CCX-CKR2) a células *in vitro*. En algunos casos, los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención se administran para usos de terapia génica *in vivo* o *ex vivo*. Los sistemas de suministro de vectores no víricos incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo, y ácido nucleico complejado con un vehículo de suministro tal como un liposoma. Los sistemas de suministro de vectores víricos incluyen virus de ADN y ARN, que tienen genomas exómicos o integrados tras el suministro a la célula. Para un repaso de los procedimientos de terapia génica, véanse Anderson, Science 256:808-813 (1992); Nabel y Felgner, TIBTECH 11:211-217 (1993); Mitani y Caskey, TIBTECH 11:162-166 (1993); Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993); Miller, Nature 357:455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer y Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., en Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler y Böhm (eds) (1995); y Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994).

Los métodos de suministro no vírico de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos manipulados mediante ingeniería descritos en la presente memoria incluyen lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, conjugados de policatión o lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, y captación de ADN potenciada por agentes. La lipofección se describe, por ejemplo, en las patentes US nº 5.049.386, US nº 4.946.787; y US nº 4.897.355), y los reactivos de la lipofección se venden comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para la lipofección de polinucleótidos mediante reconocimiento de receptor eficiente incluyen aquellos de Felgner, documentos WO 91/17424, WO 91/16024. El suministro puede ser a las células (administración *ex vivo*) o a tejidos diana (administración *in vivo*).

La preparación de complejos de lípido:ácido nucleico, incluyendo liposomas diana tales como complejos inmunolipídicos es bien conocida por el experto en la materia (*véanse, por ejemplo*, Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); patentes U.S. n^{os} 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, y 4.946.787).

El uso de sistemas a base de virus de ARN o de ADN para el suministro de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos manipulados mediante ingeniería descritos en la presente memoria aprovecha procedimientos muy evolucionados para dirigir un virus hacia células específicas en el cuerpo y hacer circular la carga vírica hacia el núcleo. Los vectores víricos se pueden administrar directamente a los pacientes (*in vivo*), o se pueden usar para

tratar células *in vitro* y las células modificadas se administran a los pacientes (*ex vivo*). Los sistemas convencionales a base de virus para el suministro de los polipéptidos descritos en la presente memoria podrían incluir vectores retrovíricos, lentivíricos, adenovíricos, adenoasociados y de virus del herpes simple, para la transferencia génica. Los vectores víricos son actualmente el método más eficiente y versátil de transferencia génica en células y tejidos diana. La integración en el genoma del hospedante es posible con métodos de transferencia génica a base de retrovirus, lentivirus, y virus adenoasociados, dando como resultado a menudo una expresión a largo plazo del transgén insertado. Adicionalmente, se han observado eficiencias de transducción elevadas en muchos tipos celulares y tejidos diana diferentes.

El tropismo de un retrovirus se puede alterar incorporando proteínas de cubierta extrañas, expandiendo la población diana potencial de células diana. Los vectores lentivíricos son vectores retrovíricos que son capaces de transducir o infectar células que no se dividen, y producen típicamente títulos víricos elevados. Por lo tanto, la selección de un sistema de transferencia génico retrovírico dependería del tejido diana. Los vectores retrovíricos comprenden repeticiones terminales largas que actúan en cis con capacidad de empaquetamiento de hasta 6-10 kb de secuencia extraña. Las LTR que actúan en cis mínimas son suficientes para la replicación y empaquetamiento de los vectores, que entonces se usan para integrar el gen terapéutico en la célula diana para proporcionar expresión transgénica permanente. Los vectores retrovíricos ampliamente usados incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), el virus de la leucemia del mono gibbon (GaLV), el virus de inmunodeficiencia de simio (SIV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y sus combinaciones (*véanse, por ejemplo*, Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-2739 (1992); Johann et al., J. Virol. 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., Virol. 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374-2378 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); documento PCT/US94/05700).

En aplicaciones en las que se prefiere la expresión transitoria de los polipéptidos descritos en la presente memoria, típicamente se usan sistemas a base de adenovirus. Los vectores a base de adenovirus son capaces de una eficiencia muy elevada de la transducción en muchos tipos celulares, y no requieren la división celular. Con tales vectores, se han obtenido títulos y niveles de expresión elevados. Este vector se puede producir en grandes cantidades en un sistema relativamente simple. Los vectores de virus adenoasociados ("AAV") también se usan para transducir células con ácidos nucleicos diana, por ejemplo en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos, y para los principales de terapia génica *in vivo* y *ex vivo* (*véanse, por ejemplo*, West et al., Virology 160:38-47 (1987); patente US nº 4.797.368; documento WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994)). La construcción de vectores de AAV recombinantes se describe en un número de publicaciones, incluyendo la patente US nº 5.173.414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat y Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); y Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989).

Los pLASN y MFG-S son ejemplos de vectores retrovíricos que se han usado en ensayos clínicos (Dunbar et al., Blood 85:3048-305 (1995); Kohn et al., Nat. Med. 1:1017-102 (1995); Malech et al., PNAS 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN fue el primer vector terapéutico usado en un ensayo de terapia génica (Blaese et al., Science 270:475-480 (1995)). Se han observado eficiencias de la transducción de 50% o más para vectores empaquetados MFG-S (Ellem et al., Immunol Immunother. 44(1):10-20 (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. 1:111-2 (1997).

Los vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) son una alternativa prometedora de los sistemas de suministro génico que se basan en el virus parvovirus adenoasociado de tipo 2 defectuoso y no patógeno. Todos los vectores derivan de un plásmido que retiene sólo las repeticiones terminales invertidas de 145 pb del AAV que flanquean el casete de expresión transgénica. La transferencia génica eficiente y el suministro transgénico estable debido a la integración en los genomas de la célula transducida son rasgos claves para este sistema de vector (Wagner et al., Lancet 351:9117 1702-3 (1998), Kearns et al., Gene Ther. 9:748-55 (1996)).

Los vectores adenovíricos (Ad) recombinantes deficientes en la replicación se pueden manipular mediante ingeniería de manera que un transgén sustituye los genes E1a, E1b, y E3 del Ad; subsiguientemente, el vector defectuoso en la replicación se propaga en células 293 humanas que suministran una función génica suprimida en trans. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos *in vivo*, incluyendo células diferenciadas que no se dividen, tales como las encontradas en los tejidos hepático, renal y del sistema muscular. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad portadora. Un ejemplo del uso de un vector Ad en un ensayo clínico implicado en terapia polinucleotídica para inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)). Otros ejemplos del uso de vectores adenovíricos para la transferencia génica en ensayos clínicos incluyen Rosenecker et al., Infection 24:1 5-10 (1996); Sterman et al., Hum. Gene Ther. 9:7 1083-1089' (1998); Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2:205-18 (1995); Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5:597-613 (1997); Topf et al., Gene Ther. 5:507-513 (1998); Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998).

Las células de empaquetamiento se usan para formar partículas víricas que son capaces de infectar una célula hospedante. Tales células incluyen células 293, con adenovirus de empaquetamiento, y células ψ2 o células PA317 con retrovirus de empaquetamiento. Los vectores víricos usados en terapia génica se generan habitualmente mediante la estirpe celular productora que empaqueta un vector de ácido nucleico en una partícula vírica. Los vectores contienen típicamente las secuencias víricas mínimas requeridas para el empaquetamiento y la integración subsiguiente en un hospedante, sustituyéndose otras secuencias víricas por un casete de expresión para la proteína

a expresar. Las funciones víricas perdidas se suministran en *trans* mediante la estirpe celular de empaquetamiento. Por ejemplo, los vectores de AAV usados en terapia génica sólo poseen típicamente secuencias de ITR procedentes del genoma de AAV, que se requieren para el empaquetamiento e integración en el genoma del hospedante. El ADN vírico se empaqueta en una estirpe celular, que contiene un plásmido auxiliar que codifica los otros genes de AAV, a saber, *rep* y *cap*, pero que carece de las secuencias de ITR. La estirpe celular también se infecta con adenovirus como un auxiliar. El virus auxiliar promueve la replicación del vector de AAV y la expresión de los genes de AAV a partir del plásmido auxiliar. El plásmido auxiliar no está empaquetado en cantidades significativas debido a la falta de las secuencias de ITR. La contaminación con adenovirus se puede reducir, por ejemplo, mediante tratamiento térmico, al que el adenovirus es más sensible que AAV.

En muchas aplicaciones de terapia génica es deseable que el vector de terapia génica sea suministrado con un grado elevado de especificidad a un tipo de tejido particular. Un vector vírico se modifica típicamente para tener una especificidad por un tipo celular dado expresando un ligando como una proteína de fusión con una proteína de cubierta vírica en la superficie exterior de los virus. El ligando se escoge para que tenga afinidad por un receptor que se sabe que está presente en el tipo celular de interés. Por ejemplo, Han et al., PNAS 92:9747-9751 (1995), dieron a conocer que el virus de la leucemia murina de Moloney se puede modificar para expresar heregulina humana fusionada con gp70, y el virus recombinante infecta ciertas células de cáncer de mama humano que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. Este principio se puede extender a otros pares de virus que expresan una proteína de fusión con ligando y una célula diana que expresa un receptor. Por ejemplo, el fago filamentoso se puede manipular mediante ingeniería para presentar fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, FAB o Fv) que tienen afinidad de unión específica por virtualmente cualquier receptor celular escogido. Aunque la descripción anterior se aplica principalmente a vectores víricos, se pueden aplicar los mismos principios a vectores no víricos. Tales vectores se pueden manipular mediante ingeniería para contener secuencias de captación específicas que se piensa que favorecen la captación mediante células diana específicas.

Los vectores de la terapia génica se pueden suministrar *in vivo* mediante administración a un paciente individual, típicamente mediante administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica, o infusión intracraneal) o aplicación tópica, como se describe a continuación. Como alternativa, los vectores se puede suministrar a las células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia tisular) o células madre hematopoyéticas de donantes universales, seguido de la reimplantación de las células en un paciente, habitualmente tras la selección de las células que han incorporado el vector.

La transfección celular *ex vivo* para diagnóstico, investigación, o para terapia génica (por ejemplo, vía reinfusión de las células transfectadas en el organismo hospedante) es bien conocida por los expertos en la materia. Se describe en la presente memoria que las células se aíslan del organismo sujeto, se transfectan con un ácido nucleico (gen o ADNc) que codifica un polipéptido de la invención, y se reinfunde nuevamente en el organismo sujeto (por ejemplo, paciente). Diversos tipos celulares adecuados para la transfección *ex vivo* son bien conocidos para los expertos en la materia (*véase, por ejemplo*, Freshney et al., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique (3ª ed. 1994)) y las referencias citadas, para una discusión sobre cómo aislar y cultivar células procedentes de pacientes).

Se describe en la presente memoria que las células madre se usan en procedimientos *ex vivo* para la transfección celular y terapia génica. La ventaja de usar células madre es que se pueden diferenciar en otros tipos celulares *in vitro*, o se pueden introducir en un mamífero (tal como el donante de las células) en el que se injertarán en la médula ósea. Se conocen métodos para diferenciar células CD34+ *in vitro* en tipos de células inmunitarias clínicamente importantes usando citocinas tales como GM-CSF, IFN-γ y TNF-α (*véase* Inaba et al., J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)).

Las células madre se aíslan para la transducción y diferenciación usando métodos conocidos. Por ejemplo, las células madre se aíslan de células de médula ósea inmunoadsorbiendo las células de médula ósea con anticuerpos que se unen a células indeseadas, tales como CD4+ y CD8+ (células T), CD45+ (células panB), GR-1 (granulocitos), y lad (células diferenciadas que presentan antígenos) (*véase* Inaba et al., J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)).

Los vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen ácidos nucleicos terapéuticos también se pueden administrar directamente al organismo para la transducción de células *in vivo*. Como alternativa, se puede administrar ADN desnudo. La administración es mediante cualquiera de las vías usadas normalmente para introducir una molécula en contacto final con células de la sangre o de tejidos. Los métodos adecuados para administrar tales ácidos nucleicos están disponibles y son bien conocidos para los expertos en la materia, y aunque se puede usar más de una vía para administrar una composición particular, a menudo una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte mediante la composición particular que se administra, así como mediante el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención, como se describe a continuación (*véase, por ejemplo*, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., 1989).

V. Diagnóstico y pronóstico

La presente invención proporciona métodos para detectar una célula cancerosa, incluyendo métodos para proporcionar un pronóstico o diagnóstico de cáncer. Como se demuestra en la presente memoria, CCX-CKR2 se expresa en casi cualquier célula cancerosa ensayada hasta la fecha, mientras que la expresión normal (no cancerosa) de CCX-CKR2 parece estar limitada a las células renales y algunas células del cerebro, así como en ciertas etapas de desarrollo del hígado fetal. Por lo tanto, la expresión de CCX-CKR2 en una célula, y en particular en una célula no fetal y/o una célula distinta de una célula renal o cerebral, indica la probable presencia de una célula cancerosa. En algunos casos, las muestras que contienen células que expresan CCX-CKR2 se confirman para la presencia de células cancerosas usando otros métodos conocidos en la técnica.

Según todavía otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para seleccionar un curso de tratamiento de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene cáncer. Los métodos incluyen obtener del sujeto una muestra biológica, poner en contacto la muestra con anticuerpos o sus fragmentos que se unen a antígenos, que se unen específicamente a CCX-CKR2, detectar la presencia o ausencia de la unión del anticuerpo, y seleccionar un curso de tratamiento apropiado al cáncer del sujeto. En algunos casos, el tratamiento es la administración de antagonistas de CCX-CKR2 al sujeto.

Los métodos de detección que usan agentes que se unen a una proteína son bien conocidos, e incluyen, por ejemplo, diversos inmunoensayos, citometría de flujo, etc. Usando citometría de flujo, se pueden identificar células que expresan un antígeno específico de interés en una población mixta de células. De forma breve, se deja que las células reaccionen con un anticuerpo específico para la proteína de interés (por ejemplo, CCX-CKR2). El anticuerpo puede estar marcado fluorescentemente (método directo de tinción), o si no está marcado, se puede etiquetar fluorescentemente un segundo anticuerpo que reacciona con el primero (método indirecto de tinción). Las células se hacen pasar entonces a través de un instrumento que puede detectar la señal fluorescente. Las células se aspiran y se convierten en una suspensión celular única. Esta suspensión celular se hace pasar mediante un láser que excita el anticuerpo marcado con fluorocromo, que se une a las células, y se adquiere este dato. Las células que se encuentra que son brillantes (es decir, reaccionan con el anticuerpo marcado fluorescentemente) expresan la proteína de interés; las células que están apagadas (es decir, no reaccionan con el anticuerpo marcado fluorescentemente) no expresan la proteína de interés.

La presente invención proporciona métodos para diagnosticar enfermedades humanas, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer, por ejemplo, carcinomas, gliomas, mesoteliomas, melanomas, linfomas, leucemias, adenocarcinomas, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, leucemia, linfoma, cáncer de próstata, y linfoma de Burkitt, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, cáncer del esófago, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer hepatobiliar, cáncer de la vesícula biliar, cáncer del intestino delgado, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de la vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer uretral, cáncer testicular, cáncer de cuello uterino, cáncer vaginal, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer adrenal, cáncer endocrino pancreático, cáncer carcinoide, cáncer de huesos, cáncer de piel, retinoblastomas, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (*véase*, CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE (DeVita, V.T. et al. eds 1997), para cánceres adicionales); así como disfunción cerebral y neuronal, tal como enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple; disfunción renal; artritis reumatoide; rechazo de aloinjerto cardíaco; aterosclerosis; asma; glomerulonefritis; dermatitis de contacto; enfermedad inflamatoria del intestino; colitis; psoriasis; lesión por reperfusión; así como otros trastornos y enfermedades descritos aquí. En algunas realizaciones, el sujeto no presenta sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica o linfoma de efusión primaria asociado a SIDA. Como se proporciona en la presente memoria, incluyendo en los ejemplos, las células de tejidos normales y enfermos se pueden distinguir basándose en la reactividad frente a un anticuerpo monoclonal anti-CCX-CKR2 o SDF-1 e I-TAC. Por ejemplo, las células cancerosas se detectan detectando en una célula un receptor de quimiocina para el cual SDF-1α e I-TAC compiten por la unión.

Además, se pueden detectar diferencias en la unión a ligando entre receptores de quimiocinas, y tales diferencias se pueden usar para detectar células que expresan CCX-CKR2. Por ejemplo, ningún otro receptor de quimiocina tiene tanto SDF1 como I-TAC como ligandos. La unión a quimiocinas se puede determinar usando muestras tisulares (por ejemplo, biopsias), o se puede monitorizar directamente en un tejido *in situ* (por ejemplo, usando formación de imágenes de quimiocinas radiomarcadas).

También se pueden usar inmunoensayos para analizar cualitativa o cuantitativamente CCX-CKR2. En Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988), se puede encontrar un repaso general de la tecnología aplicable. Como alternativa, para detectar el receptor también se pueden usar moléculas que no son anticuerpos que tienen afinidad por CCX-CKR2.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con una proteína de interés son conocidos por los expertos en la materia (*véanse, por ejemplo* Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2ª ed. 1986); y Kohler y Milstein Nature, 256:495-497 (1975)). Tales técnicas incluyen la

preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos a partir de librerías de anticuerpos recombinantes en vectores fágicos o similares. Por ejemplo, a fin de producir antisueros para uso en un inmunoensayo, la proteína de interés, o un fragmento antigénico de la misma, se aísla como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, una proteína recombinante se produce en una estirpe celular transformada. Una cepa endogámica de ratones, ratas, cobayas o conejos se inmuniza con la proteína usando un adyuvante estándar, tal como adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización estándar. Como alternativa, se puede usar como inmunógeno un péptido sintético derivado de las secuencias descritas aquí y conjugado a una proteína portadora. Una opción adicional es usar una célula que expresa la proteína o una fracción membránica o liposoma que comprende CCX-CKR2 o su fragmento como un antígeno. Los anticuerpos producidos frente a la célula, fracción de membrana o liposoma se pueden seleccionar entonces en busca de su capacidad para unirse a la proteína.

Los sueros policlonales se recogen y se titulan frente al inmunógeno en un inmunoensayo, por ejemplo un inmunoensayo en fase sólida con el inmunógeno inmovilizado en un soporte sólido. Los antisueros policlonales con un título de 10^4 o mayor se seleccionan y ensayan en busca de su reactividad cruzada frente a diferentes, y algunas veces, proteínas homólogas, usando un inmunoensayo de unión competitiva. Los anticuerpos monoclonales y policlonales específicos y los antisueros se unirán habitualmente con una K_D de al menos alrededor de 0,1 mM, más habitualmente al menos alrededor de 1 μM, preferentemente al menos de aproximadamente 0,1 μM o mejor, y todavía más preferentemente de 0,01 μM o mejor, a CCX-CKR2.

Para la preparación de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos recombinantes, monoclonales, o policlonales, se pueden usar muchas técnicas conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., p. 77-96 en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); y Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2ª ed. 1986)). Los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de interés se pueden clonar a partir de una célula, por ejemplo los genes que codifican un anticuerpo monoclonal se pueden clonar a partir de un hibridoma y se pueden usar para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. También se pueden obtener librerías génicas que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas o células plasmáticas. Las combinaciones al azar de los productos génicos de las cadenas pesadas y ligeras generan un gran conjunto de anticuerpos con diferente especificidad antigénica (véase, por ejemplo, Kuby, Immunology (3ª ed. 1997)). Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios o anticuerpos recombinantes (patente US nº 4.946.778, patente US nº 4.816.567) se pueden adaptar para producir anticuerpos frente a los polipéptidos descritos aquí. También, se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados o humanos (véanse, por ejemplo, las patentes US nºs 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)). Como alternativa, se puede usar la tecnología de presentación de fagos para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véanse, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992)). Los anticuerpos también se pueden hacer biespecíficos, es decir, capaces de reconocer dos antígenos diferentes (véanse, por ejemplo, documento WO 93/08829, Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991); y Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)). Los anticuerpos también pueden ser heteroconjugados, por ejemplo los anticuerpos unidos covalentemente, o inmunotoxinas (véanse, por ejemplo, patente US nº 4.676.980, documentos WO 91/00360; WO 92/200373; y EP 03089).

Los métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Tales anticuerpos son útiles tanto para aplicaciones de detección como terapéuticas. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo restos importados, que se toman típicamente de un dominio variable importado. La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (véanse, por ejemplo, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)), sustituyendo CDR o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente U.S. nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

V. Métodos de tratamiento, administración y composiciones farmacéuticas

Los moduladores de CCX-CKR2 (por ejemplo antagonistas o agonistas) se pueden administrar directamente al sujeto mamífero para la modulación de la señalización del receptor de quimiocina *in vivo*. En algunas realizaciones, los moduladores compiten con SDF1 y/o I-TAC por la unión a CCX-CKR2. La modulación de CCX-CKR2 puede

incluir, por ejemplo, anticuerpos (incluyendo monoclonales, humanizados, u otros tipos de proteínas de unión que son conocidas en la técnica), pequeñas moléculas orgánicas, siRNA, etc.

Se describe en la presente memoria que los moduladores de CCX-CKR2 se administran a un sujeto que tiene cáncer. En algunos casos, los moduladores de CCX-CKR2 se administran para tratar cáncer, por ejemplo carcinomas, gliomas, mesoteliomas, melanomas, linfomas, leucemias, adenocarcinomas, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, leucemia, linfoma, cáncer de próstata, y linfoma de Burkitt, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, cáncer del esófago, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer hepatobiliar, cáncer de la vesícula biliar, cáncer del intestino delgado, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de la vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer uretral, cáncer testicular, cáncer de cuello uterino, cáncer vaginal, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer adrenal, cáncer endocrino pancreático, cáncer carcinoide, cáncer de huesos, cáncer de piel, retinoblastomas, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (*véase*, CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE (DeVita, V.T. et al. eds 1997), para cánceres adicionales); así como disfunción cerebral y neuronal, tal como enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple; disfunción renal; artritis reumatoide; rechazo de aloinjerto cardíaco; aterosclerosis; asma; glomerulonefritis; dermatitis de contacto; enfermedad inflamatoria del intestino; colitis; psoriasis; lesión por reperfusión; así como otros trastornos y enfermedades descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el sujeto no presenta sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica o linfoma de efusión primaria asociado a SIDA. Puesto que CCX-CKR2 se expresa a menudo en células cancerosas pero no en células no cancerosas, típicamente es deseable administrar antagonistas de CCX-CKR2 para tratar sujetos que tienen cáncer. En algunos casos, los moduladores tienen un peso molecular menor que 1.500 daltons, y en algunos casos menor que 1.000, 800, 600, 500, o 400 daltons.

La administración de los moduladores puede ser mediante cualquiera de las vías usadas normalmente para introducir un compuesto modulador en contacto final con el tejido a tratar, y es conocida por los expertos en la materia. Aunque se puede usar más de una vía para administrar una composición particular, una vía particular puede proporcionar a menudo una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte mediante la composición particular que se administra, así como mediante el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria (*véase, por ejemplo*, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed 1985)).

Los moduladores (por ejemplo, agonistas o antagonistas) de la expresión o actividad de CCX-CKR2, solos o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden obtener en formulaciones de aerosol (*es decir*, se pueden "nebulizar") para ser administrados vía inhalación. Las formulaciones en forma de aerosol se pueden colocar en propelentes aceptables a presión, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

Las formulaciones adecuadas para la administración incluyen disoluciones acuosas y no acuosas, disolución estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen a la formulación isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. En la práctica de esta invención, las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, oralmente, nasalmente, tópicamente, intravenosamente, intraperitonealmente, o intratecalmente. Las formulaciones de compuestos se pueden presentar en recipientes sellados de una sola dosis o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales. Las disoluciones y suspensiones se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos, y comprimidos del tipo previamente descrito. Los moduladores también se pueden administrar como parte de un alimento preparado o fármaco.

En algunas realizaciones, los moduladores de CCX-CKR2 de la presente invención se pueden administrar en combinación con otros agentes terapéuticos apropiados, incluyendo, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, radiación, etc. La selección de los agentes apropiados para uso en terapia de combinación se puede hacer por un experto ordinario en la materia según principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o prevención de los diversos trastornos, tales como, por ejemplo, cáncer, disfunción renal, disfunción cerebral o disfunción neuronal. Usando este enfoque, es posible lograr la eficacia terapéutica con menores dosis de cada agente, reduciendo así el potencial de efectos secundarios adversos.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo (por ejemplo, para reducir el tamaño tumoral o la carga tumoral). El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores, incluyendo la eficacia del modulador específico empleado, la edad, peso corporal, actividad física, y dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad de una enfermedad particular. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y grado de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan a la administración de un compuesto o vector particular en un sujeto particular.

A la hora de determinar la cantidad eficaz del modulador a administrar, un médico puede evaluar los niveles plasmáticos circulantes del modulador, la toxicidad del modulador, y la producción de anticuerpos anti-modulador. En general, la dosis equivalente de un modulador es de alrededor de 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto típico.

Para la administración, los moduladores de los receptores de quimiocinas de la presente invención se pueden administrar a una tasa determinada por la LD-50 del modulador, y los efectos secundarios del modulador a diversas concentraciones, como se aplica a la masa y salud general del sujeto. La administración se puede lograr vía una única dosis o dosis divididas.

VII. COMPOSICIONES, KITS, SISTEMAS INTEGRADOS Y APLICACIONES PROTEÓMICAS

Se describen en la presente memoria composiciones, kits y sistemas integrados para poner en práctica los ensayos descritos en la presente memoria usando anticuerpos anti-CCX-CKR2 u otros agentes que detectan específicamente CCX-CKR2.

También se describen en la presente memoria composiciones de ensayo para uso en ensayos en fase sólida; tales composiciones pueden incluir, por ejemplo, un polipéptido de CCX-CKR2 (incluyendo, por ejemplo, como parte de una célula, fracciones de membranas o liposomas (*véanse, por ejemplo*, Babcok et al., J. Biol. Chem. 276(42):38433-40 (2001); Mirzabekov et al., Nat. Biotechnol. 18(6):649-54 (2000))) inmovilizado en un soporte sólido, y un reactivo marcador. En cada caso, las composiciones de ensayo también pueden incluir reactivos adicionales que son deseables para la hibridación. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser, por ejemplo, una placa de Petri, una placa de múltiples pocillos o un microchip. Además, los microchips de librerías peptídicas se pueden usar para identificar secuencias peptídicas que se unen específicamente a CCX-CKR2.

Los agentes que se unen específicamente a CCX-CKR2 también se pueden incluir en las composiciones de ensayo. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a CCX-CKR2 se puede inmovilizar sobre un soporte sólido. En algunas de estas realizaciones, el agente se usa para detectar la presencia o ausencia de CCX-CKR2, o células que expresan CCX-CKR2. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser una placa de Petri, una placa de múltiples pocillos o un microchip.

Se describen en la presente memoria kits para llevar a cabo los ensayos de la invención. Los kits incluyen típicamente un agente (por ejemplo, un anticuerpo u otra pequeña molécula) que se une específicamente a CCX-CKR2, y un marcador para detectar la presencia del agente. Los kits pueden incluir uno o más polipéptidos de receptores de quimiocinas. Los kits pueden incluir cualquiera de las composiciones señaladas anteriormente, e incluyen opcionalmente además componentes adicionales tales como instrucciones para practicar un método de ensayo de alto rendimiento para determinar un efecto sobre la actividad o función de receptores de quimiocinas, uno o más recipientes o compartimientos (*por ejemplo*, para sostener la sonda, marcadores, o similares), un modulador de control de la función o actividad de los receptores de quimiocinas, un armazón robótico para mezclar los componentes del kit, o similar.

En algunos casos, los kits comprenden SDF1 y/o I-TAC. En algunos casos, los kits comprenden una SDF-1 marcada o etiquetada y un competidor frío I-TAC, o, como alternativa, una I-TAC marcada o etiquetada y un competidor frío SDF-1. La quimiocina marcada o etiquetada se puede marcar o etiquetar de cualquier manera conocida por los expertos en la materia. En algunos casos, la quimiocina marcada se radiomarca o etiqueta con biotina o un marcador fluorescente. Como alternativa, o además, el kit puede contener un reactivo de unión anti-I-TAC (por ejemplo, un anticuerpo) para la detección de I-TAC. Los kits también pueden contener los tampones salinos apropiados y otros reactivos para llevar a cabo un ensayo de unión competitiva, por ejemplo, en células intactas o membranas celulares. Tales reactivos se describen, por ejemplo, en los ejemplos a continuación. En algunos aspectos, los kits también comprenden un soporte sólido o receptáculo para medir la unión del ligando a CCX-CKR2 (por ejemplo, en un formato de placa para reacciones compatibles con contadores de centelleo o lectores de placas automatizados). En algunos casos, los kits comprenden instrucciones para usar los kits, por ejemplo, en los métodos de la invención.

También se describen en la presente memoria sistemas integrados para el cribado de alto rendimiento de moduladores potenciales para un efecto sobre la actividad o función de moduladores potenciales de CCX-CKR2. Los sistemas incluyen típicamente un armazón robótico que transfiere fluido desde una fuente a un destino, un controlador que controla el armazón robótico, un detector del marcador, una unidad de almacenamiento de datos que registra la detección del marcador, y un componente de ensayo, tal como una cápsula de microtitulación, que comprende un pocillo que tiene una mezcla de reacción o un sustrato que comprende un ácido nucleico o resto de inmovilización fijo.

Las imágenes ópticas visualizadas (y, opcionalmente, registradas) por una cámara u otro dispositivo de registro (*por ejemplo*, un fotodiodo y dispositivo de almacenamiento de datos) se procesan opcionalmente de forma adicional como se describe en la presente memoria, *por ejemplo*, digitalizando la imagen y almacenando y analizando la

imagen en un ordenador. Existe una variedad de equipo periférico y software comercialmente disponibles para digitalizar, almacenar y analizar un vídeo digitalizado o una imagen óptica digitalizada.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Este ejemplo muestra que SDF-1 e I-TAC compiten por la unión a un nuevo receptor de quimiocina.

Materiales y métodos

Reactivos y células. Las quimiocinas recombinantes humanas, víricas y murinas se obtuvieron de R&D Systems (Minneapolis, MN) y PeproTech (Rocky Hill, NJ) cuando se indicó. SDF-1a marcada con ^{125}I se adquirió de PerkinElmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA), e I-TAC marcada con ^{125}I se obtuvo de Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK).Los anticuerpos monoclonales usados en citometría de flujo y en la competición de la unión a ligando procedieron de R&D Systems (Minneapolis, MN): clones anti-CXCR4 12G5, 44708.111 (171), 44716.111 (172), 44717.111 (173), nmIgG2a, y nmIgG2b. El anticuerpo secundario, conjugado de PE con anti-IgG de ratón de cabra (Coulter Immunotech, Miami, FL), se usó para detectar la unión del anticuerpo mediante citometría de flujo. Las siguientes células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA): MCF-7 (adenocarcinoma; glándula mamaria), MDA MB-231 (adenocarcinoma; glándula mamaria), MDA MB-435s (carcinoma ductal; glándula mamaria), DU 4475 (glándula mamaria), ZR 75-1 (carcinoma ductal; glándula mamaria), HEK 293 (riñón embriónico humano), HUV-EC-C (vena umbilical humana; endotelio vascular; normal). Las células CEM-NKr (leucemia linfoblástica aguda; sangre periférica; linfoblasto T) se obtuvieron del AIDS Research and Reference Reagent Program del NIH. Las estirpes celulares se cultivaron en DMEM (Mediatech, Herndon, VA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (HyClone Logan, UT) a 37ºC en una incubadora humidificada en una mezcla de 5% de CO_2/aire. Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se obtuvieron de capas leucocitarias de donantes sanos (Stanford Blood Center, Palo Alto, CA) mediante centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll-Hypaque. Las PBMC aisladas se activaron con 2,5 ug/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) y 10 ng/ml de IL-2 humana recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) durante 3 días en RPMI-1640 (Mediatech, Hemdon, VA) suplementado con 10% de FBS a 37ºC en una incubadora humidificada en una mezcla de 5% de CO_2/aire. Tras la activación, las células se lavaron y se cultivaron en RPMI suplementado con 10% de FBS y 10 ng/ml de IL-2, que se repuso cada 3-4 días hasta el día en que se usaron las células.

Análisis de unión. Se empleó la técnica “DisplaceMax™” para examinar el perfil global de la interacción del ligando de quimiocina con el receptor de SDF1 en células MCF-7 y CEM-NKr. Esta tecnología emplea la unión a radioligando maximizada en eficiencia usando protocolos de filtración como se describen previamente (Dairaghi, et al: J Biol Chem 274:21569-74 (1999); Gosling, J. et al. J Immunol 164:2851-6 (2000)). En estos ensayos, DisplaceMax™ empleó la interrogación simultánea de células MCF-7 o CEM-NKr, según se indica, mediante >110 quimiocinas purificadas distintas en la capacidad para desplazar SDF-1α o I-TAC radiomarcada con ^{125}I, según se indica, usando el protocolo descrito (Dairaghi,et al. J Biol Chem 274:21569-74 (1999); Gosling, J. et al. J Immunol 164:2851-6 (2000)). Brevemente, los elementos de quimiocina se incubaron con células, seguido de la adición de quimiocina radiomarcada (^{125}I SDF-1a o ^{125}I h I-TAC) durante 3 h a 4ºC en el siguiente medio de unión (25 mM de HEPES, 140 mM de NaCl, 1 mM de $CaCl_2$, 5 mM de $MgCl_2$ y 0,2% de seroalbúmina bovina, ajustado a pH 7,1). En algunos ensayos se incluyeron pequeñas moléculas, cuando se indicó. En estos ensayos, el compuesto se añadió a la placa a la concentración indicada seguido de la adición de la quimiocina radiomarcada. Todos los ensayos se incubaron entonces durante 3 h a 4ºC con agitación suave. Tras la incubación en todos los ensayos de unión, las reacciones se aspiraron sobre filtros de vidrio GF/B tratados con PEI (Packard) usando un cosechador celular (Packard), y se lavaron dos veces (25 mM de HEPES, 500 mM de NaCl, 1 mM de $CaCl_2$, 5 mM de $MgCl_2$, ajustado a pH 7,1). Se añadió líquido de centelleo (MicroScint 10, Packard) a los pocillos, y los filtros se contaron en un contador de centelleo Packard Topcount. Los datos se analizaron y representaron gráficamente usando Prism (Graph-Pad Prism versión 3.0a para Macintosh, GraphPad Software).

Determinación de la unión al receptor de ^{125}I SDF-1α. Usando el ensayo a base de filtración descrito anteriormente, las células se preincubaron con 1) tampón solo, 2) SDF-1β en exceso (90 nM final), o 3) MIG (175 nM final), según se indica, durante 30 min. a 4ºC. Tras esta incubación, el competidor de quimiocina frío indicado, a las concentraciones señaladas, y ^{125}I h I-TAC se añadieron a las reacciones de unión. Todos los ensayos se incubaron entonces, se cosecharon y se analizaron como se describe anteriormente.

RT PCR. Se aisló ARNm de células usando técnicas estándar. Se analizó ADN complementario en busca de la expresión de CXCR3 y CXCR4 mediante PCR. Los cebadores específicos se obtuvieron de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Los productos específicos de la PCR se midieron por medio de un Hybaid Omn-E (E&K Scientific Products, Inc., Saratoga, CA) durante 35 ciclos. Como control, se midió GAPDH.

Ensayo de adhesión. Se hicieron crecer células HUVEC toda la noche en portaobjetos tratados con cultivo tisular en presencia de TNFα (25 ng/ml) e IFNγ (50 ng/ml). Al día siguiente, las células NSO transfectadas con CCX-CKR2, así

como los controles de tipo salvaje, se marcaron con calceína-AM. Las células marcadas con calceína se cultivaron entonces en placas sobre la monocapa endotelial en presencia y ausencia de antagonista de CCX-CKR2 (CCX3451). Los portaobjetos se incubaron a 37ºC durante 40 minutos, seguido del lavado con PBS para eliminar células no adherentes. Las células NSO adherentes se visualizaron mediante microscopía fluorescente. Las células tratadas con compuesto o vehículo se contaron visualmente a partir de tres campos de visión (fov) y se representaron gráficamente.

Resultados

Informes recientes han identificado la expresión de CXCR4 en varios tipos de células tumorales (Sehgal, et al., J Surg Oncol 69:99-104 (1998); Sehgal, A., et al. J Surg Oncol 69:239-48 (1998); Burger, et al. Blood 94:3658-67 (1999); Rempel, et al. Clin Cancer Res 6:102-11 (2000); Koshiba, T. et al. Clin Cancer Res 6:3530-5 (2000); Muller, A. et al. Nature 410:50-6 (2001); Robledo, et al. J Biol Chem 276:45098-45105 (2001)), y en un ejemplo relacionan esta expresión con metástasis de células tumorales de mama (Muller, A. et al. Nature 410:50-6 (2001)). Para investigar adicionalmente el papel de receptores de quimiocinas sobre células tumorales, se evaluó la expresión de CXCR4 sobre varias estirpes de células tumorales de mama humanas. Inicialmente, el patrón de expresión de CXCR4 se evaluó mediante citometría de flujo. Se examinaron linfocitos T cultivados con IL-2 primarios y dos estirpes de células T, CEMNKr y Jurkat, para determinar el fenotipo de célula T de la tinción anti-CXCR4. También se ensayaron tres estirpes de células tumorales de mama, MCF-7, MDA MB-231 y MDA MB-435s. Los cuatro clones anti-CXCR4 ensayaron células T teñidas. Sorprendentemente, mientras que se da a conocer que las células tumorales de mama expresan CXCR4, el clon 12G5 ampliamente usado no detectó CXCR4 en las células de tumor de mama. Se detectó reactividad débil y variable con los otros tres clones analizados en las células tumorales de mama. En este ensayo, también se analizaron las estirpes de células tumorales de mama DU 4475 y ZR 75-1 (datos no mostrados), y se encontró que tienen perfiles de tinción con anticuerpo similares a las otras células tumorales de mama ensayadas. De este modo, los patrones de tinción del panel de mAb para CXCR4 parecen sugerir dos tipos distintos de reactividad: un fenotipo de CXCR4 “leucocítico” (ejemplificado por la tinción de CEM-NKr, Jurkat y linfocitos con IL-2) y un fenotipo de célula tumoral de mama (ejemplificado por la tinción débil en estirpes de células tumorales de mama MCF-7 y MDA MB-231).

La falta consistente de reactividad usando el mAb anti-CXCR4 más ampliamente empleado, el clon 12G5, sobre células tumorales de mama nos condujo a examinar la expresión de CXCR4 en estas células mediante RT PCR. Se aisló ARNm de las tres estirpes de tumor de mama analizadas en citometría de flujo, así como linfocitos cultivados con IL-2 y las estirpes de células T, CEM-NKr y Jurkat, como controles positivos para la expresión de CXCR4. A pesar de la falta de reactividad con 12G5 y la reactividad variable con los otros clones anti-CXCR4 ensayados, las estirpes de células tumorales de mama, MCF-7 y MDA MB-231, expresaron el mensaje de CXCR4; sin embargo, se encontró que MDA MB-435s es negativa para la expresión de CXCR4. En todos los casos, se midió como control GAPDH. Para examinar si las diferencias en la reactividad de mAb pueden ser debidas a diferencias de secuencia que dan como resultado así variaciones epitópicas en CXCR4 en las diversas estirpes celulares, se secuenciaron entonces los productos de la PCR generados a partir de MCF-7, como célula tumoral de mama CXCR4+ representativa, y CEM-NKr, como célula T representativa. Las secuencias procedentes de estas dos estirpes celulares son idénticas a las secuencias de CXCR4 publicadas, sugiriendo que, a pesar de los diferentes perfiles de anticuerpos anti-CXCR4, la estructura genética y de este modo la estructura polipeptídica de CXCR4 en ambos tipos celulares fue idéntica.

Se ha dado a conocer previamente un conjunto de técnicas mediante las cuales se puede evaluar simultáneamente la unión del receptor a un conjunto amplio de ligandos de quimiocinas (Dairaghi, et al. J Biol Chem 274:21569-74 (1999); Gosling, J. et al. J Immunol 164:2851-6 (2000)). De esta manera, se sondó el perfil de unión de CXCR4 en CEM-NKr en comparación con células MCF-7. Se ensayaron más de 90 elementos de quimiocinas en busca de la capacidad para desplazar la quimiocina distintiva, ^{125}I SDF-1α, para la unión a células CEM-NKr (Figura 1) o MCF-7 (Figura 1). Como era de esperar, los competidores de alta afinidad potenciales de ^{125}I SDF-1α en CEM-NKr incluyen hSDF-1β y mSDF-1, mientras que hSDF-1α y HHV8 vMIP-II muestran una competición de afinidad moderada potencial. Esto concuerda con todos los resultados previamente dados a conocer de SDF-1 como el único ligando no vírico para CXCR4. Sin embargo, el patrón global de competición en células MCF-7 fue notablemente diferente. En este tipo celular, hI-TAC y mI-TAC demostraron una competición de alta afinidad por el mismo ligando distintivo SDF-1. Para investigar adicionalmente este resultado inusual, se ensayó ^{125}II-TAC como el ligando distintivo en células MCF-7 (Figura 1). El perfil de desplazamiento de alta afinidad usando ^{125}II-TAC en MCF-7 fue idéntico al perfil obtenido usando ^{125}I SDF-1α. De este modo, en células MCF-7, I-TAC y SDF-1 se comportan de forma indistinguible en la unión, y compiten por el mismo sitio del receptor.

Para caracterizar adicionalmente la unión de I-TAC y SDF-1, se obtuvieron curvas de respuesta a la dosis en experimentos de unión de competición con ligandos de alta afinidad potenciales seleccionados en CEM-NKr y MCF-7. Como se sugirió por los datos de Displace-Max™, I-TAC compite con ^{125}I SDF-1α por la unión a MCF-7, pero no a CEM-NKr (Figura 2). La competición homóloga de ^{125}I SDF-1α con la isoforma de SDF-1, SDF-1α o SDF-1β, da como resultado una competición completa en CEMNKr y MCF-7 (Figura 2). De forma notable, la afinidad de SDF-1 por el receptor expresado en MCF-7 es mayor que aquella en CEM-NKr. De este modo, aunque la secuencia de

CXCR4 es idéntica en ambos tipos celulares, la especificidad de unión y la afinidad del ligando difieren en células T frente a células tumorales de mama.

A continuación se investigó si la unión de I-TAC detectada en células MCF-7 podría estar mediada por CXCR3, puesto que CXCR3 se ha instituido desde hace tiempo como el receptor principal para I-TAC (Cole, K. E. et al. J Exp Med 187:2009-21. (1998)). Para este fin, se examinó la unión de ^{125}II-TAC en condiciones que inhibiesen la unión "clásica" mediada por CXCR3 (es decir, la unión de los ligandos de CXCR3 dados a conocer, MIG, I-TAC e IP-10 a CXCR3), permitiendo así la unión "clásica" mediada por CXCR4 (es decir, la unión del ligando de CXCR4 dado a conocer, SDF-1, a CXCR4), así como la situación inversa. Se preincubaron células MCF-7 con medio solo, medio que contiene MIG en exceso (~175 nM; para inhibir la unión mediada por CXCR3), o medio que contiene SDF-1β en exceso (~90 nM; para inhibir la unión mediada por CXCR4). I-TAC compitió con ^{125}I I-TAC por la unión a las células MCF-7 con una IC50 de 1 nM (Figura 3), confirmando que es un ligando de alta afinidad para este receptor en estas células. De forma similar, las células preincubadas en primer lugar con MIG en exceso todavía fueron capaces entonces de dar la misma curva de unión I-TAC/^{125}I I-TAC homóloga nuevamente con una IC50 de 1 nM (Figura 3). Sin embargo, cuando las células se pretrataron primero con SDF-1β en exceso, se inhibió toda la unión de ^{125}II-TAC (Figura 3), sugiriendo que la unión de ^{125}II-TAC observada en células tumorales de mama está mediada por el receptor de SDF1 expresado en estas células. De forma similar, la unión de ^{125}II-TAC a células MCF-7 no se inhibió cuando se ensayó IP-10 como el competidor de quimiocina frío. Nuevamente, la preincubación con MIG en exceso no afectó a este perfil de unión; sin embargo, la preincubación de las células con SDF-1β inhibió completamente la unión de ^{125}II-TAC. Cuando el ligando de CXCR3 MIG se ensayó como el competidor frío, la unión de ^{125}II-TAC a la célula no se inhibió (Figura 3). Como se esperaba a partir de los datos de DisplaceMax™ representados en la Figura 1, SDF-1β compitió con ^{125}II-TAC por la unión a estas células con alta afinidad (IC50 de 1 nM). La preincubación de células con MIG en exceso no afectó a la competición SDF-1β/^{125}II-TAC, sugiriendo nuevamente que la unión detectada no está mediada por CXCR3.

Esta hipótesis se examinó adicionalmente mediante PCR. Se usó ARNm aislado usado previamente (descrito anteriormente) para buscar signos de transcritos de CXCR3. Mientras que los linfocitos cultivados con IL-2 expresaron CXCR3, ninguna otra célula ensayada expresó CXCR3. La falta de expresión de CXCR3 detectada mediante RT PCR apoya los datos de la Figura 3, sugiriendo nuevamente que la unión de I-TAC en células MCF-7 no está mediada por CXCR3.

La reactividad alterada del anticuerpo anti-CXCR4 así como la especificidad de unión y afinidad del ligando condujo a considerar que este receptor no fue CXCR4 clásico. Existen unos pocos receptores de quimiocinas "huérfanos" que se han identificado, pero para los cuales no se ha identificado el ligando de quimiocina. Se consideraron varios receptores huérfanos. Uno de tales receptores se denomina RDC1 (denominado en la presente memoria CCX-CKR2). Cuando la secuencia proteica para RDC1 se transfecta en MDA MB 435s (una estirpe celular que no expresa endógenamente CXCR4, CXCR3 o CCX-CKR2), se recapitula el fenotipo de unión del radioligando distintivo (Figura 4). CCX-CKR2 expresado en MDA MB 435s se une a SDF-1 radiomarcado. Esta unión está competida por los competidores fríos SDF-1 e I-TAC.

En el esfuerzo por seleccionar a este receptor como diana para compuestos terapéuticos de compuestos orgánicos de pequeño peso molecular (SMC), se cribaron moléculas pequeñas (cerca de 135.000) usando dos cribados de alto rendimiento: uno diseñado para evaluar el fenotipo de unión de SDF-1 a leucocitos mediada por CXCR4, y otro para sondar el fenotipo de unión de SDF-1 a cáncer de mama mediada por CCX-CKR2. Los resultados de esos cribados indicaron que fue posible la discriminación farmacológica clara de los dos fenotipos de unión (Figura 5). Por ejemplo, la pequeña molécula denominada CCX0803 compite con ^{125}I SDF-1α por la unión a MCF-7 con una IC50 de 46 nM (Figura 5); sin embargo, esta pequeña molécula no inhibe en absoluto la unión de ^{125}I SDF-1α en CEMNKr (Figura 5). Por el contrario, un antagonista de pequeña molécula diferente, CCX7923, inhibe la unión de ^{125}I SDF-1α a CEMNKr con una IC50 de 106 nM (Figura 5), pero no inhibe la unión de ^{125}I SDF-1α en células MCF-7 (Figura 5). Estos dos compuestos revelan el patrón marcado y no ambiguo de la inhibición de unión no recíproca de ligandos a los dos receptores (estirpes de tumor de mama frente a leucocitos).

Después de determinar inicialmente que las células de cáncer de mama muestran una afinidad de unión por SDF-1 que es distinta de la observada en otro tejido no tumoral o no canceroso, se llevaron a cabo estudios adicionales. Estos estudios de fenotipado (usando reactividad de anticuerpos, perfil de unión a ligandos y discriminación farmacológica; véanse los métodos detallados en la presente memoria) han mostrado claramente que muchos tipos de células cancerosas (o tumorales) también muestran la afinidad de unión (por ejemplo, reactividad de anticuerpos, unión a ligandos y discriminación farmacológica) correlacionada inicialmente con células tumorales de mama, y de este modo con la expresión de CCX-CKR2. Se examinaron las siguientes células tumorales, y muestran la afinidad de unión correlacionada con cáncer: carcinoma ovárico humano, adenocarcinoma de cuello uterino humano, linfoma de Burkitt humano, adenocarcinoma mamario humano, carcinoma ductal mamario humano, glioblastoma humano, y tumor mamario de ratón.

Los tumores y otros cánceres son difíciles de tratar, en parte debido a su rápida velocidad de crecimiento celular. A este respecto, se sabe que los tumores comparten ciertas características de crecimiento con tejidos embriónicos

tempranos que se dividen rápidamente. Un punto de vista mantenido pero no aceptado sugiere que los tumores en el adulto pueden representar “revertantes” a un fenotipo de crecimiento embriónico. Los ratones sin los genes de SDF-1 y CXCR4 son embriónicamente mortales, sugiriendo que este par de ligando-receptor es un componente crítico del crecimiento y desarrollo. Aproximadamente el 50% de embriones SDF-1 mutantes homocigotos muere perinatalmente hacia 18,5; los hermanos de camada homocigotos restantes mueren en 1 h de nacimiento (Kishimoto, et al. Nature 382: 635-638 (1996)). De forma similar, ~1/3 de los ratones sin CXCR4 homocigotos mueren perinatalmente a E18,5 (Ma, et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9448-9453 (1998)). En los ratones tanto sin receptor como sin ligando se observaron defectos en linfopoyesis y mielopoyesis. El hígado fetal es el sitio principal de hematopoyesis en el ratón en el día 11, y continúa como tal hasta la primera semana después del nacimiento. Para este fin, se decidió examinar la expresión de CCX-CKR2 en este compartimiento. Se examinó la expresión de CCX-CKR2 en embriones de ratón de tipo salvaje a E17 (un punto de desarrollo próximo al momento en el que mueren los animales sin los genes) y E13 (un punto en el desarrollo distinto del momento en el que mueren los animales sin los genes, aunque después de que comienza la hematopoyesis).

En ensayos de unión de SDF-1, SDF-1 humana radiomarcada se une a células hepáticas fetales E13, y tanto SDF como I-TAC (proteínas de ratón y humana) son capaces de competir con el trazador radiomarcado para la unión. Esta especificidad alterada del ligando como se ejemplifica mediante la unión de I-TAC al receptor de SDF-1 es una característica distintiva del fenotipo de unión que se correlacionó primeramente con células cancerosas, y ahora se ha demostrado que es CCX-CKR2. Además, los antagonistas de CCX-CKR2 son capaces de competir con la unión de SDF-1 en hígado fetal E13; sin embargo, los antagonistas de CXCR4 no lo hacen.

Más tarde en el desarrollo, las células hepáticas fetales en E17 expresan CXCR4, y estas células responden a SDF-1 movilizando calcio intercelular. Los antagonistas de CXCR4 inhiben esta movilización de calcio mediada por SDF-1; sin embargo, los antagonistas de CCX-CKR2 no tienen ningún efecto. De este modo, estos datos sugieren que los hepatocitos fetales de tipo salvaje en E13 y E17 expresan ambos CXCR4; sin embargo, CCX-CKR2 se expresa en puntos de tiempo tempranos (E11) pero no tardíos (E15).

Aunque los estudios de unión en modelos de ratones embriónicos se correlacionan bastante bien con los datos procedentes de estudios humanos, los experimentos preliminares usando ratones que tienen una interrupción seleccionada del gen de CXCR4 sugieren que los perfiles de unión de SDF-1 e I-TAC observados en hepatocitos fetales embriónicos en el día 13 (E13) no cambiaron. Esto proporciona pruebas adicionales de que el gen que codifica el polipéptido con la afinidad de unión de SDF-1 relacionada con el cáncer no es CXCR4.

Los experimentos también demuestran que el receptor de CCX-CKR2 puede proporcionar una señal estimulante a células tumorales en crecimiento. Las células tumorales pueden aumentar ciertos genes implicados en el ciclo o transcripción celular en respuesta a la estimulación de SDF-1. De forma más importante, si a las células tumorales se les priva de suero en cultivo toda la noche, comienzan a sufrir apoptosis (muerte celular). Cuando se añade SDF-1 para suplementar estos cultivos, las células son capaces de recuperarse del hambre, en comparación con controles no tratados. De este modo, SDF-1 sirve por lo tanto como una señal antiapoptótica. Las células cancerosas se caracterizan a menudo como células que han perdido la capacidad para sufrir apoptosis.

Ejemplo 2:

Este ejemplo demuestra que el fenotipo de unión relacionado con cáncer explicado en el Ejemplo 1 está mediado por CCX-CKR2 (previamente conocido como el receptor huérfano RDC1).

En general, CCX-CKR2 se expresa preferentemente en células transformadas. Como se presenta en la Tabla 1 (columna izquierda), una variedad de células cancerosas diferentes fueron positivas para la expresión de CCX-CKR2. Por el contrario, las células más normales (no tumorales) no expresaron CCX-CKR2. *Véase*, Tabla 1 (columna derecha).

Tabla 1

CCX-CKR2 positivo	CCX-CKR2 negativo
carcinoma mamario humano (MCF-7, MDA MB 361)	PBMC humanas normales
glioblastoma humano (T98G)	leucemia de células T humanas (MOLT4, Jurkat, CEM-NKr)
carcinoma de próstata humano (LN Cap)	células endoteliales sin estimular
linfoma de célula B humano (Raji, IM9)	timo de ratón
carcinoma ovárico humano (HeLa)	pulmón de ratón
carcinoma pulmonar humano (A549)	bazo de ratón
carcinoma mamario de ratón (4T1)	corazón de ratón
células epiteliales pancreáticas de ratón, transformadas con SV40 (SVR)	PBL de ratón
linfoma de célula B de ratón (BCL1)	hígado de ratón
riñón normal de ratón *	médula ósea adulta total de ratón
cerebro normal de ratón *	médula ósea adulta negativa de estirpe de ratón

hígado fetal de ratón (E11 a E13) hígado fetal de ratón (E15 hasta el nacimiento)
células endoteliales activadas

* la expresión en estos órganos es débil según se determina mediante la señal de unión de radioligando

No obstante, parece haber un papel para CCX-CKR2 en algunas células normales. El receptor de CCX-CKR2 se expresa durante un período de tiempo en el desarrollo fetal. CCX-CKR2 se expresa en hígado fetal de ratón hacia el 11º día de embriogénesis (E11), pero hacia E15 ya no se detecta (como se determina mediante la unión de SDF1 radiomarcada y el desplazamiento de I-TAC), así como transcritos de CCX-CKR2 detectados mediante análisis Northern. En el ratón adulto, se expresa en riñón normal. En comparación con la expresión en el riñón, hay una menor expresión en el cerebro normal. Debido a que el examen se realiza con homogenados de cerebro completo, esta baja señal en el ensayo de unión de radioligando es consistente con una población pequeña de células en el cerebro que expresan CCX-CKR2.

Para reforzar adicionalmente las pruebas del papel de CCX-CKR2's en el cáncer, se demostró que el crecimiento de las células cancerosas puede ser inhibido antagonizando CCX-CKR2 en células cancerosas. El antagonismo de CCX-CKR2 expresado en carcinoma mamario por un antagonista de CCX-CKR2 inhibió la proliferación celular *in vitro*. Las células tratadas *in vitro* mostraron un crecimiento celular reducido a lo largo del tiempo en comparación con los controles no tratados. *Véase,* Figura 6.

CCX-CKR2 también está implicado en la adhesión. La migración de leucocitos implica varias etapas, que incluyen la adhesión de células y la emigración subsiguiente a un tejido dado. Los ensayos de adhesión estáticos *in vitro* constituyen el modelo de este suceso. Las monocapas de células endoteliales vasculares se hacen crecer sobre una superficie. Las células que expresan CCX-CKR2 se marcan entonces con un colorante fluorescente para la visualización. Cuando las células de CCX-CKR2 se dejan adherirse a la superficie endotelial, muchas más células que expresan CCX-CKR2 se unen a la capa endotelial que lo que lo hace un control de células CCX-CKR2-. Además, la adición de un antagonista de CCX-CKR2 inhibe la adhesión, en comparación con un vehículo tratado con control. *Véase*, Figura 7.

Pruebas *in vivo* apoyan además un papel para CCX-CKR2 en el crecimiento tumoral. Los tumores se forman cuando células de linfoma de células B humanas, que expresan CCX-CKR2, se inyectan en ratones inmunodeficientes. El tratamiento de estos ratones con antagonistas de CCX-CKR2 inhibió la formación de tumor vascularizado. En uno de tales estudios, 1 de 17 ratones tratados con un antagonista de CCX-CKR2 desarrolló un tumor vascularizado encapsulado, mientras que 11 de 17 ratones en el grupo tratado con vehículo desarrollaron tumores vascularizados encapsulados. Estos datos sugieren que CCX-CKR2 puede estar implicado en la capacidad de un tumor para diferenciarse y establecer un lecho vascular, y proporcionan pruebas de que el antagonismo de CCX-CKR2 es una terapia útil contra el cáncer.

El efecto del antagonismo de CCX-CKR2 también se ensayó en un modelo de cáncer de mama. En un modelo de crecimiento de tumor de mama, se inyectó a ratones inmunodeficientes un carcinoma mamario humano. Las medidas tumorales se realizaron 3 veces a la semana, y los volúmenes se representaron gráficamente. Los ratones que se trataron con un antagonista de CCX-CKR2 mostraron un volumen tumoral reducido en comparación con el grupo de control de vehículo, demostrando que CCX-CKR2 tiene un papel en el crecimiento tumoral. Véase la Figura 8.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que CCX-CKR2 promueve la supervivencia celular al reducir la apoptosis.

Las interacciones entre quimiocinas y receptores de quimiocinas se evalúan típicamente midiendo la movilización de calcio intracelular y la quimiotaxia. Sin embargo, CCX-CKR2 no produce una movilización de calcio transitoria o provoca que las células migren en respuesta a sus ligandos CXCL12 o CXCL11. Las células que expresan CCX-CKR2 muestran sin embargo una mayor adhesión a monocapas de células endoteliales activadas. Además, en condiciones de baja suplementación con suero del medio de cultivo (es decir, 1% en lugar del 10% normal), la recuperación de células adherentes del hígado después de tres días fue mucho mayor para transfectantes de CCX-CKR2- MDA MB 435s (denominados CCX-CKR2 435s) frente a células WT no transfectadas (WT 435s). Concordando con esta observación, la frecuencia de células muertas recuperadas en el sobrenadante recogido a partir de estos cultivos fue mucho mayor para WT frente a transfectantes de CCX-CKR2. Este efecto se pudo visualizar fluorescentemente usando el colorante intercalante de ADN 7AAD (7 aminoactinomicina D). Transfectantes CCX-CKR2-435s o células 435s de tipo salvaje se hicieron crecer en diferentes concentraciones de suero, después se cosecharon y se incubaron con 7AAD (1 ug/ml en DMSO) durante 15-30 minutos a temperatura ambiente. El análisis de FACS reveló muchas más células muertas/apoptóticas (es decir, 7AAD positivas) en células 435s de tipo salvaje frente a los transfectantes CCX-CKR2-435s.

Se extendieron estos hallazgos en una serie de experimentos en los que transfectantes de CCX-CKR2 cultivados o células WT no transfectadas se cotiñeron con anexina, que detecta sólo células apoptóticas, y yoduro de propidio

(PI), que detecta células muertas pero no células apoptóticas. Este enfoque identifica fácilmente la proporción de células apoptóticas en una población celular, como se demuestra usando agentes que se sabe que inducen apoptosis celular, por ejemplo camptotecina (CMP), o TNFalfa más cicloheximida (CHX), y que proporcionan controles excelentes en estos ensayos.

Usando este ensayo, se midió el desarrollo de células apoptóticas a lo largo del tiempo de transfectantes CCX-CKR2-435s o células 435s de tipo salvaje que se hicieron crecer en suero óptimo (10%) o limitante (1%). Ambos tipos celulares que se hicieron crecer en suero al 10% mostraron una excelente viabilidad a lo largo de un período de cultivo de 4 días. Por el contrario, las células WT que se hicieron crecer en 1% de suero mostraron una reducción drástica en células viables después de 3 y 4 días de cultivo. La cotinción con anexina PI reveló este desarrollo reflejado de células tanto apoptóticas como muertas. De forma interesante, las células CCX-CKR2-435s que se hicieron crecer en 1% de suero mostraron excelente viabilidad a lo largo del mismo período de cultivo de 4 días, sugiriendo que la introducción de CCX-CKR2 en 435s protege a estas células de la apoptosis celular rápida que se produce en condiciones de suplementación subóptima de suero.

Se obtuvieron resultados idénticos en un segundo experimento usando el mismo transfectante CCX-CKR2-435s, y además una población no clonal distinta de células 435s transfectadas con CCX-CKR2. Estos últimos resultados indicaron que la propiedad escasamente apoptótica del transfectante clonal inicial resultó de la expresión de CCX-CKR2 en vez de una aberración particular de aquel clon transfectante.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra la fosforilación mediada por CCX-CKR2 de p44/42 MAPK (ERK1 y ERK2).

El CCX-CKR2 es un receptor no habitual por cuanto la unión del ligando (por ejemplo, mediante ITAC o SDF1) no da como resultado la movilización de calcio que es típica de muchos receptores de quimiocinas. Esto alentó una evaluación de otras rutas de señalización potenciales, incluyendo una investigación sobre si la actividad de CCX-CKR2 estaba mediada a través de la fosforilación de ERK. Experimentos realizados con lisados procedentes de una estirpe celular MCF7 que expresa CCX-CR2, que se estimuló con ITAC o SDF1, demostraron que existe una fosforilación de ERK1 y ERK2 dependiente del ligando (algunas veces también denominado en la bibliografía como p44/42 MAPK). Las ERK1 y ERK2 fosforiladas se detectaron mediante análisis de transferencia Western, con lisados procedentes de la estirpe celular MCF7 sometida inicialmente a electroforesis para separar proteínas en el lisado. Las ERK1 y ER2 fosforiladas en gel electroforético se detectaron sondando con anticuerpos específicos para la forma fosforilada de estas proteínas. Estos anticuerpos están disponibles de Cell Signaling Technologies de Beverly, MA.

Se llevaron a cabo experimentos similares con células HeLa que expresan CCX-CR2. Se obtuvieron los mismos resultados cuando estas células se estimularon con ITAC o SDF1.

Puesto que ITAC y SDF1 se unen a otros receptores de quimiocinas, por ejemplo CXCR3 en el caso de ITAC, y CXCR4 en el caso de SDF1, fue importante considerar la contribución potencial de estos receptores a la fosforilación de ERK inducida por estos ligandos en células MCF7. El análisis de FACS de células MCF7 usando anticuerpos específicos para CSCR3 o CXCR4 reveló una ausencia completa de estos receptores en células MCF7. Los controles positivos que usan estirpes celulares que expresan CXCR3 o CXCR4 confirmaron que los anticuerpos usados en estos experimentos se podrían unir a estos receptores. De este modo, estos datos indican que la unión de ligandos tales como ITAC o SDF1 a CCX-CR2 provoca la señalización intracelular vía una fosforilación de ERK, que probablemente da como resultado la activación de componentes adicionales aguas abajo. El hallazgo de que CCX-CR2 media la fosforilación de ERK1 y ERK2 indica que CCX-CR2 está asociado con una variedad de procesos biológicos, debido a que se ha demostrado que la fosforilación de ERK media la regulación del crecimiento celular y diferenciación celular.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que la expresión celular de CCX-CKR2 provoca inducción de numerosas proteínas reguladoras.

Como enfoque alternativo para investigar sucesos de señalización mediados por CCX-CKR2, se compararon sobrenadantes recogidos de células MDA MB 435s transfectadas con CCX-CKR2 con sobrenadantes recogidos de células MDA MB 435s (435s) de tipo salvaje, se evaluaron mediante ensayos ELISA específicos para determinar la presencia de una gran familia de proteínas segregadas. Las células 435s que expresan CCX-CKR2 produjeron cantidades sustancialmente mayores de GM-CSF, RANTES, MCP-1, TIMP-1, y MMP3 que las células 435s de tipo salvaje, especialmente cuando se hicieron crecer en condiciones de suero limitantes. De forma interesante, se ha dado a conocer que todos estos factores están implicados en el crecimiento, remodelación vascular y quimiotaxia relacionada con tumorigénesis. También pueden estar implicados en el fenotipo escasamente apoptótico de CCX-CKR2 descrito anteriormente.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra la inhibición de CCX-CKR2 basada en siRNA.

Se obtuvo SMARTpool™ siRNA (Dharmacon) específico para CXCR4 o CCX-CKR2. SMARTpool™ siRNA es un conjunto de cuatro secuencias de siRNA diferentes, cada una de las cuales se dirige a una región diferente del ARNm especificado. Estos conjuntos de siRNA se ensayaron en células HeLa. La expresión de CXCR4 se evaluó mediante tinción con Mab 12G5 ó 173 y FACS, mientras que la expresión de CCX-CKR2 se midió en un ensayo de unión usando ^{125}I-SDF1. El CXCR4 se expresa en células HeLa en una conformación que no presenta unión detectable de ^{125}I-SDF1, permitiendo así la detección de la expresión de CCX-CKR2. CCX-CKR2 SMARTpool™ siRNA (25-100 nM) efectuó una inhibición significativa (≥50%) de la unión de ^{125}I-SDF1, mientras que CXCR4 SMARTpool™ siRNA no lo hizo. Se obtuvieron resultados similares con transfectantes de 293-CCX-CKR2.

Además, se encontró que cada una de las 3 secuencias de siRNA siguientes reducen la unión de SDF-1 cuando se introducen en células a una concentración tan baja como 4 nM:

siRNA #1: GCCGTTCCCTTCTCCATTATT

siRNA #2: GAGCTCACGTGCAAAGTCATT

siRNA #3: GACATCAGCTGGCCATGCATT

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra la expresión de CCX-CKR2 en el cerebro.

El CCX-CKR2 se expresa en un gran número de estirpes de células tumorales, pero en pocos tejidos normales. Una excepción a este último patrón se proporcionó mediante la demostración en estudios de unión de que células del cerebro procedentes de ratones adultos normales expresaron CCX-CKR2. Para ampliar estas observaciones, se llevaron a cabo estudios de hibridación *in situ* usando una sonda específica de CCX-CKR2 para localizar la región de expresión de CCX-CKR2 en el cerebro. Se recogieron muestras de cerebro de ratones adultos normales, y se fijaron con 4% de PFA en PBS toda la noche a 4ºC, seguido de 30% de sacarosa en PBS toda la noche a 4ºC. Los tejidos se embebieron entonces en OCT, se cortaron en rodajas de 20 um, después se recogieron en portaobjetos superfrost plus. Para los estudios de hibridación *in situ*, se prepararon ribosondas antisentido y sentido mediante transcripción *in vitro*, respectivamente, con T7 y SP6 ARN polimerasa usando el kit de marcado de ARNc DIG (Roche) tras la linealización. Las criosecciones de 20 um se fijaron en 4% de PFA reciente, seguido del tratamiento con proteasa K (2 ug/ml durante 20 min. a 37ºC). Los portaobjetos se prehibridaron a 55ºC durante 1 hora, y después se hibridaron a 55ºC toda la noche en recipientes cerrados herméticamente. Los portaobjetos se lavaron entonces con formamida al 50%, 5x SSC pH 4,5 y 1% de SDS a 65ºC, seguido del bloqueo con 5% de suero de oveja durante 1 hora e incubación con 1:1000 de anticuerpo anti-Dig en 1% de suero de oveja toda la noche a 4ºC. Los portaobjetos se lavaron con TBST, y se detectaron con NBT/BCIP.

Los resultados demuestran claramente una fuerte expresión de CCX-CKR2 por neuronas en el cerebelo, hipocampo y corteza. Existe poca o ninguna expresión detectable en áreas que contienen gliocitos, tales como los tractos de materia blanca en el cerebelo, y el cuerpo calloso. Las células de Purkinje mostraron una señal uniforme y fuertemente positiva, y un subconjunto de las células granulosas en la capa de células granulosas interna mostró señal positiva. Además, la corteza es generalmente bastante positiva, y las neuronas individuales en la corteza mostraron una tinción positiva clara. El hipocampo mostró una fuerte señal de CCX-CKR2 en neuronas del giro dentado y CA1-3. Además, el córtex que yace encima también fue positivo.

Estos datos proporcionan cierta comprensión con respecto a la relevancia potencial de CCX-CKR2 para tumores cerebrales. El CCX-CKR2 no se expresa en las células de la zona ventricular, o gliocitos, en los que se cree que se originan los astrocitomas. Por el contrario, existe cierta expresión en lo que parece ser un subconjunto de células granulosas del cerebelo, el tipo celular a partir del cual derivan los meduloblastomas. El perfil de expresión para CCX-CKR2 es muy diferente de aquel observado para el otro receptor de SDF-1 CXCR4, como se describe por otros.

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra la eficacia de un competidor del ligando de CCX-CKR2 en un modelo de xenoinjerto de ratón de carcinoma pulmonar.

El carcinoma pulmonar es la causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos de América. CCX-CKR2 se expresa en carcinoma pulmonar así como en endotelio activado. Se evaluaron los efectos de la administración de un competidor del ligando de CCX-CKR2, un compuesto de la serie 700, en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón.

En el estudio de xenoinjerto de carcinoma de pulmón, se implantaron fragmentos de tumor A549 (30-40 mg) en el espacio subcutáneo en ratones atímicos. Se permitió que los tumores crecieran hasta aproximadamente 150 mg en tamaño (entre 100 y 200 mg), momento en el cual los ratones se enrolaron en el estudio y comenzó el tratamiento. Los ratones se trataron con el competidor del ligando de CCX-CKR2 (25 mpk; administración sc, Q1D) o el control del vehículo. Se incluyó melfalán como el control positivo (9 mpk/dosis, administración ip, Q4Dx3). Los tumores se midieron dos veces a la semana con un calibre en dos dimensiones, y se convirtieron en masa tumoral usando la fórmula para un elipsoide oblongo ($a \times b^2/2$), en la que a es la dimensión más larga y b es la dimensión más corta, y suponiendo densidad unidad ($1\ mm^3 = 1$ mg). Los pesos corporales también se midieron dos veces a la semana para evaluar cualesquiera efectos adversos de la dosificación del compuesto. La actividad antitumoral se evaluó mediante el retraso en el crecimiento tumoral del grupo tratado, en comparación con el grupo de control tratado con vehículo.

Los ratones que recibieron el competidor mostraron una carga tumoral reducida en comparación con el grupo tratado con vehículo. Esta diferencia en el volumen tumoral fue estadísticamente significativa entre estos grupos, y representa una relación del 32% en el volumen tumoral promedio. El melfalán también redujo el volumen tumoral con una reducción del 60% en el volumen tumoral promedio. Adicionalmente, el tratamiento diario con el competidor fue bien tolerado en este estudio, según se determina mediante la ganancia de peso en los animales tratados con compuesto, consistente con la de los ratones tratados con vehículo.

Los pesos tumorales se evaluaron en el día final del tratamiento con compuesto (día 49). Los ratones tratados con el competidor de CCX-CKR2 mostraron tumores que fueron estadísticamente más pequeños que aquellos en el grupo de control con vehículo. De forma similar, los ratones que recibieron melfalán también presentaron tumores significativamente más pequeños que el grupo tratado con vehículo.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a título de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, resultará evidente para el experto ordinario en la materia a partir de las enseñanzas de esta invención que pueden introducirse en la misma cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se define mediante las reivindicaciones.

Listado de secuencias

SEC ID nº 1 secuencia codificante de CCX-CKR2

```
ATGGATCTGCATCTCTTCGACTACTCAGAGCCAGGGAACTTCTCGGACATCAGCTGGCCATGCAACAGCAGCGAC
TGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACATGCCCAACAAAAGCGTCCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATT
TACATTTTCATCTTCGTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGACCACA
GGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTGGGTTGTCCTCACCATCCCAGTCTGG
GTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAACCAGTGGCCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCC
ATCAACCTCTTCGGCAGCATTTTCTTCCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACCTACTTCACC
AACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCGTCTGCATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTG
TCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAAGACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCCTTCTAC
CCCGAGCACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCTTTGCCGTTCCCTTC
TCCATTATCGCTGTCTTCTACTTCCTGCTGGCCAGAGCCATCTCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGC
CGGAAGATCATCTTCTCCTACGTGGTGGTCTTCCTTGTCTGCTGGCTGCCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGAC
ATCTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTCACGGCCCTGCATGTCACA
CAGTGCCTGTCGCTGGTGCACTGCTGCGTCAACCCTGTCCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAG
CTGATGAAGGCCTTCATCTTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTCTCA
GAGACGGAGTACTCTGCCTTGGAGCAGAGCACCAAATGA
```

SEC ID nº 2 secuencia de aminoácidos de CCX-CKR2

```
MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSVLLYTLSFIYIFIFVIGMIANSVVVWVNIQAKTT
GYDTHCYILNLAIADLWVVLTIPVWVVSLVQHNQWPMGELTCKVTHLIFSINLFGSIFFLTCMSVDRYLSITYFT
NTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFCVSLPDTYYLKTVTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPF
SIIAVFYFLLARAISASSDQEKHSSRKIIFSYVVVFLVCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEHALFTALHVT
QCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYSAKTGLTKLIDASRVSETEYSALEQSTK
```

SEC ID nº 3 secuencia codificante de CCX-CKR2.2

ATGGATCTGCACCTCTTCGACTACGCCGAGCCAGGCAACTTCTCGGACATCAGCT
GGCCATGCAACAGCAGCGACTGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACA
TGCCCAACAAAAGCGTCCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATTTACATTTTCATCTTC
GTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGA
CCACAGGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTG
GGTTGTCCTCACCATCCCAGTCTGGGTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAACCAGTGG
CCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCCATCAACCTCT
TCAGCGGCATTTTCTTCCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACC
TACTTCACCAACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCGTCTGC
ATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTGTCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAA
GACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCCTTCTACCCCGAG
CACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCT
TTGCCGTTCCCTTCTCCATTATCGCTGTCTTCTACTTCCTGCTGGCCAGAGCCATC
TCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGCCGGAAGATCATCTTCTCCTAC
GTGGTGGTCTTCCTTGTCTGCTGGCTGCCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGACA
TCTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTC
ACGGCCCTGCATGTCACACAGTGCCTGTCGCTGGTGCACTGCTGCGTCAACCCTG
TCCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAGCTGATGAAGGCCTTCAT
CTTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTG
TCGGAGACGGAGTACTCCGCCTTGGAGCAAAACGCCAAGTGA

SEC ID nº 4 secuencia de aminoácidos de CCX-CKR2.2

MDLHLFDYAEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSVLLYTLSFIYIFIFVIGM
IANSVVVWVNIQAKTTGYDTHCYILNLAIADLWVVLTIPVWVVSLVQHNQWPMGEL
TCKVTHLIFSINLFSGIFFLTCMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFC
VSLPDTYYLKTVTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIIAVFYF
LLARAISASSDQEKHSSRKIIFSYVVVFLVCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEHAL
FTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYSAKTGLTKLIDASRVSE
TEYSALEQNAK

SEC ID nº 5 secuencia codificante de CCX-CKR2.3

ATGGATCTGCATCTCTTCGACTACTCAGAGCCAGGGAACTTCTCGGACATCAGCT
GGCCATGCAACAGCAGCGACTGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACA
TGCCCAACAAAAGCGTCCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATTTACATTTTCATCTTC
GTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGA
CCACAGGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTG
GGTTGTCCTCACCATCCCAGTCTGGGTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAACCAGTGG
CCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCCATCAACCTCT
TCGGCAGCATTTTCTTCCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACC
TACTTCACCAACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCGTCTGC
ATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTGTCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAA
GACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCCTTCTACCCCGAG
CACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCT
TTGCCGTTCCCTTCTCCATTGTCGCTGTCTTCTACTTCCTGCTGGCCAGAGCCATC
TCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGCCGGAAGATCATCTTCTCCTAC
GTGGTGGTCTTCCTTGTCTGCTGGTTGCCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGACAT
CTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTCA
CGGCCCTGCATGTCACACAGTGCCTGTCGCTGGTGCACTGCTGCGTCAACCCTGT
CCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAGCTGATGAAGGCCTTCATC
TTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTCT
CAGAGACGGAGTACTCTGCCTTGGAGCAGAGCACCAAATGA

SEC ID nº 6 secuencia de aminoácidos de CCX-CKR2.3

MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSVLLYTLSFIYIFIFVIGM
IANSVVVWVNIQAKTTGYDTHCYILNLAIADLWVVLTIPVWVVSLVQHNQWPMGEL
TCKVTHLIFSINLFGSIFFLTCMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFC
VSLPDTYYLKTVTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIVAVFY
FLLARAISASSDQEKHSSRKIIFSYVVVFLVCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEHA
LFTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYSAKTGLTKLIDASRVS
ETEYSALEQSTK

SEC ID nº 7 secuencia codificante de CCX-CKR2.4

ATGGATCTGCATCTCTTCGACTACTCAGAGCCAGGGAACTTCTCGGACATCAGCT
GGCCATGCAACAGCAGCGACTGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACA
TGCCCAACAAAAGCGTCCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATTTACATTTTCATCTTC
GTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGA
CCACAGGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTG

GGTTGTCCTCACCATCCCAGTCTGGGTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAACCAGTGG
CCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCCATCAACCTCT
TCGGCAGCATTTTCTTCCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACC
TACTTCACCAACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCGTCTGC
ATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTGTCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAA
GACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCCTTCTACCCCGAG
CACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCT
TTGCCGTTCCCTTCTCCATTATCGCTGTCTTCTACTTCCTGCTGGCCAGAGCCATC
TCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGCCGGAAGATCATCTTCTCCTAC
GTGGTGGTCTTCCTTGTCTGCTGGCTGCCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGACA
TCTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTC
ACGGCCCTGCATGTCACACAGTGCCTGTCGCTGGTGCACTGCTGCGTCAACCCTG
TCCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAGCTGATGAAGGCCTTCAT
CTTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTC
TCAGAGACGGAGTACTCTGCCTTGGAGCAGAGCACCAAATGA

SEC ID nº 8 secuencia de aminoácidos de CCX-CKR2.4

MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSVLLYTLSFIYIFIFVIGM
IANSVVVWVNIQAKTTGYDTHCYILNLAIADLWVVLTIPVWVVSLVQHNQWPMGEL
TCKVTHLIFSINLFGSIFFLTCMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFC
VSLPDTYYLKTVTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIIAVFYF
LLARAISASSDQEKHSSRKIIFSYVVVFLVCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEHAL
FTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYSAKTGLTKLIDASRVSE
TEYSALEQSTK

SEC ID nº 9 secuencia codificante de CCX-CKR2.5

ATGGATCTGCATCTCTTCGACTACTCAGAGCCAGGGAACTTCTCGGACATCAGCT
GGCCGTGCAACAGCAGCGACTGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACA
TGCCCAACAAAAGCGTCCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATTTACATTTTCATCTTC
GTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGA
CCACAGGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTG
GGTTGTCCTCACCATCCCAGTCTGGGTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAACCAGTGG
CCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCCATCAACCTCT
TCAGCAGCATTTTCTTCCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACC
TACTTCACCAACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCGTCTGC
ATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTGTCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAA
GACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCCTTCTACCCCGAG
CACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCT
TTGCCGTTCCCTTCTCCATTATCGCTGTCTTCTACTTCCTGCTGGCCAGAGCCATC
TCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGCCGGAAGATCATCTTCTCCTAC
GTGGTGGTCTTCCTTGTCTGCTGGTTGCCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGACAT
CTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTCA
CGGCCCTGCATGTCACACAGTGCCTGTCGCTGGTGCACTGCTGCGTCAACCCTGT
CCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAGCTGATGAAGGCCTTCATC
TTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTCT
CAGAGACGGAGTACTCCGCCTTGGAGCAGAGCACCAAATGA

SEC ID nº 10 secuencia de aminoácidos de CCX-CKR2.5

MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSVLLYTLSFIYIFIFVIGM
IANSVVVWVNIQAKTTGYDTHCYILNLAIADLWVVLTIPVWVVSLVQHNQWPMGEL
TCKVTHLIFSINLFSSIFFLTCMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFC
VSLPDTYYLKTVTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIIAVFYF
LLARAISASSDQEKHSSRKIIFSYVVVFLVCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEHAL
FTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYSAKTGLTKLIDASRVSE
TEYSALEQSTK

REIVINDICACIONES

1. Método de cribado de un agente que se une a CCX-CKR2 sobre una célula, comprendiendo el método

poner en contacto una pluralidad de agentes con un polipéptido de CCX-CKR2 que comprende un dominio extracelular al menos 95% idéntico a un dominio extracelular de SEC ID nº:2, o un fragmento de unión a SDF1 o I-TAC del mismo; y

determinar que un agente compite con I-TAC o SDF1 por la unión al polipéptido de CCX-CKR2 o su fragmento;

en el que el método se lleva a cabo como un ensayo *in vitro* o basado en células.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la célula es una célula cancerosa.

3. Método según la reivindicación 1, que comprende además analizar el agente seleccionado respecto a la capacidad para unirse a, o inhibir el crecimiento de, una célula, por ejemplo en el que la célula es una célula cancerosa.

4. Método según la reivindicación 1, que comprende además ensayar el agente seleccionado respecto a la capacidad para cambiar la adhesión celular a las células endoteliales.

5. Método según la reivindicación 1, en el que el agente es un anticuerpo, o en el que el agente es un polipéptido.

6. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de CCX-CKR2 comprende la secuencia presentada en SEC ID nº:2.

7. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de CCX-CKR2 se expresa en una célula que no expresa una versión endógena de CCX-CKR2.

8. Método para determinar la presencia o ausencia de una célula cancerosa, comprendiendo el método

poner en contacto una muestra que comprende una célula con un anticuerpo que se une específicamente con SEC ID nº:2; y

detectar la unión del anticuerpo a un polipéptido de CCX-CKR2 en la muestra, en el que la célula es una célula no fetal y/o una célula distinta de una célula renal o cerebral, y en el que la unión del anticuerpo a la muestra indica la presencia de una célula cancerosa.

9. Método según la reivindicación 8, en el que la muestra procede de un ser humano, o en el que el método se utiliza para diagnosticar el cáncer en un ser humano, o en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, linfoma, glioblastomas, cáncer de próstata, y leucemia, o en el que el cáncer no es sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica o linfoma de efusión primaria asociado al SIDA.

10. Método según la reivindicación 8, en el que el anticuerpo compite con SDF1 e I-TAC por la unión a SEC ID nº:2.

11. Anticuerpo que compite específicamente con SDF1 e I-TAC por la unión a SEC ID nº:2.

12. Anticuerpo según la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

13. Anticuerpo según la reivindicación 12, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

14. siRNA que inhibe la expresión de un polinucleótido de CCX-CKR2 para su utilización en el tratamiento del cáncer.

15. siRNA según la reivindicación 14, para su utilización en el tratamiento del cáncer, en el que el polinucleótido de CCX-CKR2 codifica SEC ID nº:2, o comprende SEC ID nº:1.

16. Anticuerpo que compite con SDF1 e I-TAC por la unión a SEC ID nº:2, para su utilización en el tratamiento del cáncer.

17. Anticuerpo según la reivindicación 16, para su utilización en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, linfoma y glioblastomas, o en el que el cáncer no es sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica o linfoma de efusión primaria asociado al SIDA.

Figura 1A

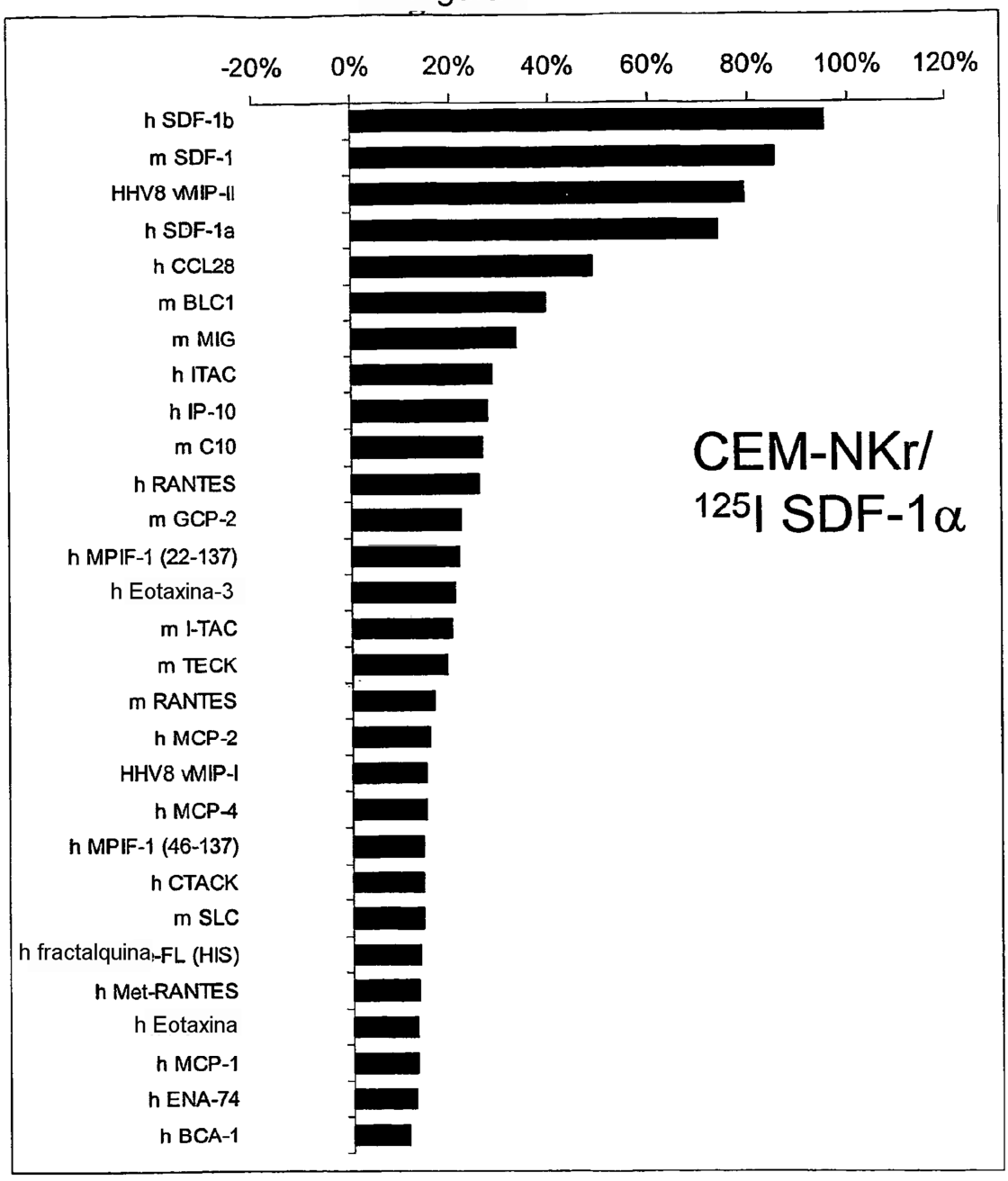

-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
h SDF-1b
m SDF-1
HHV8 vMIP-II
h SDF-1a
h CCL28
m BLC1
m MIG
h ITAC
h IP-10
m C10
h RANTES
m GCP-2
h MPIF-1 (22-137)
h Eotaxina-3
m I-TAC
m TECK
m RANTES
h MCP-2
HHV8 vMIP-I
h MCP-4
h MPIF-1 (46-137)
h CTACK
m SLC
h fractalquina-FL (HIS)
h Met-RANTES
h Eotaxina
h MCP-1
h ENA-74
h BCA-1
CEM-NKr/
125I SDF-1α

Figura 1B

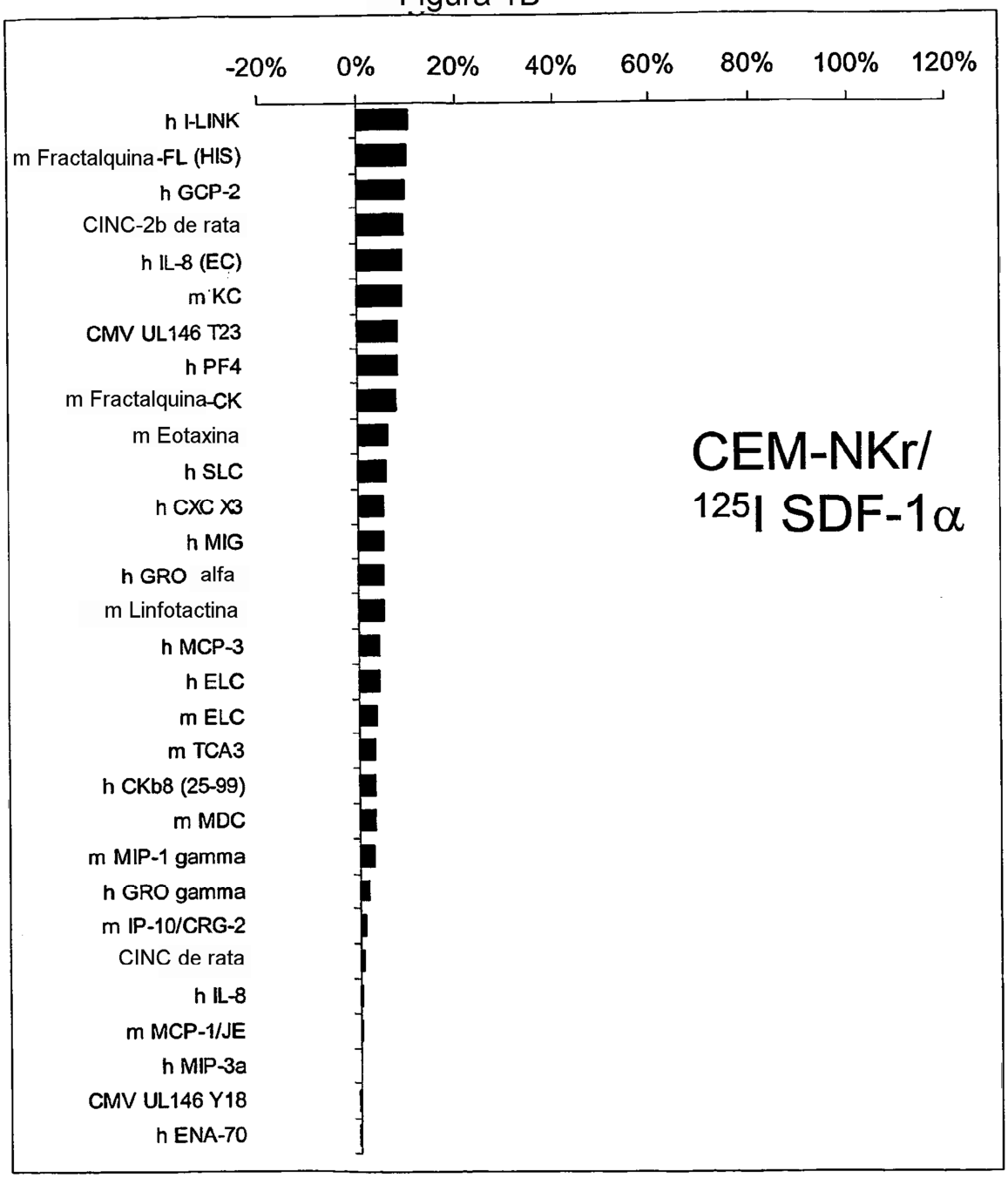

-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
h I-LINK
m Fractalquina-FL (HIS)
h GCP-2
CINC-2b de rata
h IL-8 (EC)
m KC
CMV UL146 T23
h PF4
m Fractalquina-CK
m Eotaxina
h SLC
h CXC X3
h MIG
h GRO alfa
m Linfotactina
h MCP-3
h ELC
m ELC
m TCA3
h CKb8 (25-99)
m MDC
m MIP-1 gamma
h GRO gamma
m IP-10/CRG-2
CINC de rata
h IL-8
m MCP-1/JE
h MIP-3a
CMV UL146 Y18
h ENA-70
CEM-NKr/
125I SDF-1α

Figura 1C

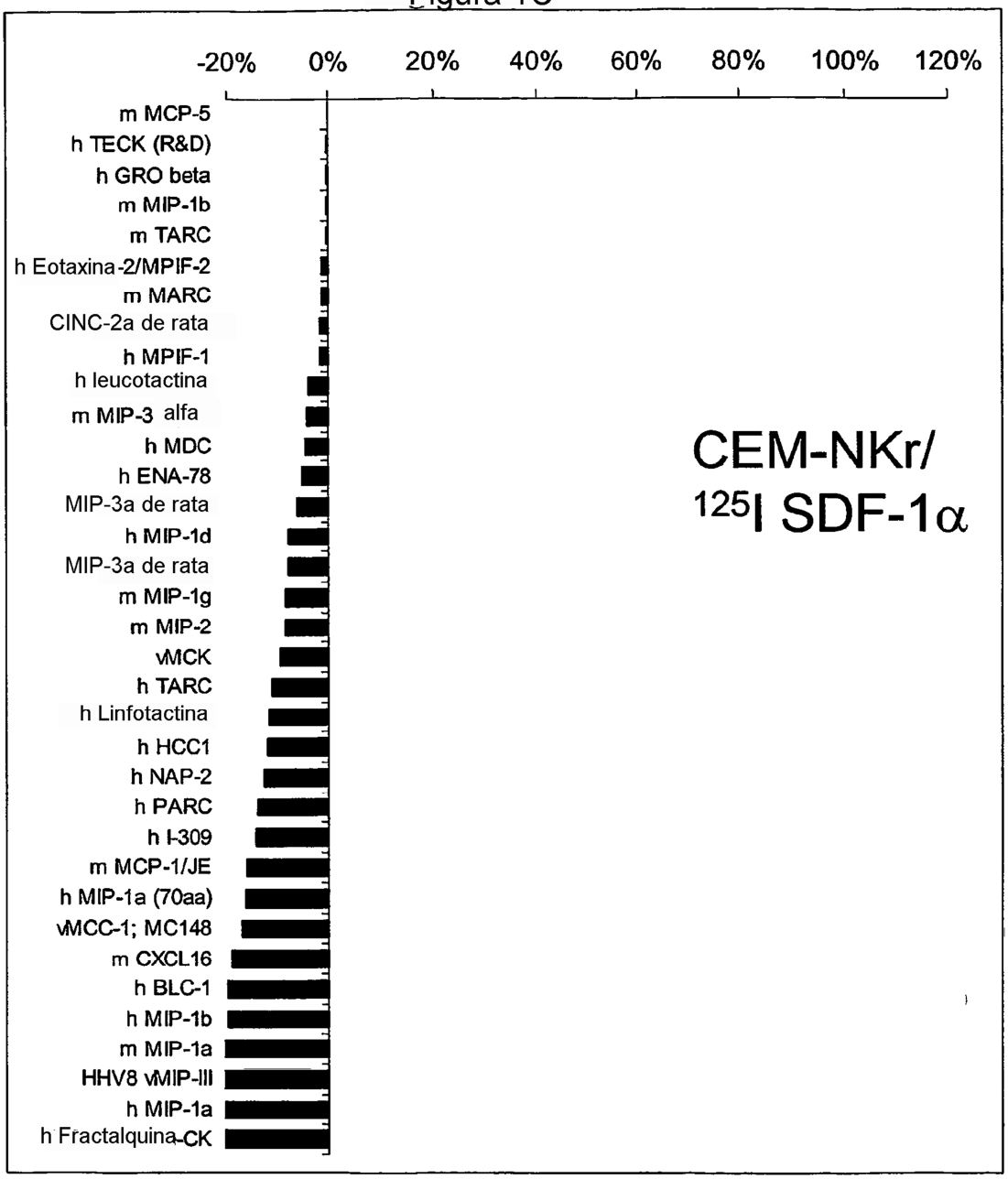

-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
m MCP-5
h TECK (R&D)
h GRO beta
m MIP-1b
m TARC
h Eotaxina-2/MPIF-2
m MARC
CINC-2a de rata
h MPIF-1
h leucotactina
m MIP-3 alfa
h MDC
h ENA-78
MIP-3a de rata
h MIP-1d
MIP-3a de rata
m MIP-1g
m MIP-2
vMCK
h TARC
h Linfotactina
h HCC1
h NAP-2
h PARC
h I-309
m MCP-1/JE
h MIP-1a (70aa)
vMCC-1; MC148
m CXCL16
h BLC-1
h MIP-1b
m MIP-1a
HHV8 vMIP-III
h MIP-1a
h Fractalquina-CK
CEM-NKr/
125I SDF-1α

Figura 1D

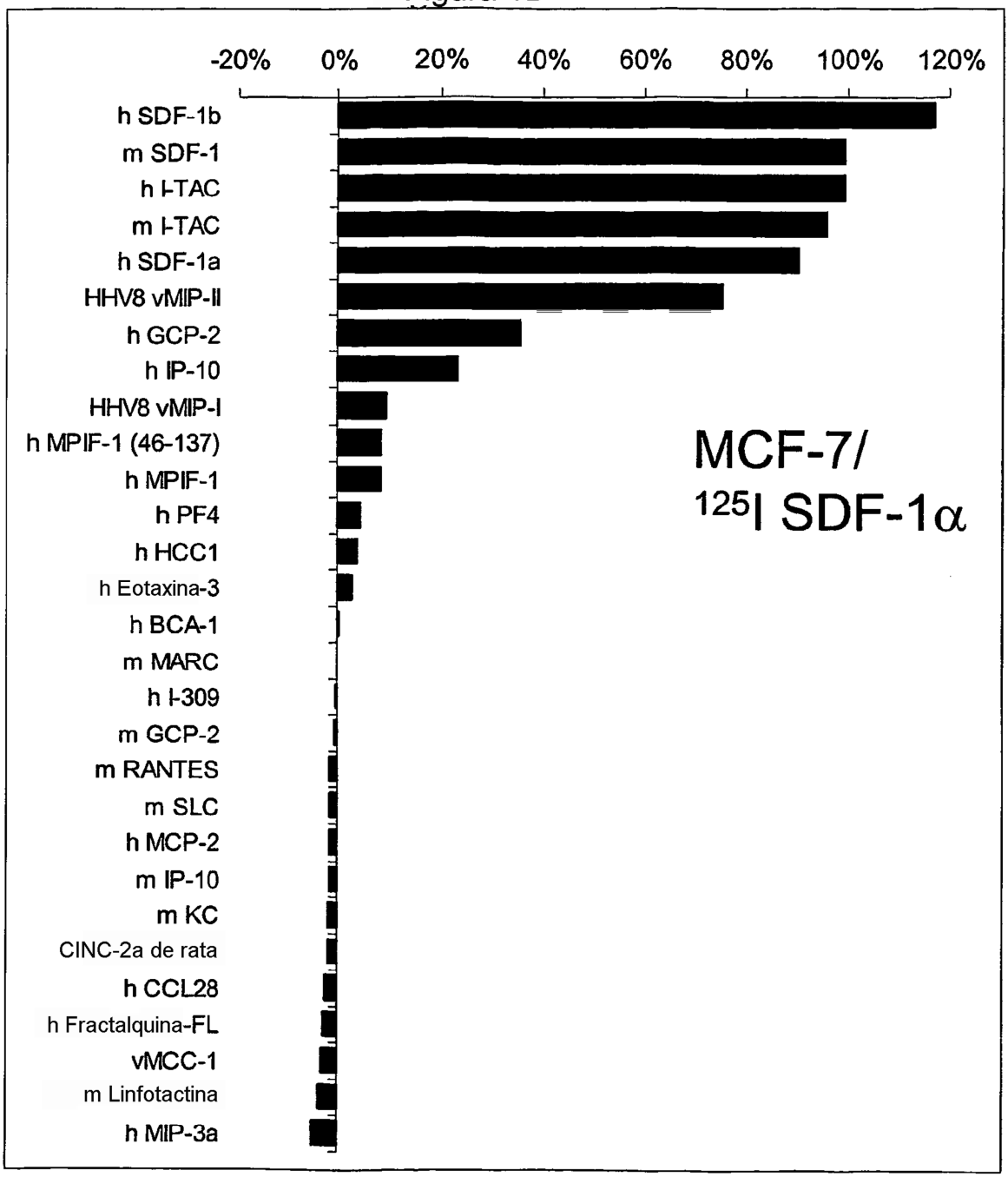

-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
h SDF-1b
m SDF-1
h I-TAC
m I-TAC
h SDF-1a
HHV8 vMIP-II
h GCP-2
h IP-10
HHV8 vMIP-I
h MPIF-1 (46-137)
h MPIF-1
h PF4
h HCC1
h Eotaxina-3
h BCA-1
m MARC
h I-309
m GCP-2
m RANTES
m SLC
h MCP-2
m IP-10
m KC
CINC-2a de rata
h CCL28
h Fractalquina-FL
vMCC-1
m Linfotactina
h MIP-3a
MCF-7/
125I SDF-1α

Figura 1E

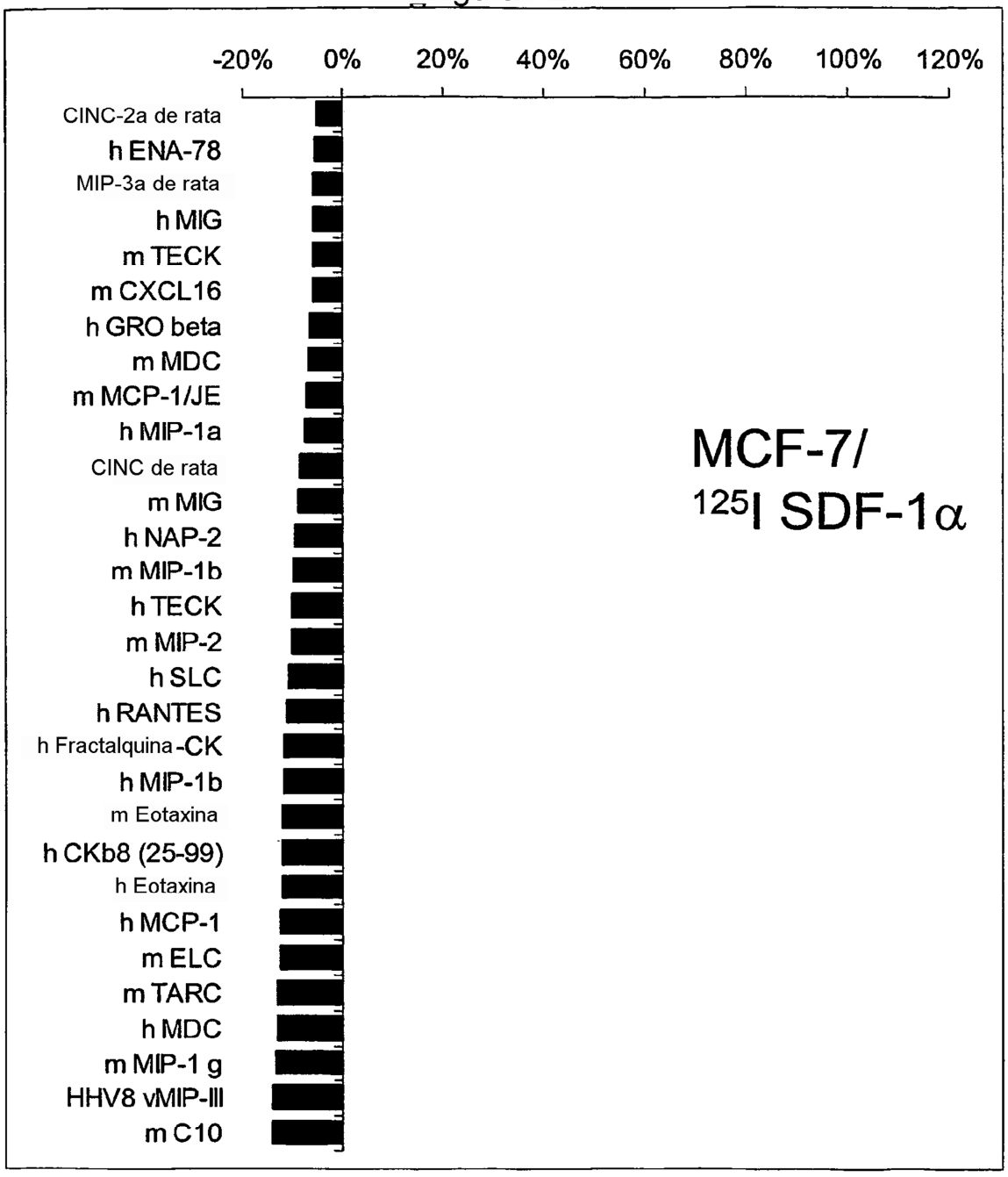

-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
CINC-2a de rata
h ENA-78
MIP-3a de rata
h MIG
m TECK
m CXCL16
h GRO beta
m MDC
m MCP-1/JE
h MIP-1a
CINC de rata
m MIG
h NAP-2
m MIP-1b
h TECK
m MIP-2
h SLC
h RANTES
h Fractalquina-CK
h MIP-1b
m Eotaxina
h CKb8 (25-99)
h Eotaxina
h MCP-1
m ELC
m TARC
h MDC
m MIP-1 g
HHV8 vMIP-III
m C10
MCF-7/
125I SDF-1α

Figura 1F

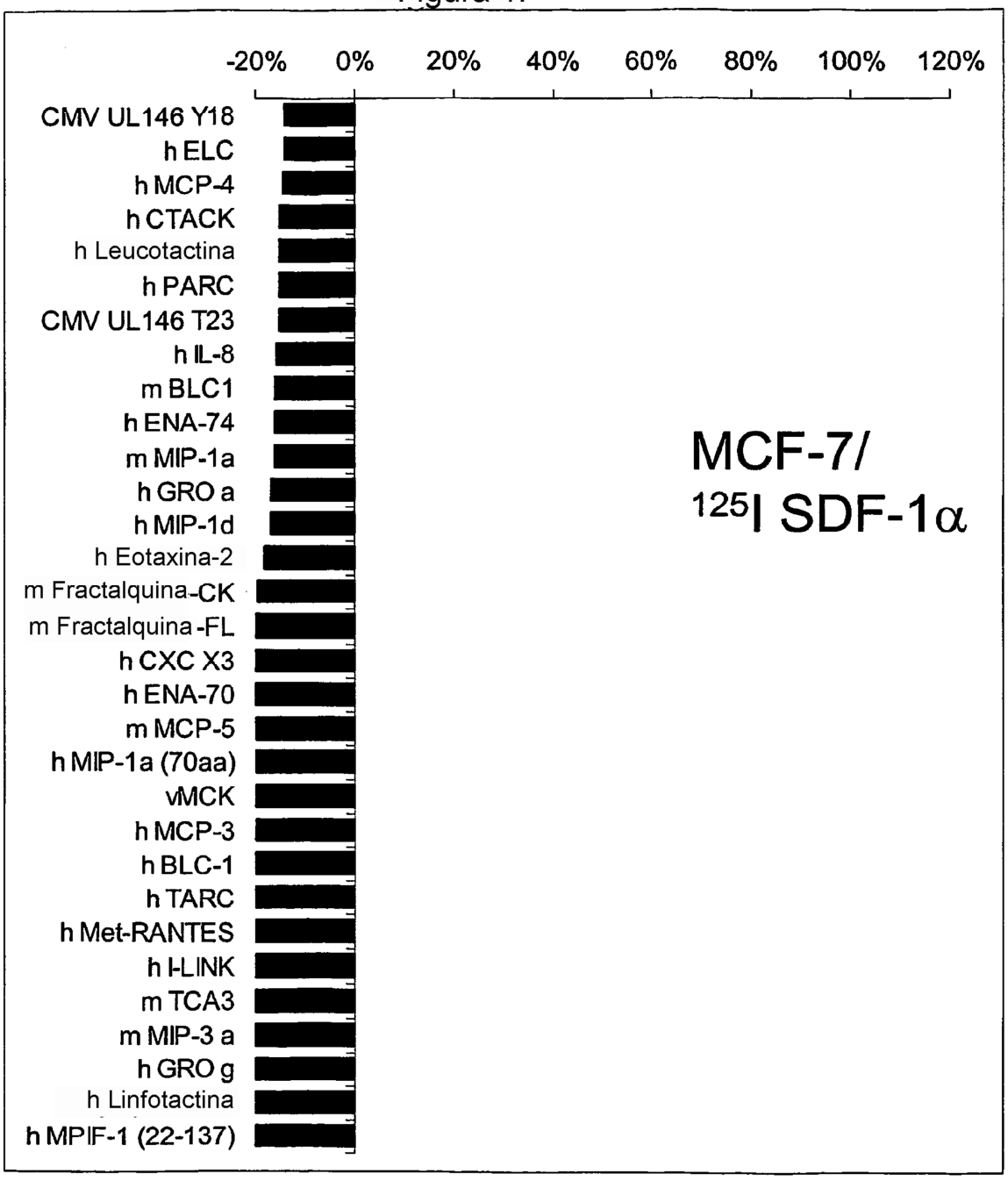

-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
CMV UL146 Y18
h ELC
h MCP-4
h CTACK
h Leucotactina
h PARC
CMV UL146 T23
h IL-8
m BLC1
h ENA-74
m MIP-1a
h GRO a
h MIP-1d
h Eotaxina-2
m Fractalquina-CK
m Fractalquina-FL
h CXC X3
h ENA-70
m MCP-5
h MIP-1a (70aa)
vMCK
h MCP-3
h BLC-1
h TARC
h Met-RANTES
h I-LINK
m TCA3
m MIP-3 a
h GRO g
h Linfotactina
h MPIF-1 (22-137)
MCF-7/
125I SDF-1α

Figura 1G

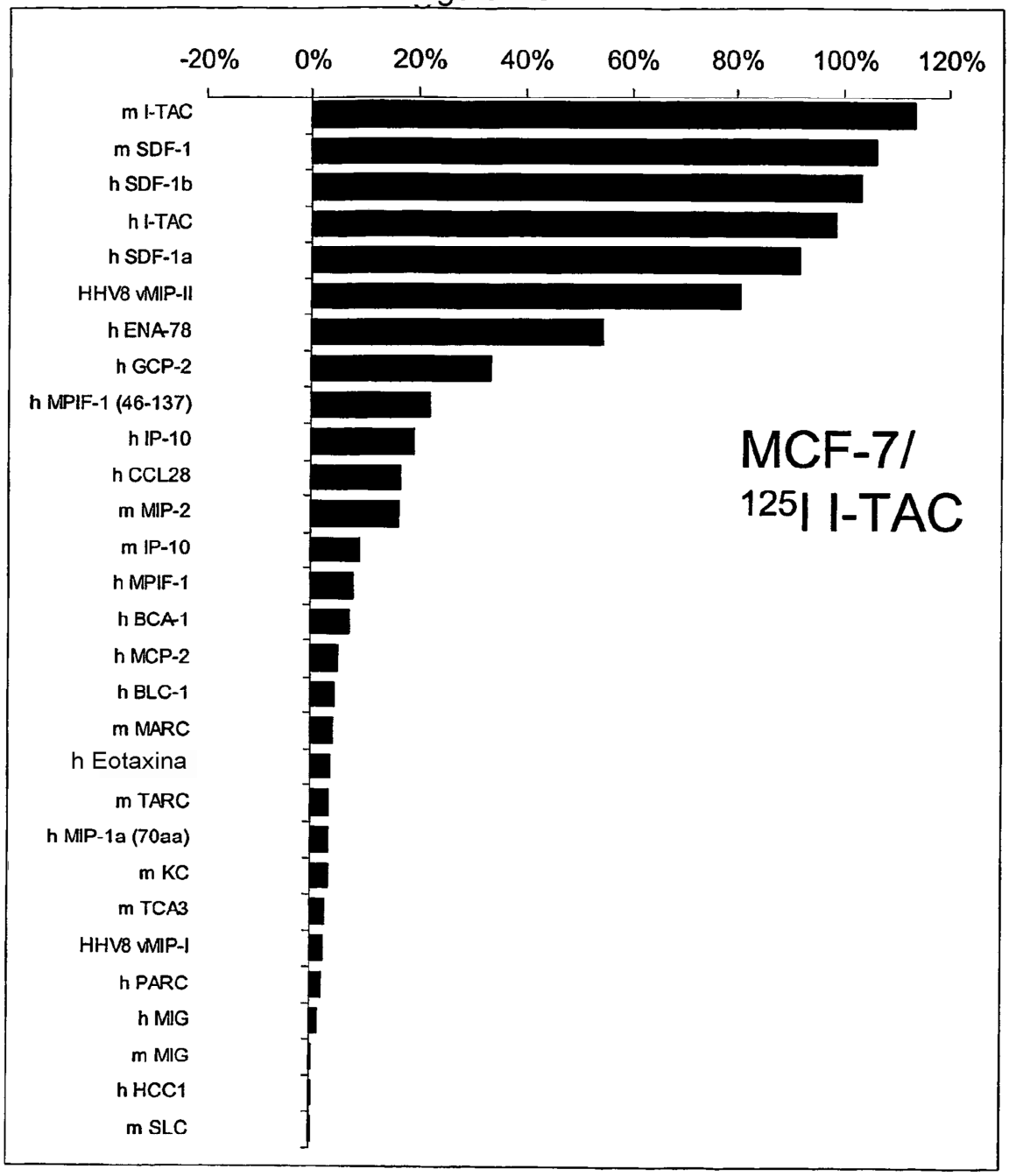

-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
m I-TAC
m SDF-1
h SDF-1b
h I-TAC
h SDF-1a
HHV8 vMIP-II
h ENA-78
h GCP-2
h MPIF-1 (46-137)
h IP-10
h CCL28
m MIP-2
m IP-10
h MPIF-1
h BCA-1
h MCP-2
h BLC-1
m MARC
h Eotaxina
m TARC
h MIP-1a (70aa)
m KC
m TCA3
HHV8 vMIP-I
h PARC
h MIG
m MIG
h HCC1
m SLC
MCF-7/
125I I-TAC

Figura 1H

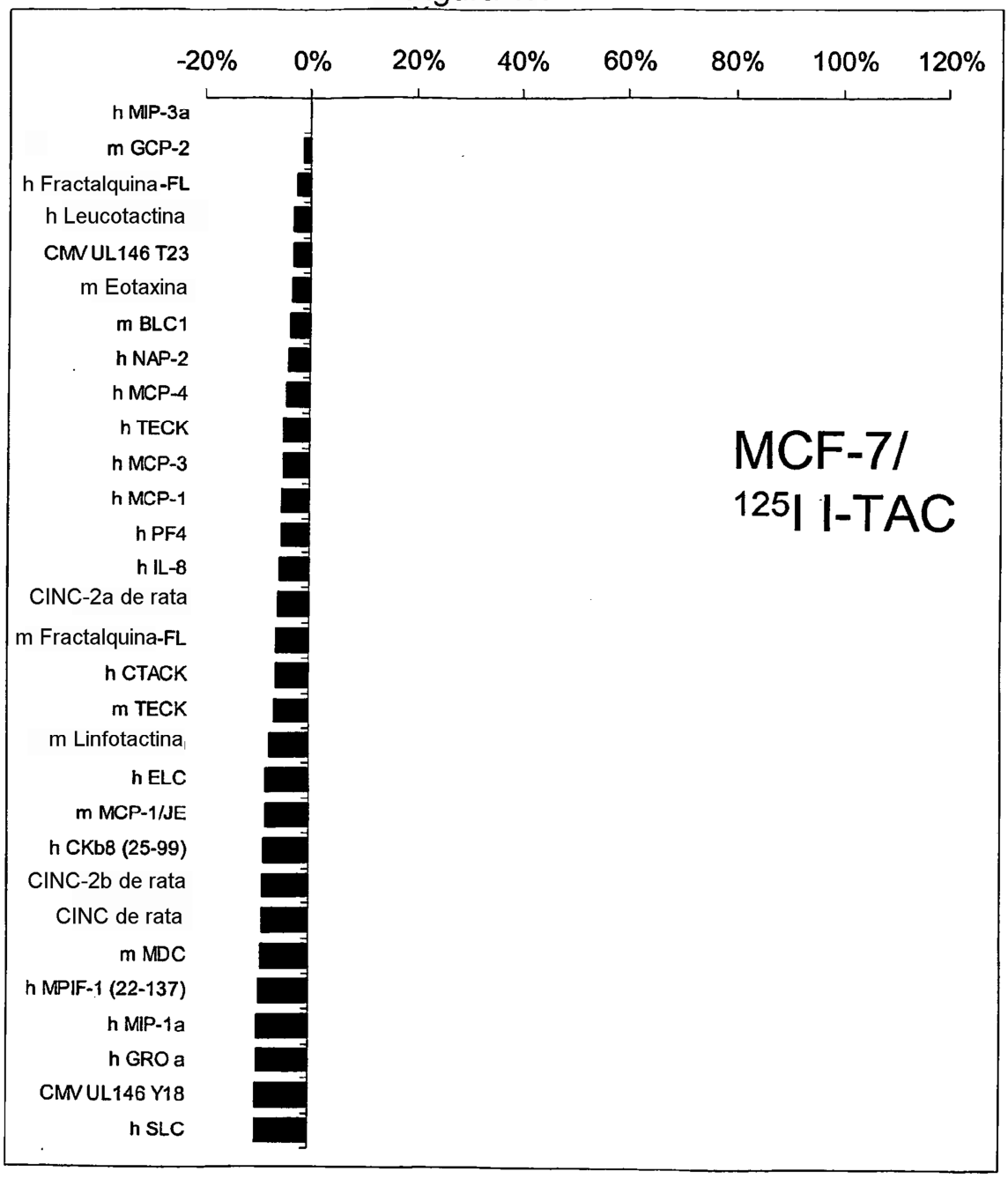

-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
h MIP-3a
m GCP-2
h Fractalquina-FL
h Leucotactina
CMV UL146 T23
m Eotaxina
m BLC1
h NAP-2
h MCP-4
h TECK
h MCP-3
h MCP-1
h PF4
h IL-8
CINC-2a de rata
m Fractalquina-FL
h CTACK
m TECK
m Linfotactina
h ELC
m MCP-1/JE
h CKb8 (25-99)
CINC-2b de rata
CINC de rata
m MDC
h MPIF-1 (22-137)
h MIP-1a
h GRO a
CMV UL146 Y18
h SLC
MCF-7/
125I I-TAC

Figura 1I

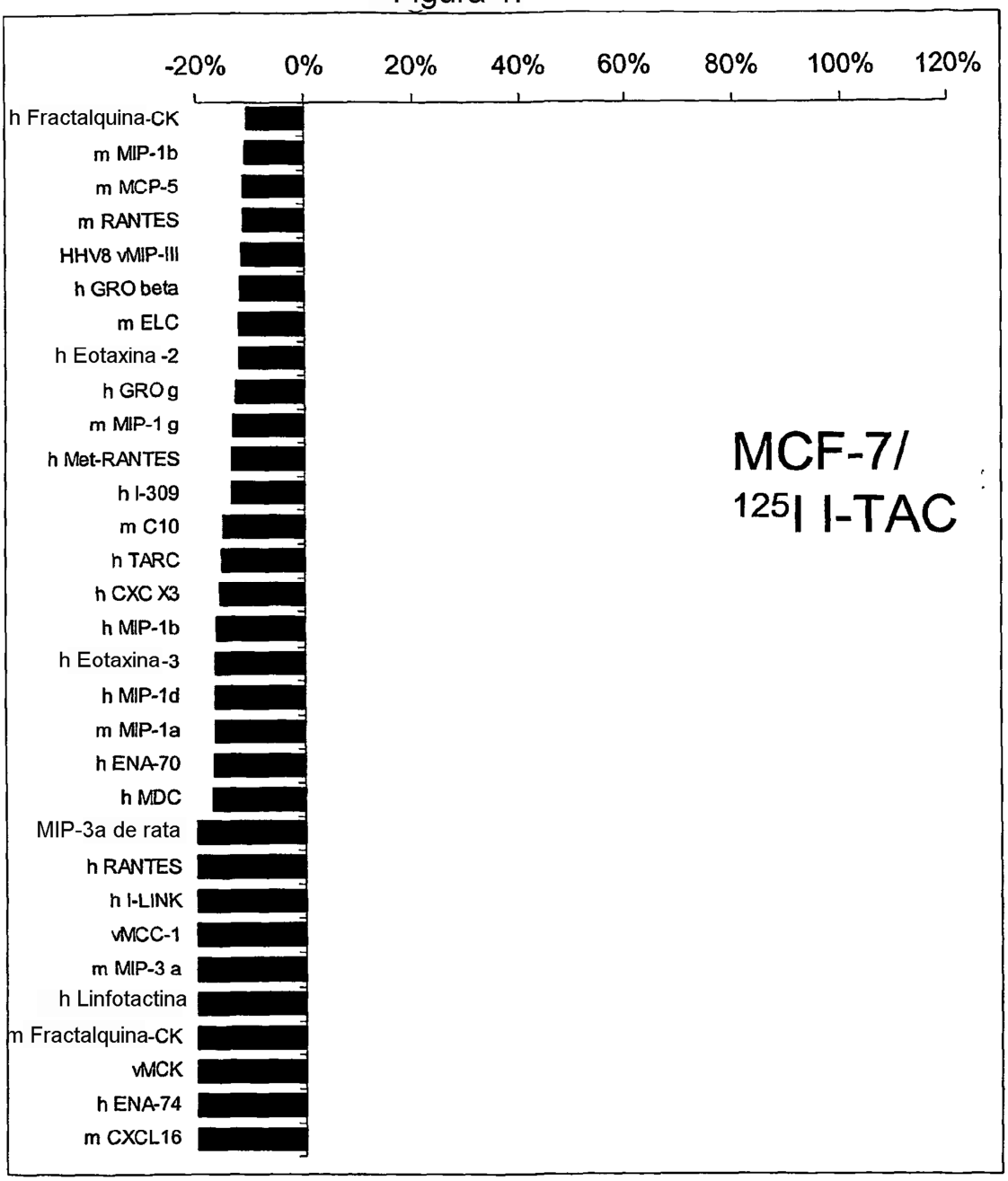

-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
h Fractalquina-CK
m MIP-1b
m MCP-5
m RANTES
HHV8 vMIP-III
h GRO beta
m ELC
h Eotaxina -2
h GRO g
m MIP-1 g
h Met-RANTES
h I-309
m C10
h TARC
h CXC X3
h MIP-1b
h Eotaxina-3
h MIP-1d
m MIP-1a
h ENA-70
h MDC
MIP-3a de rata
h RANTES
h I-LINK
vMCC-1
m MIP-3 a
h Linfotactina
m Fractalquina-CK
vMCK
h ENA-74
m CXCL16
MCF-7/
125I I-TAC

Figura 2

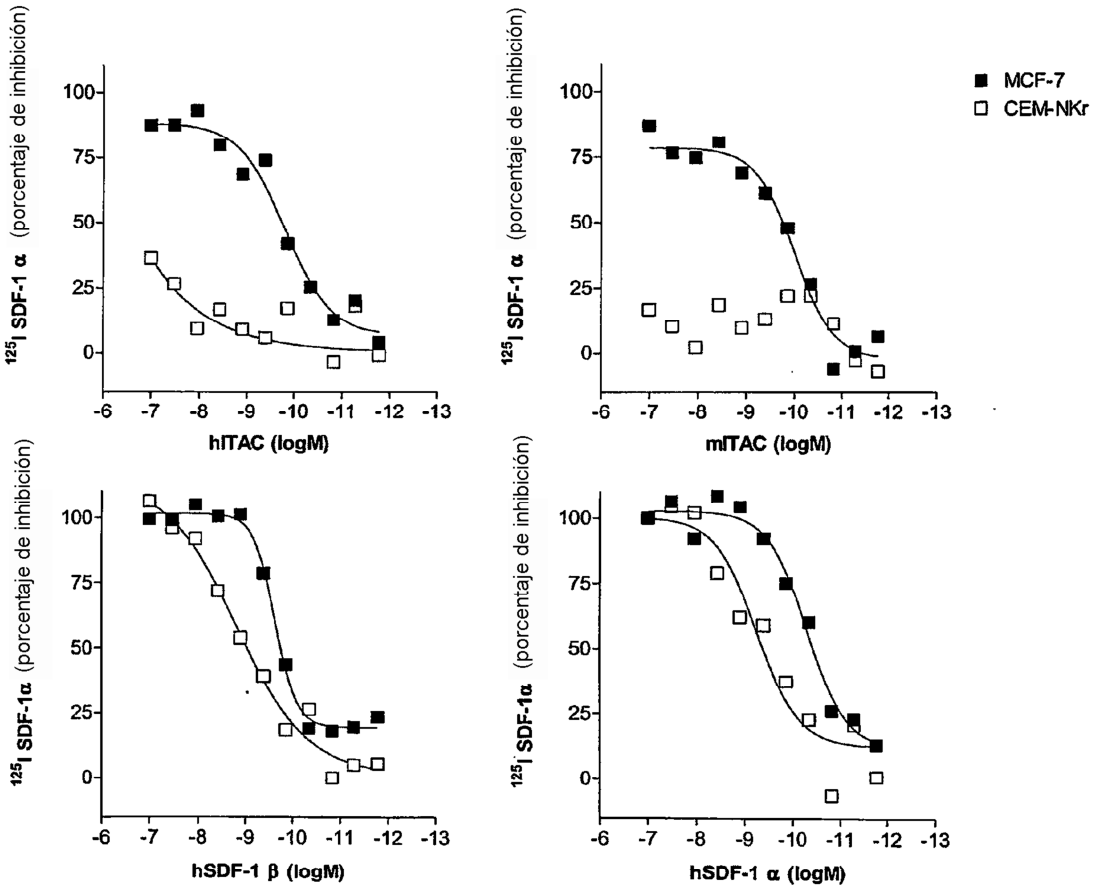

MCF-7
CEM-NKr
^{125}I SDF-1 α (porcentaje de inhibición)
100
75
50
25
0
-6 -7 -8 -9 -10 -11 -12 -13
hITAC (logM)
mITAC (logM)
^{125}I SDF-1α (porcentaje de inhibición)
hSDF-1 β (logM)
hSDF-1 α (logM)

Figura 3

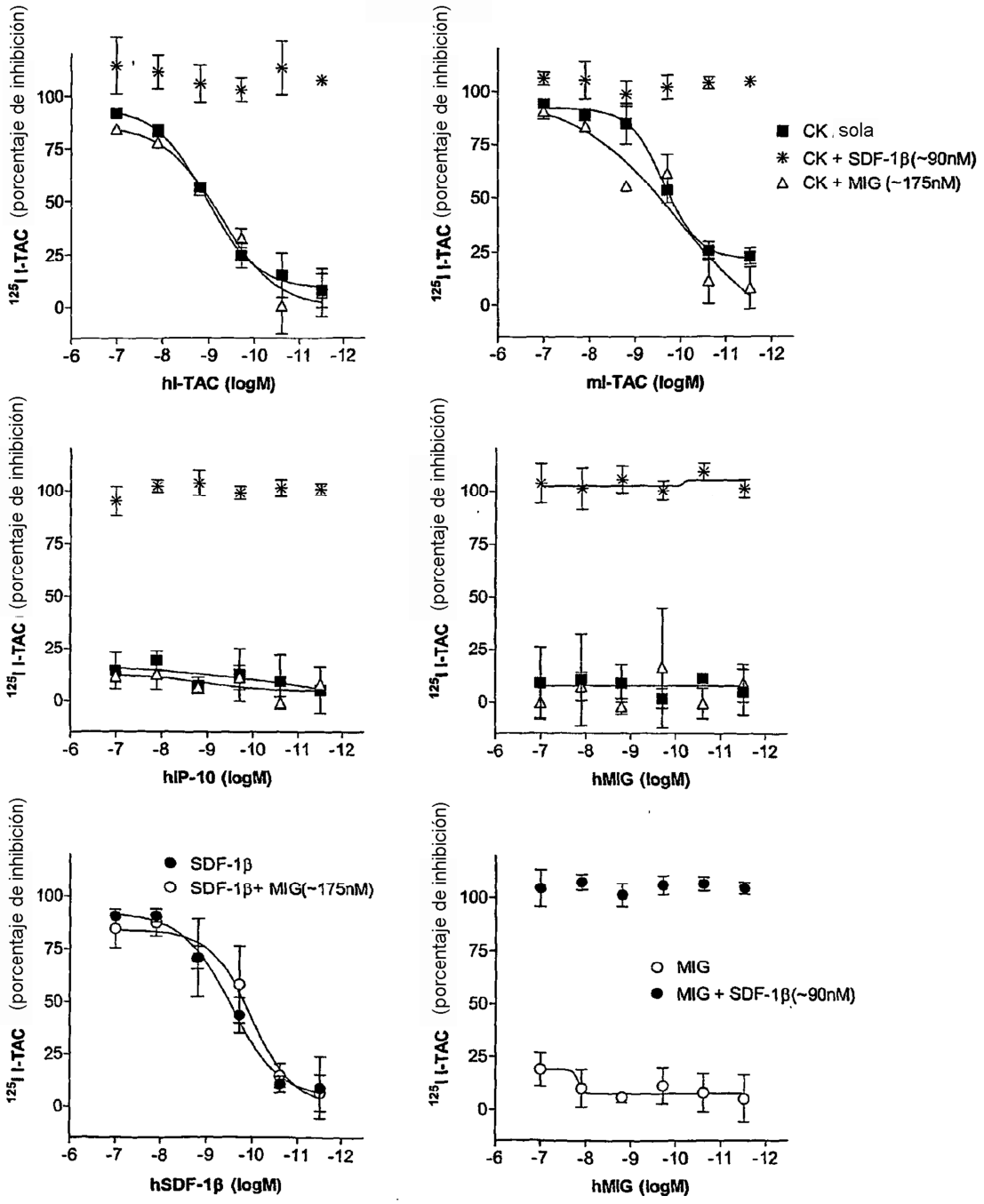

125I I-TAC (porcentaje de inhibición)
hI-TAC (logM)
mI-TAC (logM)
CK sola
CK + SDF-1β(~90nM)
CK + MIG (~175nM)
hIP-10 (logM)
hMIG (logM)
SDF-1β
SDF-1β+ MIG(~175nM)
hSDF-1β (logM)
MIG
MIG + SDF-1β(~90nM)

Figura 4

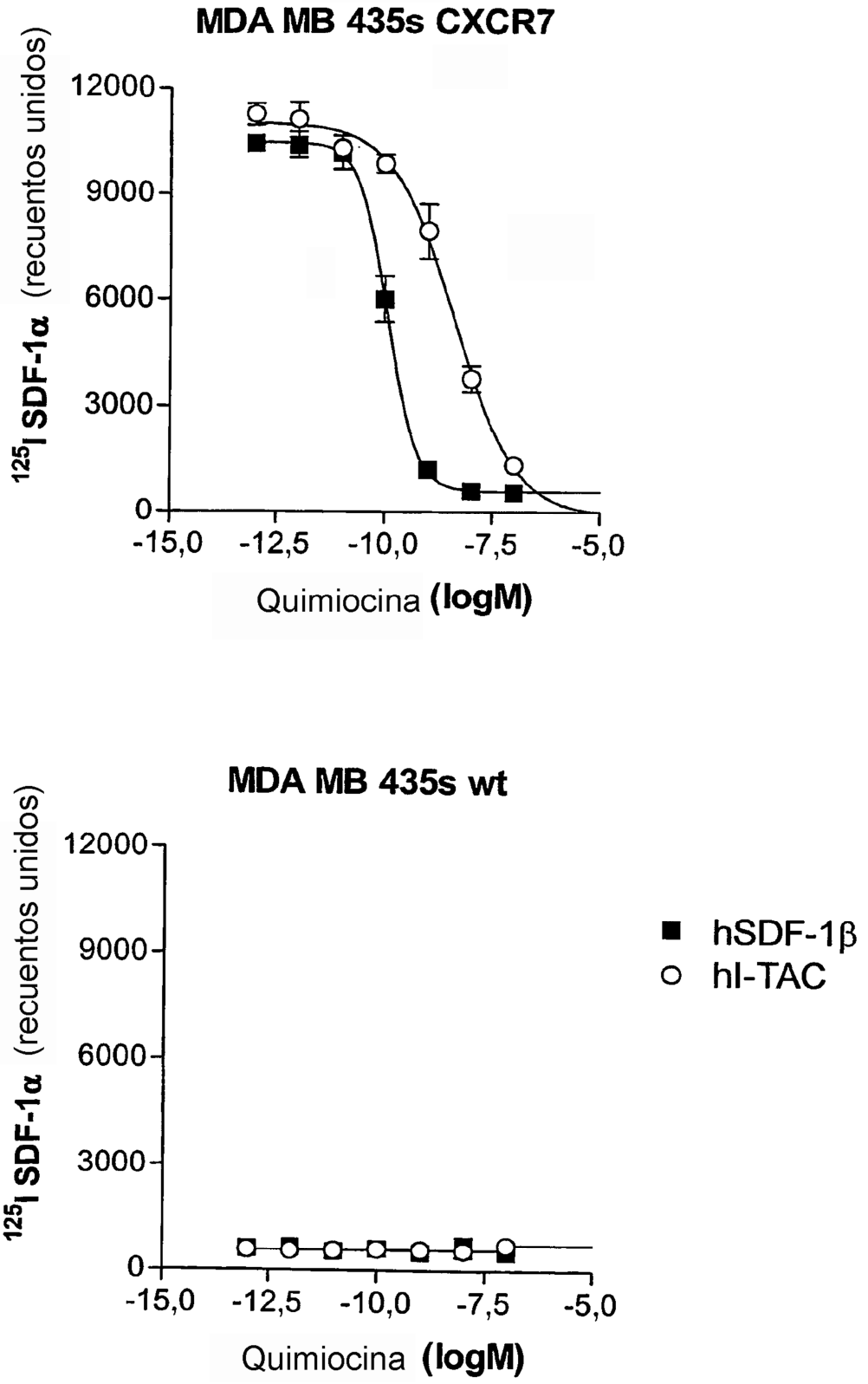

MDA MB 435s CXCR7
^{125}I SDF-1α (recuentos unidos)
12000
9000
6000
3000
0
-15,0
-12,5
-10,0
-7,5
-5,0
Quimiocina (logM)
MDA MB 435s wt
^{125}I SDF-1α (recuentos unidos)
12000
9000
6000
3000
0
-15,0
-12,5
-10,0
-7,5
-5,0
Quimiocina (logM)
hSDF-1β
hI-TAC

Figura 5

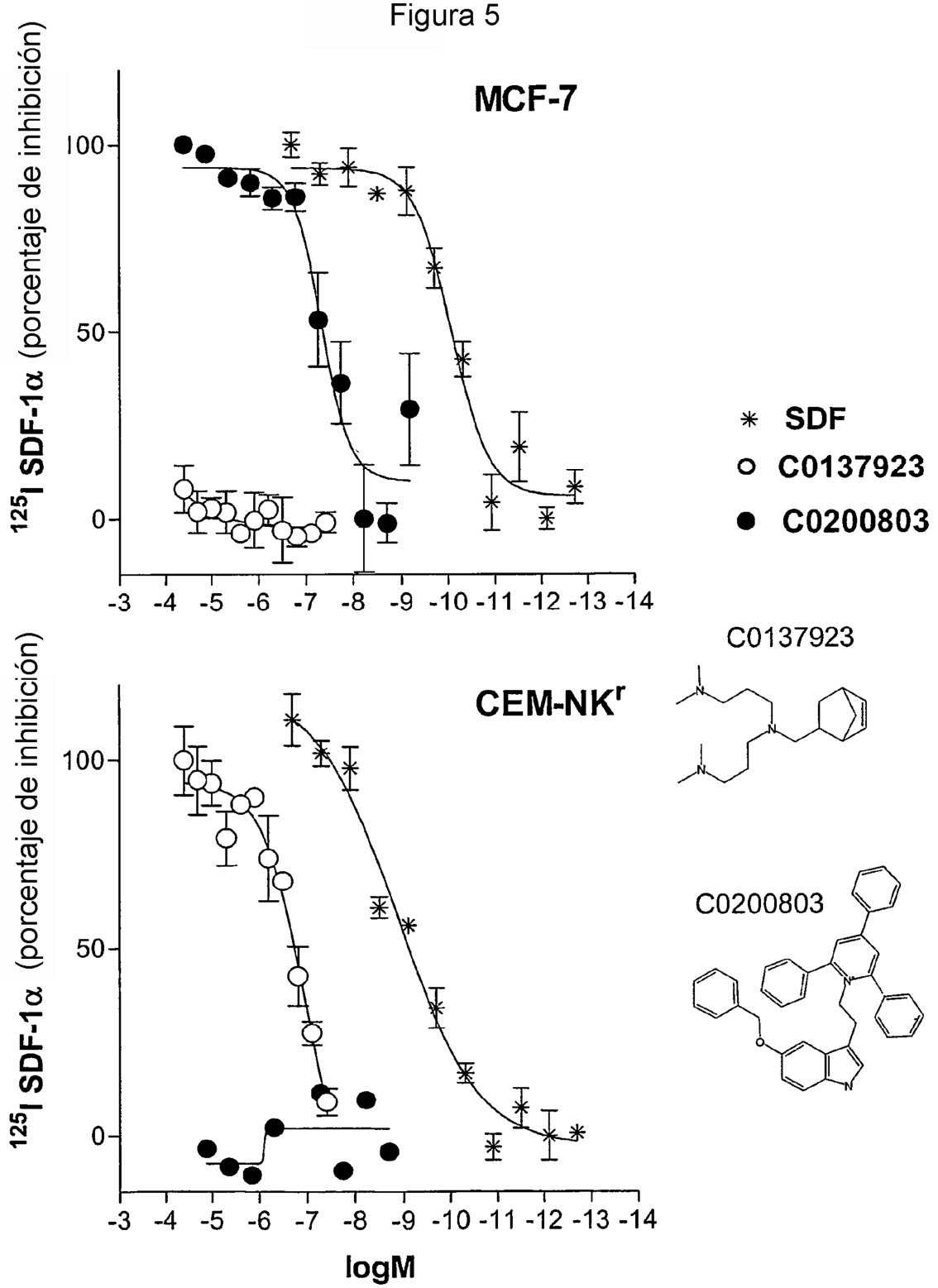

MCF-7
CEM-NK^r
^{125}I SDF-1α (porcentaje de inhibición)
100
50
0
-3 -4 -5 -6 -7 -8 -9 -10 -11 -12 -13 -14
logM
SDF
C0137923
C0200803
C0137923
C0200803

Figura 6

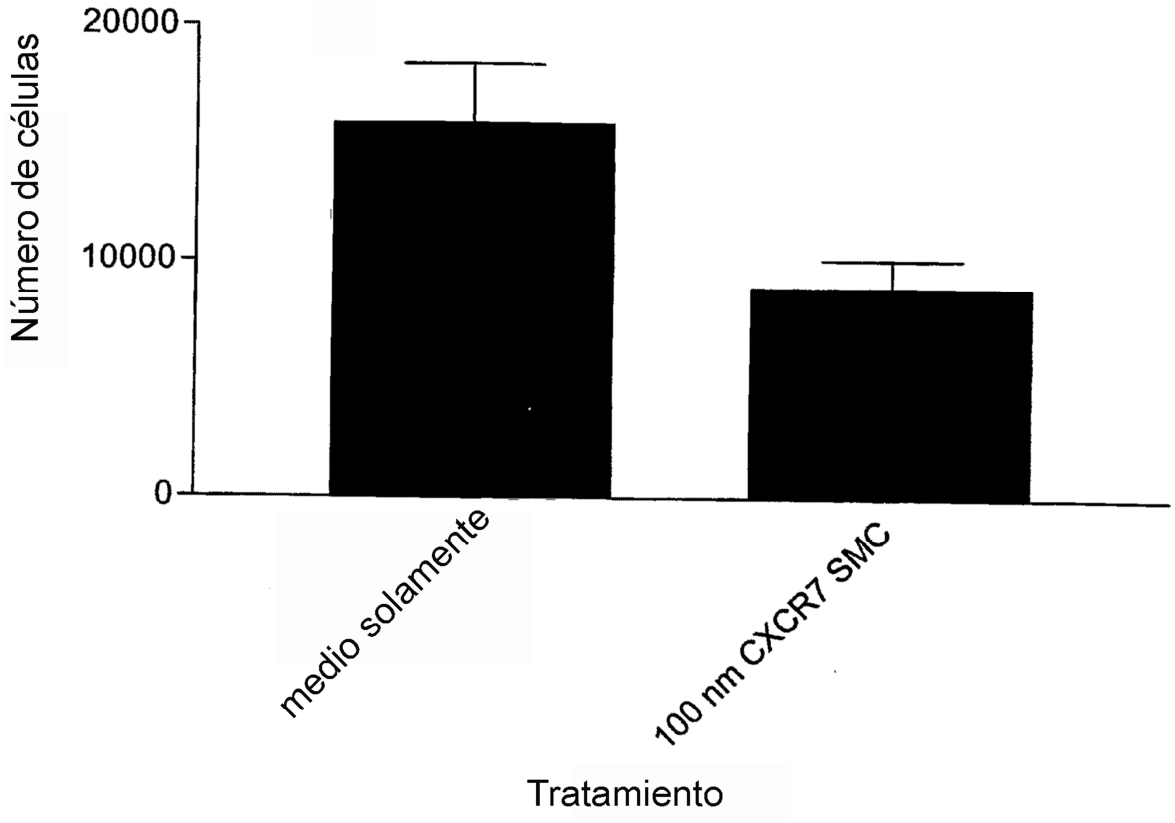

Número de células
20000
10000
0
medio solamente
100 nm CXCR7 SMC
Tratamiento

Figura 7

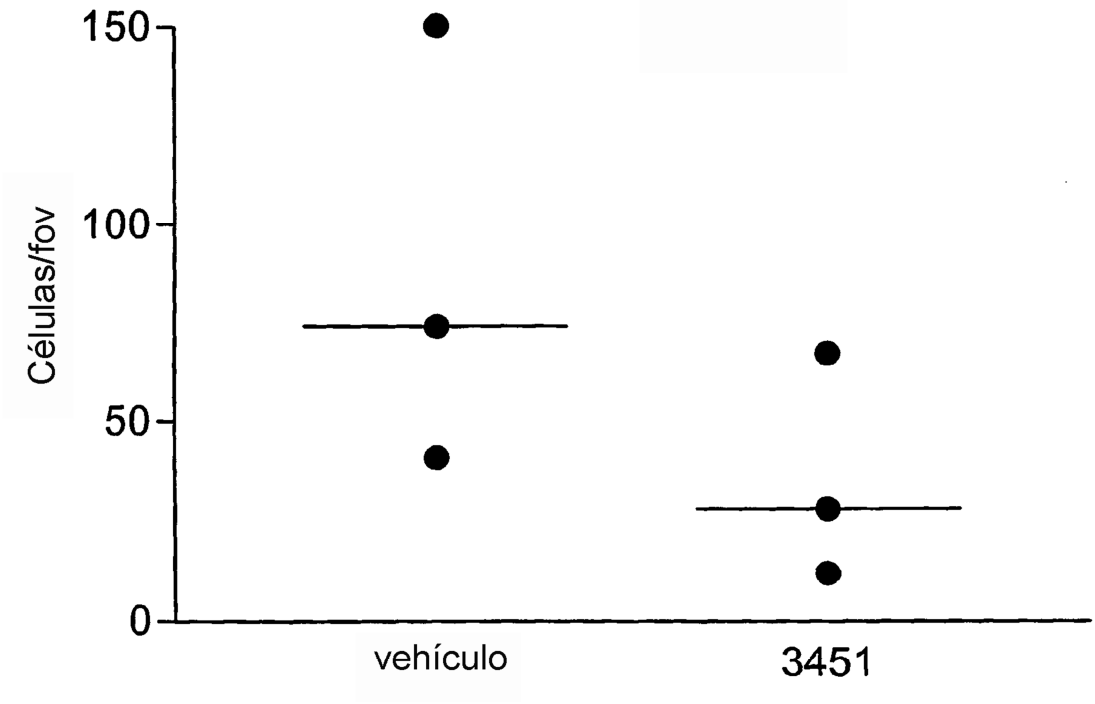
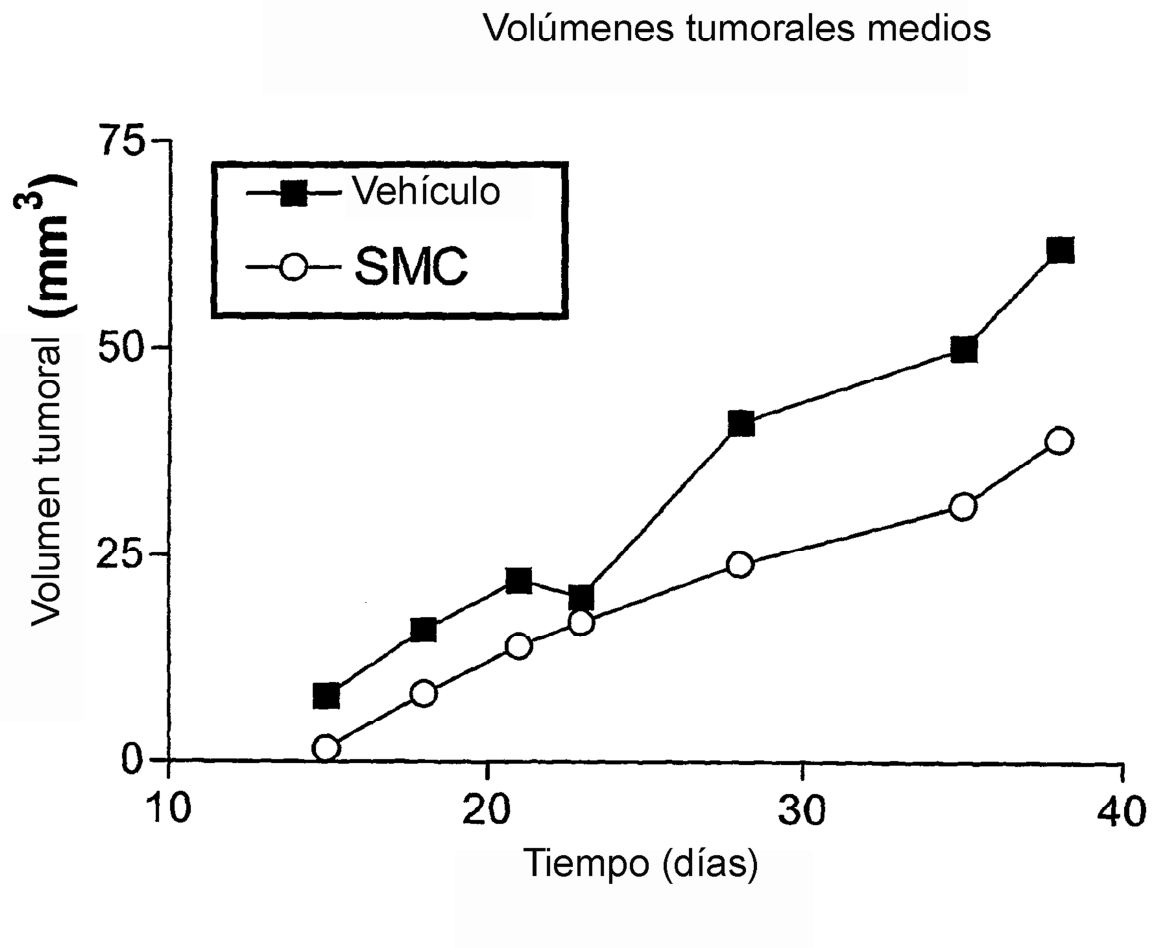


Figura 8


Volúmenes tumorales medios
Vehículo
SMC
Volumen tumoral (mm3)
75
50
25
0
10
20
30
40
Tiempo (días)