



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 041**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/537 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02739361 .0**

86 Fecha de presentación : **22.05.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1417488**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Ensayo de migración celular.**

30 Prioridad: **07.06.2001 US 296682 P**
22.05.2002 US 154399

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es: **ChemoCentryx, Inc.**
850 Maude Avenue
Mountain View, California 94043, US

72 Inventor/es: **Wei, Zheng y**
Miao, Zhenhua

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 274 041 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de migración celular.

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los EE.UU. N° de serie 60/296.682, presentada el 7 de Junio de 2001.

10 **Campo del invento**

El presente invento se dirige a un ensayo para identificar antagonistas de receptores quimioatrayentes, tales como receptores de quimiocinas. Una ventaja del ensayo, en comparación con ensayos anteriores, es su capacidad para discriminar a antagonistas de receptores quimioatrayentes válidos con respecto de los compuestos que generan falsas señales positivas y negativas.

Antecedentes

Los métodos de escrutinio de alto caudal (HTS, de High throughput screening) para identificar antagonistas de receptores quimioatrayentes, recurren con frecuencia a detectar perturbaciones en sucesos que ocurren corriente abajo, tales como una migración de células. En el caso de receptores de quimiocinas, con frecuencia se ensaya la migración de células de leucocitos. Sin embargo, ciertos compuestos que rompen a las membranas celulares o bloquean a sucesos que ocurren corriente abajo, imitan a estos resultados, enmascarándolos como antagonistas candidatos. Se requiere entonces un considerable esfuerzo para distinguir a los genuinos antagonistas con respecto de los compuestos o las moléculas que habrían causado falsas señales positivas. La identificación de antagonistas verdaderos, que representan sólo una fracción muy pequeña de las grandes colecciones de antagonistas candidatos que se analizan en escrutinios de alto caudal, es una tarea formidable. El hecho de conseguir cualesquiera ahorros en tiempo o gastos puede aportar un nuevo fármaco a los pacientes de una manera más rápida y menos costosa.

Los ensayos convencionales, que están adaptados para su uso en métodos del tipo HTS para escrutar antagonistas con moléculas pequeñas de interacciones entre ligandos y receptores, son usualmente unidimensionales. Esto es, ellos aíslan y ensayan solamente la interacción de ligandos y receptores o la señalización celular de que se ha iniciado la fijación de los ligandos, pero no ambos fenómenos. A causa de esta separación entre la interacción física (fijación de un ligando y un receptor) con respecto de la función (señalización de receptores y sucesos que ocurren corriente abajo), se observan con frecuencia falsas señales positivas, decelerando el descubrimiento y el desarrollo. Las falsas positivas son moléculas que dan el resultado deseado por razones indeseables; con frecuencia éstas son observadas en escrutinios para descubrir antagonistas con moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas, que inicialmente aparecen como agentes inhibidores de interacciones de fijación entre receptores y ligandos (que es un resultado deseado), pueden dar dicho resultado, por ejemplo, ya sea inhibiendo la interacción entre un receptor y un ligando por fijación del receptor o ligando diana (razones indeseables), o bien enfermando o aniquilando a células, o manejando otros efectos indefinidos (razones indeseables).

Además, los convencionales formatos de descubrimiento de fármacos para antagonistas de receptores quimioatrayentes no son capaces de identificar la totalidad de las moléculas clínicamente importantes, lo que es una consecuencia de falsas señales negativas. El concepto de "falsas señales negativas" significa que moléculas clínicamente importantes quedan sin detectar y permanecen sin descubrir. Por ejemplo, una molécula que permite una fijación entre un ligando de receptor quimioatrayente y del receptor quimioatrayente, pero inhibe la señalización del receptor quimioatrayente, será escondida en un escrutinio inicial para descubrir inhibidores de fijación de ligandos.

Las moléculas quimioatrayentes atraen a las células. Por ejemplo, las quimiocinas, que constituyen un grupo de más de 40 pequeños péptidos (generalmente con un tamaño de 7-10 kDa), actúan como balizas moleculares para el reclutamiento, la activación y la migración dirigida de linfocitos T, neutrófilos y macrófagos del sistema inmunitario, señalizando a los patógenos y a las masas tumorales para su destrucción. Mientras que defiende al individuo de la invasión de patógenos y tumores, el sistema inmunitario puede causar una enfermedad cuando se regula de una manera inapropiada. La fijación a receptores de quimiocinas está unida con cascadas de señalización acopladas con la proteína G para mediar en funciones de señalización de quimioatrayentes y quimioestimulantes.

Una inapropiada señalización de quimiocinas o bien puede favorecer infecciones cuando no se desencadena apropiadamente (Forster y colaboradores, 1999) o puede conducir a enfermedades asociadas con una defectuosa señalización de quimiocinas, incluyendo al asma, a las enfermedades alérgicas, a la esclerosis múltiple, a la artritis reumatoide, y a la aterosclerosis (que se analizan en la cita de Rossi y Zlotnick, 2000). Puesto que las quimiocinas desempeñan cometidos fundamentales en una inflamación y en un desarrollo de linfocitos, la capacidad de manipular específicamente su actividad tendrá un enorme impacto sobre el mejoramiento y la detención de enfermedades que actualmente no tienen ningún tratamiento satisfactorio. Los antagonistas de receptores de quimiocinas se pueden usar para evitar los efectos generalizados y complicadores de costosos agentes farmacéuticos inmunosupresores en el rechazo de trasplantes (lo que se recopila en la cita de DeVries y colaboradores, 1999).

Para acelerar la identificación de antagonistas de receptores quimioatrayentes, tales como los de receptores de quimiocinas, un ensayo que suprimiese las falsas señales, ensayando tanto la fijación a receptores quimioatrayentes como una función biológica, aceleraría el desarrollo de fármacos.

5 Sumario del invento

En un primer aspecto, el invento proporciona métodos para identificar a un antagonista de receptor quimioatrayente. Una célula que tiene un receptor quimioatrayente es incubada con un antagonista candidato en la presencia de un exceso de una concentración óptima de ligando para el receptor quimioatrayente, y luego se ensaya la migración de células. La migración de células indica que el antagonista candidato es realmente un antagonista.

En un aspecto, el invento proporciona métodos para identificar a un antagonista de receptor de quimiocina. Una célula que expresa un receptor de quimiocinas, es incubada con un antagonista candidato en la presencia de una concentración inhibitoria de un ligando de quimiocina, y luego se ensaya la migración de células. Una migración de células indica que el antagonista candidato es realmente un antagonista.

En otro aspecto, el invento proporciona métodos para identificar un antagonista de receptor de quimiocina. El antagonista candidato de un receptor de quimiocina se identifica primeramente en un ensayo convencional. En una operación subsiguiente, el antagonista candidato es incubado con un receptor de quimiocina portador de células, en la presencia de una concentración inhibitoria de un ligando, y luego se ensaya la migración de células. Una migración de células confirma que el antagonista candidato es realmente un antagonista.

Estas y otras realizaciones se debaten con detalle a continuación.

25 Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra unos gráficos que describen la activación selectiva de la migración de células mediante un antagonista de receptor de quimiocina por (B) el ensayo de la “activación inversa de la migración” (RAM, de reversed activation of migration) en comparación con (A) ensayos convencionales.

La Figura 2 muestra un gráfico que describe la curva de dosis y respuesta para una interacción entre un receptor de quimiocina CXCR4 y un ligando de SDF, en relación con la migración de células. El eje de las X es la concentración de una quimiocina (expresada como logaritmo); el eje de las Y es la migración de células, medida en un ensayo de migración de células (expresada como unidades de fluorescencia).

La Figura 3 muestra un gráfico que describe curvas representativas que demuestran el desplazamiento hacia la derecha de la curva de migración en la presencia de un antagonista en condiciones de RAM. El eje de las X es la concentración de una quimiocina (expresada como logaritmo); el eje de las Y es la migración de células medida en un ensayo de migración de células (números de células).

La Figura 4 describe un esquema de un convencional ensayo de migración de células.

La Figura 5 muestra unos gráficos que describen los resultados de un experimento de validación de un ensayo de RAM usando un antagonista de CXCR4 proteico. La migración de células mediada por la quimiocina SDF en la presencia del antagonista de CXCR4, vMIP-II, en condiciones (A) convencionales y/o (B) de RAM.

La Figura 6 muestra unos gráficos de barras que describen los resultados de un experimento de validación de un ensayo de RAM usando antagonistas de CXCR4 orgánicos pequeños. La migración de células mediada por la quimiocina SDF en la presencia de un antagonista de CXCR4 en forma de una pequeña molécula orgánica (A) RAMAG-1, (B) RAMAG-2 y (C) RAMAG-3.

La Figura 7 demuestra la eficacia del ensayo de RAM para discernir falsas señales positivas. (A) un ensayo convencional, que muestra la desactivación de la migración de células por tres compuestos que se conocen por no ser específicos; (B) un ensayo de RAM, en el que los mismos tres compuestos no son indicativos de un antagonista de receptor de quimiocina.

Descripción detallada del invento

El ensayo de la activación inversa de la migración (RAM, de reversed-activation of migration) del invento identifica y discrimina a los antagonistas mientras que disminuye significativamente la prevalencia de confundir por falsas señales positivas y negativas encontradas en otros ensayos. El tiempo y el trabajo implicados para confirmar un compuesto farmacéutico potencial se reduce de esta manera grandemente. Los métodos del invento incluyen:

(1) incubar una célula que comprende un receptor quimioatrayente, tal como un receptor de quimiocina, con un antagonista candidato;

(2) poner en contacto la célula con una concentración inhibitoria de un ligando para el receptor quimioatrayente; y

(3) ensayar la migración de células.

La migración de células se usa para identificar el antagonista candidato como un verdadero antagonista.

El método puede comprender además una “operación preliminar” en la que se determina la concentración de un ligando quimioatrayente (tal como una quimiocina) que inhibe la migración de células, a saber la “concentración inhibitoria” de un ligando para un receptor quimioatrayente. Se pueden añadir operaciones adicionales, dependiendo del tipo de célula o agente que se use, del ensayo, etc..

Mientras que los escrutinios convencionales para descubrir antagonistas de la migración de células miden la reducción de la migración de células -una reducción en la actividad- los ensayos de RAM miden la activación de la migración de células, es decir el aumento en la actividad (Figura 1A, ensayo convencional de migración; Figura 1B, ensayo de RAM). En el ensayo de RAM, las células son retadas a migrar en la presencia de concentraciones inhibitorias de la migración de quimioatrayentes, como respuesta a un antagonista candidato; en un ensayo convencional, las células son retadas a migrar como respuesta a un quimioatrayente en la presencia de un antagonista candidato. Un compuesto que da una señal positiva falsa en un convencional ensayo de migración de células (que inhibe la migración) no será capaz de activar la migración de células en el formato de RAM. En el ensayo de RAM, solamente un verdadero antagonista activa la migración. Esta distinción permite una sencilla identificación de auténticos antagonistas.

Otra ventaja del ensayo de RAM consiste en que los antagonistas identificados son más probables de resultar útiles terapéuticamente que los identificados en ensayos convencionales. Un antagonista de receptor quimioatrayente terapéutico es específico para ese receptor, ejerciendo su efecto a través del receptor. Dicho antagonista reduce la afinidad efectiva entre el quimioatrayente y el receptor, sin comprometer la integridad física de la célula ni desorganizar completamente los sucesos de señalización que ocurren corriente abajo, los cuales conducen a una migración. Un falso positivo identificado en un ensayo convencional carece de por lo menos una de estas características.

Una posible explicación del éxito del ensayo de RAM está basada en la observación de que para que una célula emigre, la célula debe tener una polaridad desde el extremo delantero hacia el extremo trasero. Dicha polaridad es iniciada con frecuencia mediante señales extracelulares, tales como quimiocinas. Para una migración de células, esta polaridad se consigue mediante un grado diferencial de ocupación de receptores quimioatrayentes junto a los dos extremos de la célula. Sin embargo, unas altas concentraciones del quimioatrayente inhiben a la migración, puesto que todos los receptores están ocupados en todas direcciones de la célula; la célula carece de una cola direccional. Si se representan gráficamente las concentraciones crecientes de un ligando en relación con la migración de células, se observa una curva con forma de campana (un ejemplo se muestra en la Figura 2). Un antagonista de receptor que reduce la afinidad efectiva de un quimioatrayente para un receptor, permite que el ligando se comporte igual que un ligando con más baja afinidad. La curva en forma de campana, observada por primera vez en la ausencia de antagonistas, se desplaza hacia la derecha en la presencia de concentraciones crecientes de un antagonista (véase p.ej., la Figura 3). Ésta es una posible explicación del éxito del presente invento. Los autores del invento no pretenden estar limitados por esta propuesta.

Definiciones

Un “ensayo de migración de células” ensaya la capacidad de una célula para migrar como respuesta a una señal.

Una “concentración inhibitoria” de un quimioatrayente es una que inhibe la migración de células. Esta concentración es mayor que la que activa la migración de células.

Un “receptor quimioatrayente” es un receptor que fija a un ligando quimioatrayente, induciendo la migración de células. Por ejemplo, un receptor de quimiocina es un receptor quimioatrayente cuyo ligando quimioatrayente es por lo menos una quimiocina.

En las siguientes secciones, el ensayo de RAM es ilustrado usando quimiocinas y receptores de quimiocinas. Sin embargo, se pueden usar cualquier quimioatrayente y cualquier receptor de quimioatrayente que induzca la migración de células. La Tabla A muestra algunos ejemplos de conocidos receptores quimioatrayentes y de algunos de sus ligandos.

TABLA A

Receptores quimioatrayentes humanos ilustrativos y ligandos ilustrativos¹

Receptor	Ejemplos de ligandos ²
BLT1	Leucotrieno B4
PDGFR	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
FPR	fMLP
FPRL1	Desconocido
Receptor similar al receptor de FMLP	Desconocido
CRTH2	Prostaglandina D2
C3aR	C3a
C5aR	C5a
Noci-R	Nociceptina
Familia de EDG	Fosfato de esfingosina 1
CB1	Cannabinoides
VEGFR	Factor de crecimiento endotelial vascular
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
FGFR	Factor de crecimiento de fibroblastos
Receptor de P2Y	P2Y
CTR	Calcitonina
CRLR	Péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP)
Receptor de histamina	Histamina
Receptor de trombina	Trombina
TrkB	Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)
¹ Esta lista de receptores quimioatrayentes no se pretende que sea exhaustiva.	
² Solamente se dan ejemplos de algunos ligandos para cada receptor. No se entiende que esta lista haya de ser exhaustiva.	

Ensayo de RAM

En el ensayo de RAM, una célula portadora de una quimiocina es incubada con un antagonista candidato y luego se pone en contacto con una concentración inhibitoria de un ligando para el receptor diana de quimiocina. Luego se ensaya la capacidad de la célula para migrar. Si la célula migra en la presencia de un antagonista candidato en el ensayo de RAM, entonces es que se ha observado una señal positiva. Un “antagonista” incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza, parcial o totalmente, una actividad biológica, tal como una migración de células. Similarmente, un “agonista” incluye cualquier molécula que imita a una actividad biológica de una molécula, tal como una quimiocina. Las moléculas que pueden actuar como agonistas o antagonistas incluyen pequeñas moléculas or-

gánicas, macromoléculas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de quimiocinas, péptidos, etc. Un “antagonista candidato” es un compuesto que está siendo ensayado para determinar su actividad antagonista; similarmente, un “agonista candidato” es un compuesto que está siendo ensayado para determinar su actividad agonista.

Se puede usar cualquier formato de ensayo de migración de células, tal como el sistema ChemoTx® (de NeuroProbe, Rockville, MD) o cualquier otro apropiado dispositivo o sistema (Bacon y colaboradores, 1988; Penfold y colaboradores, 1999). Dicho brevemente, estos ensayos de migración de células trabajan de la siguiente manera. Después de haber cosechado y preparado las células que son portadoras del receptor diana de quimiocina, las células son mezcladas con antagonistas candidatos. La mezcla es dispuesta dentro de la cámara superior del aparato para la migración de células. A la cámara inferior se le añade una concentración inhibitoria de un ligando de quimiocina. Luego, el ensayo de migración se ejecuta, se termina y se comprueba la migración de células.

Para comenzar el ensayo de RAM, la solución de la concentración inhibitoria de un ligando de quimiocina es añadida a la cámara inferior (6, Figura 4) de un aparato para la migración de células, y la suspensión de células es colocada dentro de la cámara superior (4, Figura 4) que está separada por una membrana porosa (5, Figura 4). Las células son incubadas en condiciones de cultivo (37°C para células humanas) durante 60 a 180 minutos en un incubador de cultivo de tejidos humidificados. El período de incubación depende del tipo de células y, si es necesario, se puede determinar de una manera empírica.

Al final del período de tiempo de incubación, el ensayo se termina. Por ejemplo, las células que no han migrado, situadas sobre la cámara superior del aparato son retiradas, usando un rascador de caucho u otro método manual; o por medios enzimáticos o químicos, p.ej., con soluciones de EDTA y EGTA. La membrana (5, Figura 4) que separa a las dos cámaras, es retirada luego del aparato y enjuagada con una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Dulbecco's phosphate buffered saline) o con agua. Luego se determina el número de células que han migrado dentro de la cámara inferior.

La concentración de un antagonista candidato, que ha de ser escrutado en ensayos de RAM, puede variar desde una sub-nanomolar a una milimolar. Al escrutar una colección de compuestos de moléculas pequeñas (tal como una biblioteca seleccionada mediante química combinatoria), la concentración de los antagonistas candidatos es típicamente de alrededor de 1-20 μ M. Un “compuesto” incluye moléculas pequeñas inorgánicas y orgánicas, macromoléculas, péptidos, proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, y anticuerpos.

Determinación de concentraciones inhibitorias de un ligando

Una curva de dosis y respuesta de la migración de células a un ligando de quimiocina se puede desarrollar para definir las concentraciones inhibitorias de un ligando de quimiocina. Se puede usar cualquier método clásico para determinar curvas de dosis y respuesta. Uno de dichos métodos incluye cosechar células que expresan el receptor diana de quimiocina, añadiendo las células a un dispositivo para la migración de células en la presencia de cantidades crecientes de una quimiocina, midiendo la migración de células, representando gráficamente la migración de células en función de la concentración de la quimiocina, y luego calculando a partir del gráfico las concentraciones de la quimiocina que inhiben a la liberación de células.

Como un ejemplo se puede usar un convencional ensayo de migración de células, tal como el sistema ChemoTX® (de NeuroProbe, Rockville, MD) o cualquier otro dispositivo o sistema apropiado (Bacon y colaboradores, 1988; Penfold y colaboradores, 1999). Para obtener una curva de dosis y respuesta, se reúnen células que expresan el receptor diana. Un ligando de quimiocina es preparado en una serie de concentraciones mediante una dilución en serie en un tampón. El intervalo de concentraciones está típicamente entre 0,1 nM y 10 nM, pero variará con el ligando.

Para comenzar el ensayo de migración de células, unas soluciones de las diversas concentraciones del ligando de quimiocina se añaden a la cámara inferior (6, Figura 4) de un aparato para migración de células y la suspensión de células se coloca dentro de la cámara superior (4, Figura 4) que está separada por una membrana porosa (5, Figura 4). Las células son incubadas en condiciones de cultivo (a 37°C para células humanas) durante 60 a 180 minutos en un incubador de cultivo de tejidos humidificados. El período de incubación depende del tipo de células y, si es necesario, se puede determinar empíricamente.

Después de haberse terminado la migración de células, las células que no han migrado, situadas sobre la cámara superior del aparato, son retiradas, usando un rascador de caucho u otro método manual; o por medios enzimáticos o químicos, p.ej. con soluciones de EDTA y EGTA. La membrana (5, Figura 4) que separa a las dos cámaras, es retirada luego del aparato y enjuagada con una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) o agua. Se determina luego el número de células que migran dentro de la cámara inferior.

La migración de células (eje de las Y) es luego representada gráficamente en función del logaritmo (de la concentración de quimiocinas) (eje de las X); se observa una curva en forma de campana (Figura 2; véanse los Ejemplos). A partir de esta representación gráfica (Figura 2), se puede determinar la concentración más baja de quimiocina que inhibe la migración de células. Para obtener facilidad de referencia, se puede dibujar un segundo eje de las Y (y_2 ,

1, Figura 2) a través de la curva en forma de campana, que interseca en su vértice (máxima migración de células) y el correspondiente valor en el eje de las X. Las concentraciones situadas a la izquierda del eje de Y_2 (más bajas) son estimuladoras (2, Figura 2); las que están situadas a la derecha (más altas) son inhibitorias (3, región sombreada, Figura 2). Estas concentraciones son las “concentraciones inhibitorias” en la migración de células (quimiotaxis). Por ejemplo, para determinar la concentración, a la cual la migración es inhibida en un 90% del máximo (a la derecha del eje de Y_2 , las concentraciones “inhibitorias”), está situado el valor que corresponde a un 10% de la máxima migración de células en el eje de las Y. Si la máxima señal de migración de células es, p.ej., de $3,5 \times 10^4$ células, el 10% de la misma sería 350 ($3,5 \times 10^4 \times 0,1$). La concentración inhibitoria del ligando es determinada luego localizando la correspondiente coordenada del eje de las X. Preferiblemente, el nivel de inhibición es de un 50%, 60%, 70% u 80% de la máxima migración de células. Más preferiblemente, el nivel de inhibición es de un 90% o incluso más preferiblemente de un 95% o 100% de la inhibición en comparación con la máxima señal para migración. La concentración determinada de una quimiocina varía y depende de la naturaleza del receptor, del ligando de quimiocina y de la célula diana. La variación del grado de inhibición quimiotáctica se puede usar para modular la sensibilidad del ensayo de RAM.

Aplicación de ensayos de RAM en escrutinios extensos para descubrir antagonistas terapéuticos

Los ensayos de RAM se pueden realizar en conjunción con cualquier otro ensayo usado para escrutar con el fin de descubrir antagonistas de receptores de quimiocinas. El formato de RAM no sólo es útil como una operación principal del HTS sino que también proporciona un ensayo confirmatorio o secundario para antagonistas candidatos, que han sido identificados en otros ensayos. Por ejemplo, un método de HTS que mide la movilización de Ca^{2+} , incluyendo los basados en el sistema FLIPR® (de Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) u otros métodos basados en reporteros, cuyo ensayo aumenta en niveles de Ca^{2+} intracelular libre, se puede usar como un ensayo principal. Los ensayos de RAM se pueden usar para confirmar tales candidatos, o a la inversa. Como un ensayo secundario, un RAM discriminaría entre los antagonistas candidatos, que ejercen efectos no específicos. Cuando se usan ensayos de RAM junto con otros métodos de HTS, se proporciona un medio para discriminar antagonistas verdaderos encontrados con respecto de bloqueadores no específicos.

El ensayo de RAM puede ser aplicado a cualquier otro formato de ensayo, que mida la migración de células o la activación de receptores, incluyendo métodos que no requieren una migración de células a través de una membrana porosa. Se pueden desarrollar tecnologías más útiles, que ofrezcan un caudal más alto y un costo más bajo, basándose en el uso del concepto de RAM.

Células destinadas a su uso en el ensayo de RAM

Las células que expresan un receptor diana de quimiocina (o receptor quimioatrayente) para su uso en el ensayo de RAM se pueden reunir por una diversidad de métodos, por ejemplo por centrifugación después de la recogida desde un individuo o de una liberación a partir de un cultivo, y luego se pueden volver a suspender en un tampón a una densidad apropiada, dependiendo del tipo de células y del tamaño de las células. Las convenientes concentraciones de células fluctúan entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^7 células/ml; con frecuencia son apropiadas $2,5 \times 10^6$ células/ml.

Receptores de quimiocinas y ligandos

Las células que se pueden ensayar en el formato de RAM incluyen todas aquellas que expresan por lo menos un receptor de quimiocinas sobre la superficie de una célula, tales como monocitos humanos, u otras células tratadas por ingeniería genética para expresar receptores de quimiocinas recombinantes y son competentes para activar la liberación de células. Los receptores conocidos de quimiocinas y algunos de sus ligandos se muestran en la Tabla B. Ejemplos de receptores de quimiocinas incluyen, pero no se limitan a, los de la clase de CXC, p.ej., CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5; los de la clase de CC, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y CCR11; los de la clase de CX3CR, tales como el CX3CR1; y los de la clase de XCR, tales como el XCR1.

Un ejemplo de un receptor quimioatrayente, que no es una quimiocina, es el de un receptor de formil péptido similar a la proteína 1 (FPRL1); cuyos ligandos son el w-péptido 1 y el w-péptido 2 (Klein y colaboradores, 1998). Véase también la Tabla A para otros ejemplos.

TABLA B

*Resumen de los conocidos receptores de quimiocinas y algunos de sus conocidos ligandos humanos
(Rossi y Zlotnik, 2000)*

Receptor	Ligandos humanos
CXCR1	IL-8, GCP-2
CXCR2	IL-8, GCP-2, Gro α , Gro β , Gro γ , ENA-78, PBP
CXCR3	MIG, IP-10, I-TAC
CXCR4	SDF-1/PBSF
CXCR5	BLC/BCA-1
CCR1	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, HCC-1, 2, 3 y 4
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
CCR3	eotaxina-1, eotaxina-2, MCP-3
CCR4	TARC, MDC, MIP-1 α , RANTES
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
CCR6	MIP-3 α /LARC
CCR7	MIP-3 β /ELC, 6Ccina/LC
CCR8	I-309
CCR9	TECK
XCR1	Linfotactina
CX3CR1	Fractalcina/neurotactina
CXCR6	CXCL16
CCR10	CRACK

Las quimiocinas que se pueden usar en el ensayo de RAM incluyen todas las quimiocinas conocidas. Ejemplos de quimiocinas incluyen, pero no se limitan a, IL-8, GCP-2, Gro α , Gro β , Gro γ , ENA-78, PBP, MIG, IP-10, I-TAC, SDF-1 (PBSF), BLC (BCA-1), MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, HCC-1, -2, -3 y -4, MCP-1, -2, -3 y -4, eotaxina-1, eotaxina-2, TARC, MDC, MIP-3 α (LARC), MIP-3 β (ELC), 6Ccina (LC), I-309, TECK, linfotactina, fractalcina (neurotactina), TCA-4, Exodus-2, Exodus-3 y CK β -11.

Las combinaciones de receptores de quimiocinas y ligandos incluyen las que están asociadas con enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas y un rechazo de trasplante. Dichas combinaciones incluyen la de CX3CR1 y fractalcina (trasplante), la de CCR5 y MIP-1 α , MIP-1 β , o RANTES (VIH), la de CXCR4 y SDF-1 (VIH); y la de CCR7 y MIP-3 β , ELC o 6cina LC (enfermedades inflamatorias o alérgicas, p.ej. asma, esclerosis múltiple, etc.).

Antagonistas candidatos

Cualquier molécula o compuesto se puede escrutar para determinar una actividad antagonista de receptor de quimiocina. Los compuestos que inhiben las actividades de receptores de quimiocinas y ligandos, tales como las de activar la migración de células o modular concentraciones de Ca²⁺ intracelular, son antagonistas candidatos.

Dichas moléculas que pueden ejercer tales efectos antagonistas incluyen pequeñas moléculas que se fijan a receptores de quimiocinas o a sus ligandos. Ejemplos de antagonistas de moléculas pequeñas incluyen pequeños péptidos, moléculas similares a péptidos, preferiblemente compuestos orgánicos no peptídicos o compuestos inorgánicos preferiblemente solubles y sintéticos. Otras moléculas antagonistas potenciales incluyen ácidos nucleicos tales como aptámeros y anticuerpos. Estas moléculas se pueden recoger dentro de diversas bibliotecas y pueden ser escrutadas rápidamente para descubrir nuevos antagonistas de receptores de quimiocinas usando el ensayo de RAM.

Casi cualquier anticuerpo (Ab) que inhiba una migración de células quimiotácticas es también un antagonista candidato. Ejemplos de antagonistas de anticuerpos incluyen Abs policlonales, monoclonales, monocatenarios, anti-idiotípicos, quiméricos, o versiones humanizadas de tales Abs o fragmentos. Los Abs pueden proceder de cualquier especie en la que se pueda generar una respuesta inmunitaria. Los Abs humanizados están excepcionalmente bien adaptados para el tratamiento de enfermedades y representan unos atractivos antagonistas candidatos (Jones y colaboradores, 1986; Riechmann y colaboradores, 1988; Verhoeyen y colaboradores, 1988); (patente de los EE.UU. N° 4.816.567, 1989). Tales anticuerpos pueden fijarse a receptores de quimiocinas para inhibir la migración de células.

Alternativamente, un antagonista o agonista potencial puede ser una proteína estrechamente afín, por ejemplo, una forma mutada de un ligando de receptor de quimiocina u otra proteína que reconozca a una proteína que interactúa con un receptor de quimiocina, pero no confiere ningún efecto, inhibiendo de esta manera competitivamente la acción de un receptor de quimiocinas.

Los aptámeros son cortas secuencias de oligonucleótidos que se pueden usar para reconocer y fijar específicamente casi cualquier molécula, tales moléculas pueden actuar también de manera antagonista. La evolución sistemática de ligandos por un procedimiento de enriquecimiento exponencial (SELEX) (Ausubel y colaboradores, 1987; Ellington y Szostak, 1990; Tuerk y Gold, 1990) es potente y se puede usar para encontrar tales aptámeros. Los aptámeros tienen muchos usos diagnósticos y clínicos, incluyendo el uso como antagonistas. Además, son baratos de producir y se pueden aplicar con facilidad en una diversidad de formatos, incluyendo su administración en composiciones farmacéuticas, bioensayos y ensayos de diagnóstico (Jayasena, 1999). El ensayo de RAM se puede usar también como un escrutinio para aislar aptámeros *de novo* (de nuevas).

Cuantificación de células migratorias

La cuantificación de células migratorias se puede conseguir por una amplia diversidad de métodos disponibles, tales como los que ensayan la cantidad de un ADN (p.ej. el estuche de proliferación de células CyQuant (de Molecular Probes) y luego ensayando la señal generada, tal como una fluorescencia. Otros métodos incluyen recontar las células usando un microscopio, o marcar células con un marcador detectable apropiado, tal como colorantes (tales como el Calcein AM (de NeuroProbe) o las muchas marcas disponibles de Molecular Probe (Eugene, OR) o una marcación radiactiva (p.ej. una yodación de la superficie de células con ¹³⁵I, una marcación de síntesis de proteínas con ³⁵S-metionina/³⁵S-cisteína o una marcación de ácidos nucleicos con ³H).

Tampones y medios de cultivo de células

Los tampones que se pueden usar para preparar las diversas soluciones, incluyen medios de cultivo de células, aunque se pueden haber retirado el suero u otros factores de crecimiento y quimiotácticos, de manera tal que los resultados en un ensayo de migración de células no se confunden y pueden ser atribuibles en su mayor parte a la interacción entre una quimiocina y un receptor de quimiocina. En algunos casos, se puede añadir, para soportar a las células, una proteína tal como diversas albúminas, incluyendo una albúmina de suero bovino. Una selección óptima de los medios depende del tipo de células; el medio que se usa para cultivar las células representa usualmente una opción preferida. Ejemplos de apropiados medios de cultivo incluyen el Medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, de Iscove's Modified Dulbecco's Medium), el Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, de Dulbecco's Modified Eagle's Medium), el Medio esencial mínimo de Eagle (MEM, de Minimal Essential Medium Eagle), el Medio basal de Eagle (BME, de Basal Medium Eagle), el Medio de Click, el Medio L-15 de Leibovitz, el Medio 5A de MacCoy, el Medio esencial mínimo de Glasgow (GMEM, de Glasgow Minimum Essential Medium), el Medio NCTC 109, el Medio E de Williams, el RPMI-1640 y el Medio 199. Son útiles también un medio desarrollado específicamente para un tipo o linaje particular de célula o una función celular particular, p.ej. el Medio de crecimiento de riñón de bovino de Madin-Darby, el Medio de mantenimiento de riñón de bovino de Madin-Darby, diversos medios de hibridomas, el Medio basal endotelial, el Medio basal de fibroblastos, el Medio basal de queratinocitos y el Medio basal de melanocitos. Si se desea, se puede usar un medio con un contenido reducido de proteínas o libre de ellas y/o libre de sueros y/o un medio libre de componentes animales, químicamente definido, p.ej. CHO, el Medio de terapia génica o el medio libre de suero QBSF (de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), la mezcla de nutrientes DMEM F-12 Ham, un MCDB (105, 110, 131, 151, 153, 201 y 302), un NCTC 135, el Ultra DOMA PF o HL-1 (ambos procedentes de Biowhitaker; Walkersville, MD).

Si se desea, los medios pueden ser suplementados adicionalmente con reactivos que limitan la acidosis de los cultivos, tal como una adición de un tampón al medio (tal como ácido N,N-bis(2-hidroxi-etil)-2-amino-etano-sulfónico (BES), bis(2-hidroxi-etil)-amino-tris(hidroximetil)metano (BIS-Tris), ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-3-propano-sulfónico (EPPS o HEPPS), glicilciclina, ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etano-sulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfónico (MOPS), piperazina-N,N-bis(ácido 2-etanol-sulfónico) (PIPES), bicarbonato de sodio, ácido 3-(N-tris(hidroximetil)-metil-amino)-2-hidroxi-propano-sulfónico (TAPSO), ácido (N-tris(hidroximetil)-metil-amino-etano-sulfónico (TES), N-tris(hidroximetil)-metil-glicina (Tricina), tris(hidroximetil)-amino-metano (Tris), etc.). Se pueden usar también frecuentes cambios de medio y cambios en la concentración de CO₂ suministrado (con frecuencia de aproximadamente 5%) con el fin de controlar la acidosis.

Estuches

Los componentes para llevar a cabo ensayos de RAM pueden ser ensamblados y reunidos dentro de estuches, recipientes, paquetes, envases o dispensadores, juntamente con instrucciones para su administración. Cuando se suministran como un estuche, los diferentes componentes de la composición pueden ser envasados en recipientes separados y mezclados inmediatamente antes de su uso. Dicho envasado por separado de los componentes puede permitir un almacenamiento a largo plazo, sin perder las funciones de los componentes activos. Por ejemplo, un estuche puede incluir un aparato para la migración de células, una célula portadora de un receptor de quimiocina y una solución que comprende una concentración migratoria inhibitoria de una quimiocina para la célula portadora de un receptor de quimiocina. La solución puede ser suministrada en estado liofilizado.

(a) Recipientes o vasos

Los reactivos incluidos en los estuches pueden ser suministrados en recipientes de cualquier tipo, de manera tal que se conserve la duración útil de los diferentes componentes, y éstos no sean adsorbidos ni alterados por los materiales del recipiente. Por ejemplo, unas ampollas de vidrio cerradas herméticamente pueden contener una quimiocina liofilizada o un tampón que ha sido envasado bajo un gas neutro, no reactivo, tal como nitrógeno. Las ampollas pueden consistir en cualquier material apropiado, tal como un vidrio, polímeros orgánicos, tales como un policarbonato, un poliestireno, etc., un material cerámico, un metal o cualquier otro material típicamente empleado para contener reactivos. Otros ejemplos de recipientes apropiados incluyen simples botellas que pueden ser fabricadas a partir de sustancias similares tales como ampollas, y envolturas o sobres, que pueden consistir en interiores revestidos con una hoja tal como de aluminio o una aleación. Otros recipientes pueden incluir tubos de ensayo, viales, matraces, botellas, jeringas o similares. Los recipientes pueden tener una lumbreira de acceso estéril, tal como una botella que tiene un tapón que puede ser perforado mediante una aguja hipodérmica para inyecciones. Otros recipientes pueden tener dos compartimientos que están separados por una membrana fácilmente retirable, que después de su retirada permite que los componentes se mezclen; por ejemplo, una quimiocina liofilizada en uno de los compartimientos, y un tampón o agua en el otro. Las membranas retirables pueden ser de un vidrio, un material plástico, un caucho, etc.

(b) Materiales de instrucciones

Los estuches pueden ser suministrados junto con materiales de instrucciones. Las instrucciones pueden estar impresas sobre papel u otro sustrato, y/o se pueden suministrar como un medio legible electrónicamente, tal como un disquete de ordenador, un CD-ROM, un DVD-ROM, un disco Zip, una cinta de vídeo, una cinta de audio, etc.. Unas instrucciones detalladas pueden no estar asociadas físicamente con el estuche. En vez de esto, un usuario puede ser dirigido a un sitio web de Internet especificado por el fabricante o distribuidor del ensayo, o suministrado como un correo electrónico.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar y validar el concepto de ensayo de RAM del presente invento, sin ninguna limitación. El receptor y los ligandos quimioatrayente(s), que se usan para ilustrar el invento, son receptores de quimiocinas y quimiocinas. Sin embargo se puede usar cualquier ligando quimioatrayente para cualquier receptor quimioatrayente. Acerca de ejemplos, véase la Tabla A.

Los Ejemplos 1, 2 y 4 demuestran la efectividad del ensayo de RAM, ensayando antagonistas específicos y no específicos de CXCR4, como se han descubierto en ensayos convencionales. El Ejemplo 3 demuestra la amplia aplicabilidad de receptores quimioatrayentes por examen de tres receptores de quimiocinas.

Ejemplo 1*Determinación de concentraciones inhibitorias de un SDF (CXCR4)*

Para obtener una curva de dosis y respuesta para linfocitos activados que expresan CXCR4 de superficie de células, se usó un convencional ensayo de migración de células (Bacon y colaboradores, 1988; Penfold y colaboradores, 1999). Las células fueron cosechadas por centrifugación y luego vueltas a suspender en un tampón para migración de células (solución salina equilibrada de Hank (HBSS, de Hank's balanced salt solution)/0,1% de albúmina de suero bovino (BSA, de bovine serum albumin) a razón de $2,5 \times 10^6$ células/ml. El factor derivado de estromas (SDF-1, de stromal derived factor-1) del ligando CXCR4 se preparó en una serie de concentraciones (desde 0,1 nM hasta 10 nM) mediante dilución en serie en un tampón para migración de células. En unas bajas concentraciones, el SDF activa la migración de células de linfocitos activados portadores de CXCR4.

El ligando SDF fue cargado en la cámara de fondo de un aparato para migración de células ChemoTX® (filtros revestidos con policarbonato poli(vinil-pirrolidona) con poros de $5 \mu\text{m}$ (de NeuroProbe; Gaithersburg, MD); $29 \mu\text{l}$ /pocillo) y $20 \mu\text{l}$ de la suspensión de células se dispusieron dentro de la cámara superior. Las células fueron incubadas a 37°C durante 150 minutos. El ensayo se terminó retirando las células desde la cámara superior y desde la

superficie de la membrana usando un rascador de caucho. Las células que habían migrado a la cámara inferior fueron cuantificadas mediante el ensayo CyQuant (de Molecular Probes; Eugene, OR), un método de tinción con colorante fluorescente que mide el contenido de ácidos nucleicos.

Para determinar la concentración mínima de SDF para inhibir la migración de células, la concentración de quimiocina (eje de las X) se representa gráficamente en función de las unidades fluorescentes relativas (RFU's de relative fluorescent units), que se correlacionan con el número de células que migran (eje de las Y) (Figura 2). Inicialmente, cuando aumenta la concentración de SDF la migración de células aumenta linealmente (2, Figura 2); sin embargo, a mayores concentraciones (3, Figura 2) los niveles de migración primeramente se aplanan y luego disminuyen hasta que la migración sea escasamente detectable. Esta curva en forma de campana es típica de una migración de células mediada por quimiocinas y receptores de quimiocinas. En este experimento se determinó que 1 μ M de SDF era una concentración completamente inhibitoria; el intervalo de concentraciones inhibitorias era desde 200 nM hasta 1 μ M.

Ejemplo 2

Validación del ensayo de RAM usando un antagonista de CXCR4, de polipéptido vírico

En el ensayo de RAM, los antagonistas de receptores de quimiocinas son identificados por su capacidad para activar la migración de células que son incubadas con concentraciones inhibitorias de quimiocinas. Para validar el ensayo de RAM, la quimiocina vírica, vMIP-II, se usó como un antagonista de CXCR4. La vMIP-II se fija con alta afinidad a CXCR4, bloqueando la señalización de receptores e inhibiendo la migración de células, compitiendo con el ligando usual de CXCR4, es decir el SDF (Kledal y colaboradores, 1997). Si células que expresan el CXCR4, que están inmovilizadas por concentraciones inhibitorias de SDF, son activadas para migrar en la presencia de vMIP-II con migración acrecentada, este resultado podría verificar el principio del ensayo de RAM. Para referencia y como un testigo, se realizó un convencional ensayo de migración de células. En el formato de ensayo convencional, la migración de células es inhibida por la vMIP-II.

La migración de células fue medida usando los dos formatos con las cantidades correspondientes de la quimiocina SDF:

(1) un ensayo convencional (testigo); 1 nM de SDF; y

(2) un ensayo de RAM, 1 μ M de SDF.

Linfocitos activados que expresan el CXCR4 de superficie de células, fueron cosechados igual que en el Ejemplo 1. Para el ensayo convencional, una serie de concentraciones de vMIP-II se mezclaron primeramente con linfocitos activados, y luego la solución se dispuso en la cámara superior de un aparato para la migración de células ChemoTX[®] (filtros revestidos con policarbonato y poli(vinilpirrolidona) con poros de 5 μ m (de Neuroprobe), 20 μ l/pocillo); 29 μ l de una solución 1 nM de SDF se dispusieron en la cámara inferior. Para el ensayo de RAM, las células fueron preparadas igual que para el ensayo convencional, excepto que la concentración de SDF en la cámara inferior era de 1 μ M. Las células fueron incubadas a 37°C durante 150 minutos. El ensayo se terminó retirando las células desde la cámara superior y desde la superficie de la membrana usando un rascador de caucho. Las células que habían migrado a la cámara inferior fueron cuantificadas por el ensayo CyQuant (de Molecular Probes).

En el ensayo convencional (Figura 5A), la migración de células era inhibida parcialmente con 11 nM de vMIP-II; la migración de células era inhibida adicionalmente según aumentaba la concentración de vMIP-II (hasta 100 nM), verificando que la vMIP-II es un antagonista de CXCR4. En el formato de ensayo de RAM (Figura 5B) se observó poca migración en la ausencia de vMIP-II. Sin embargo, la migración era activada en la presencia de vMIP-II con 11 nM, reflejando la disminución de la migración observada en el ensayo convencional (Figura 5A). Unas concentraciones aumentadas de vMIP-II se correlacionan con un aumento en la migración de células, observándose una migración máxima con 100 nM.

Ejemplo 3

Validación de un ensayo de RAM usando conocidas antagonistas de moléculas pequeñas de CXCR3, CXCR4 y CCR1

Los ensayos de RAM se realizaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 2, excepto que se usaron antagonistas de moléculas pequeñas previamente identificados, en vez de la vMIP-II, así como tipos adicionales de células como se describen en la Tabla 2.

TABLA 2

Variables experimentales

Antagonista ¹	Receptor	Ligandos	Células
RAMAG-1	CXCR3	I-TAC (250 nM), IP-10	linfocitos humanos activados
RAMAG-2	CXCR4	SDF-1	células MOLT-4 que expresan el CXCR4 (linfoblasto T humano; American Type Tissue Collection (ATCC); Manassas, VA)
RAMAG-3	CCR1	MIP-1	células THP-1 (monocíticas humanas; ATCC)

¹ Como se define usando un ensayo convencional de migración de células y se confirma adicionalmente de manera independiente

² Concentraciones inhibitorias determinadas como en el Ejemplo 1

En el ensayo de RAM, linfocitos activados incubados en la presencia de concentraciones crecientes de RAMAG-1 y del ligando de CXCR3 I-TAC con 250 nM, la migración de células fue activada con menos de 1 μ M (Figura 6A); según aumentaba la concentración de RAMAG-1, la migración aumentaba, llegando a aproximarse a un máximo a (desde -6,5 hasta -5) de RAMAG-1.

Con una concentración de 100 nM del ligando SDF-1 de CXCR4 usando células MOLT-4 que expresan CXCR4, el RAMAG-2 activaba la migración de células con 5 μ M (Figura 5, B). Como se observó con el RAMAG-1, se observó una activación adicional de la migración cuando la concentración de RAMAG-2 había aumentado a 10 μ M.

El antagonista de CCR1, el RAMAG-3 dio también resultados similares. En un ensayo de RAM usando células THP-1 que expresan CCR1, el RAMAG-3 activaba la migración de células a 100 nM; cuando aumentaba la concentración del RAMAG-3, también lo hacía la señal de migración (Figura 5,C).

Ejemplo 4

Validación de un ensayo de RAM usando conocidas moléculas pequeñas que inhiben de una manera no específica la migración de células en células portadoras de CXCR4 en ensayos convencionales

Este experimento demuestra concluyentemente la capacidad del ensayo de RAM para discernir entre antagonistas no específicos y específicos de receptores de quimiocinas. Un ensayo convencional y un ensayo de RAM se realizaron como se describe en el Ejemplo 2, pero con los siguientes antagonistas candidatos:

(1) testigo (no hay antagonista candidato)

(2) testigo positivo (vMIP-II; un conocido antagonista de CXCR4)

(3) inhibidores no específicos conocidos de la migración de células:

compuesto N° 1,

compuesto N° 2,

compuesto N° 3.

Como se muestra en la Figura 7A, las células testigos migraron, pero las incubadas con vMIP-II y los compuestos N° 1, N° 2 y N° 3 mostraron una migración disminuida de células. Cuando estos mismos antagonistas candidatos fueron sometidos a un ensayo de RAM (Figura 7B) las células testigos no migran, como se espera, mientras que

las células tratadas con vMIP-II migran (como también se espera). Sin embargo, los compuestos N° 1, N° 2 y N° 3, compuestos conocidos que inhiben de manera no específica a la migración de células en ensayos convencionales, no fueron capaces de activar la migración de células en el ensayo de RAM.

- 5 A partir de los resultados presentados en los Ejemplos 2-4, el ensayo de RAM distingue entre antagonistas no específicos y específicos de receptores quimioatrayentes tales como receptores de quimiocinas.

Referencias

- 10 Patente de los EE.UU. N° 4.816.567. 1989; formulaciones de inmunoglobulinas recombinantes.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore,** y colaboradores 1987. *Current protocols in molecular biology* [Protocolos actuales en biología molecular] John Wiley & Sons, Nueva York.
- 15 **Bacon, K.B., R.D. Camp, F.M. Cunningham y P.M. Woollard,** 1988, Contrasting *in vitro* lymphocyte chemotactic activity of the hydroxyl enantiomers of 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid [Contraste de la actividad quimiotáctica de linfocitos *in vitro* de los enantiómeros hidroxílicos de ácido 12-hidroxi-5,8,10,14-eicosatetraenoico] *Br. J. Pharmacol.* 95:966-74.
- 20 **Ellington, A.D. y J.W. Szostak.** 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [Selección *in vitro* de moléculas de ARN que se fijan a ligandos específicos], *Nature*. 346:818-22.
- Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer,** y colaboradores 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs [El CCR7 coordina la respuesta inmunitaria principal estableciendo microentornos funcionales en órganos linfoides secundarios]. *Cell*. 99:23-33.
- 25 **Jayasena, S.D.** 1999. Aptamers; an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics [Aptámeros; una clase emergente de moléculas que rivalizan con anticuerpos en diagnósticos]. *Clin. Chem.* 45:1628-50.
- 30 **Jones, P.T., P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger,** y colaboradores 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse [Reemplazo de las regiones determinantes de complementariedad en un anticuerpo humano por las de un ratón]. *Nature*. 321:522-5.
- Kledal, T.N., M.M. Rosenkilde, F. Coulin, G. Simmons,** y colaboradores 1997. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [Un antagonista de quimiocina de espectro amplio, codificado por virus herpes asociados con el sarcoma de Kaposi]. *Science*. 277:1656-9.
- 35 **Klein, C., J.I. Paul, K. Sauve, M.M. Schmidt,** y colaboradores 1998. Identification of surrogate agonists for the human FPRL-1 receptor by autocrine selection in yeast [Identificación de agonistas subrogados para el receptor de FPRL-1 humano por selección autocrina en levadura]. *Nat. Biotechnol.* 16:1334-7.
- 40 **Penfold, M.E., D.J. Dairaghi, G.M. Duke, N. Saederup** y colaboradores 1999. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine [Un citomegalovirus codifica una potente quimiocina alfa]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96:9839-44.
- 45 **Riechmann L., M. Clark, H. Waldmann, y G. Winter.** 1988. Reshaping human antibodies for therapy [Reconformación de anticuerpos humanos para terapias]. *Nature*. 332:323-7.
- Rossi, D. y A. Zlotnik.** 2000. The Biology of Chemokines and their Receptors [La biología de quimiocinas y sus receptores]. *Annu. Rev. Immunol.* 18:217-242.
- 50 **Tuerk, C., y L. Gold.** 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [La evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento potencial: ligandos de ARN para la polimerasa de ADN T4 de bacteriófagos]. *Science*. 249:505-10.
- 55 **Verhoeyen, M., C. Milstein, y G. Winter.** 1988. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity [Reconformación de anticuerpos humanos; injerto de una actividad anti-lisozima]. *Science*. 239:1534-6.
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar a un antagonista de receptor quimioatrayente, que comprende:

5 incubar una célula que comprende un receptor quimioatrayente con un antagonista candidato;

poner en contacto la célula con una concentración inhibitoria de un ligando para el receptor quimioatrayente; y

10 ensayar la migración de células, en que una migración de células identifica al antagonista candidato como un verdadero antagonista.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el antagonista candidato es un pequeño péptido, una molécula similar a un péptido, un compuesto orgánico no peptídico, un compuesto inorgánico, un ácido nucleico o un anticuerpo.

15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración inhibitoria de un ligando para el receptor quimioatrayente inhibe a una migración de células mayor que, o igual a, un 50% de la máxima migración de células activadas por ligandos.

20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración inhibitoria de un ligando para el receptor quimioatrayente inhibe a una migración de células mayor que, o igual a, un 95% de la máxima migración de células activadas por ligandos.

25 5. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración inhibitoria de un ligando para el receptor quimioatrayente inhibe a una migración de células, es de un 100% de la máxima migración de células activadas por ligandos.

6. El método de la reivindicación 1, en el que el receptor quimioatrayente comprende el receptor de FPRL-1, y el ligando quimioatrayente comprende un ligando para FPRL-1.

30 7. El método de la reivindicación 6, en el que el ligando para FPRL-1 se selecciona entre el conjunto que consiste en el w-péptido 1 y el w-péptido 2.

8. Un método para identificar un antagonista de receptor de quimiocina, que comprende:

35 incubar una célula que comprende un receptor de quimiocina con un antagonista candidato;

poner en contacto la célula con una concentración inhibitoria de un ligando para el receptor de quimiocina; y

40 ensayar la migración de células, en que una migración de células identifica al antagonista candidato como un verdadero antagonista.

9. El método de la reivindicación 8, en el que el antagonista candidato es un pequeño péptido, una molécula similar a un péptido, un compuesto orgánico no peptídico, un compuesto inorgánico, un ácido nucleico o un anticuerpo.

45 10. El método de la reivindicación 8, en el que el receptor de quimiocina es CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CCR11, CX3CR1 o XCR1.

50 11. El método de la reivindicación 8, en el que la quimiocina se selecciona entre el conjunto que consiste en los ligandos de CCR, CXCR y CX3CR.

55 12. El método de la reivindicación 11, en el que la quimiocina es IL-8, GCP-2, Gro α , Gro β , Gro γ , ENA-78, PBP, MIG, IP-10, I-TAC, SDF-1, BLC, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, HCC-1, HCC-2, HCC-3, HCC-4, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxina-1, eotaxina-2, TARC, MDC, MIP-3 α , MIP-3 β , 6Ccina, I-309, TECK, linfotactina, fractalcina (neurotactina), TCA-4, Exodus-2, Exodus-3 y CK β -11.

13. El método de la reivindicación 8, en el que el receptor de quimiocina comprende CCR5 y la quimiocina comprende MIP-1 α , MIP-1 β o RANTES.

60 14. El método de la reivindicación 8, en que el receptor de quimiocina comprende CXCR4 y la quimiocina comprende SDF-1.

15. El método de la reivindicación 8, en que el receptor de quimiocina comprende CCR9 y la quimiocina comprende TECK.

65 16. El método de la reivindicación 8, en que el receptor de quimiocina comprende CCR10 y la quimiocina comprende CTACK.

ES 2 274 041 T3

17. El método de la reivindicación 8, en que la concentración inhibitoria de un ligando para el receptor de quimiocina inhibe a una migración de células mayor que o igual a un 50% de la máxima migración de células activadas por ligandos.

5 18. El método de la reivindicación 8, en que la concentración inhibitoria de un ligando para el receptor de quimiocina inhibe a una migración de células mayor que o igual a un 95% de la máxima migración de células activadas por ligandos.

10 19. El método de la reivindicación 8, en que la concentración inhibitoria de un ligando para el receptor de quimiocina inhibe a una migración de células es de un 100% de la máxima migración de células activadas por ligandos.

20. Un método para identificar un antagonista de receptor de quimiocina, que comprende:

15 Identificar a un antagonista candidato de un receptor de quimiocinas en un ensayo convencional;

y que comprende adicionalmente una segunda etapa que comprende:

incubar una célula que comprende el receptor de quimiocina con el antagonista candidato;

20 poner en contacto la célula con una concentración inhibitoria de un ligando para el receptor de quimiocina; y

ensayar la migración de células, en que la migración de células identifica al antagonista candidato como un verdadero antagonista.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

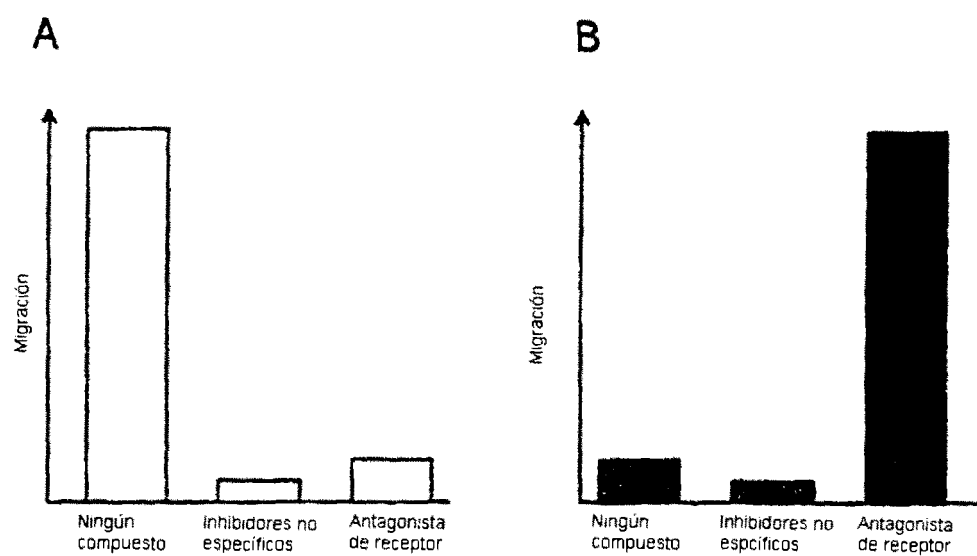


Figura 2

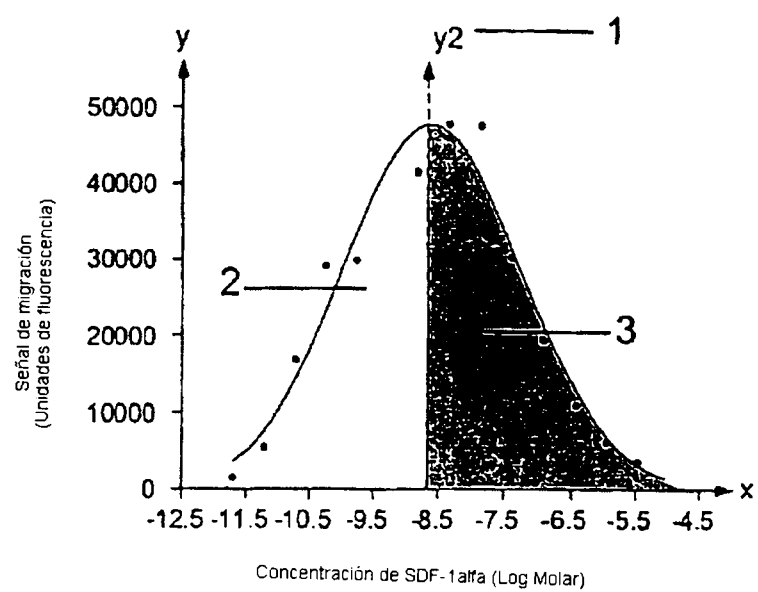


Figura 3

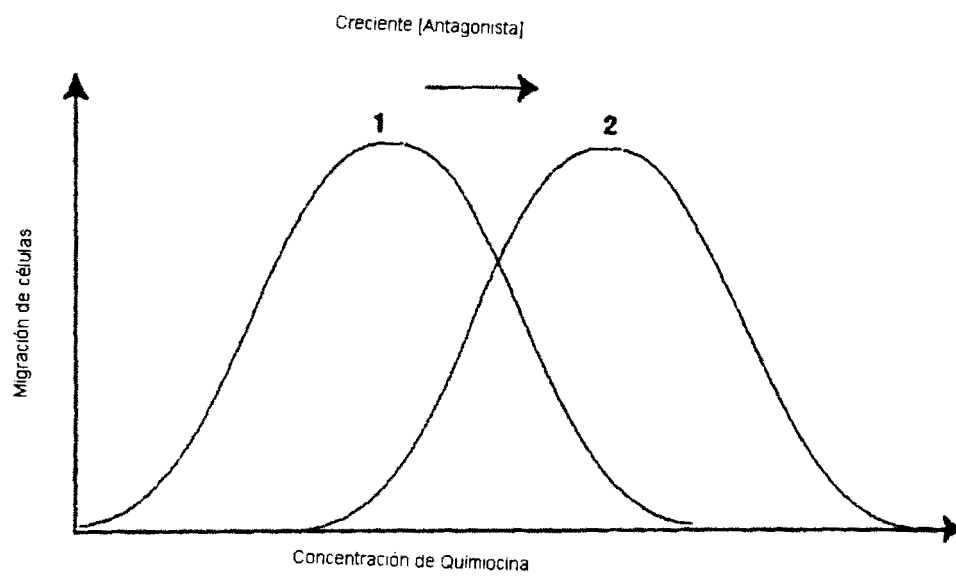


Figura 4

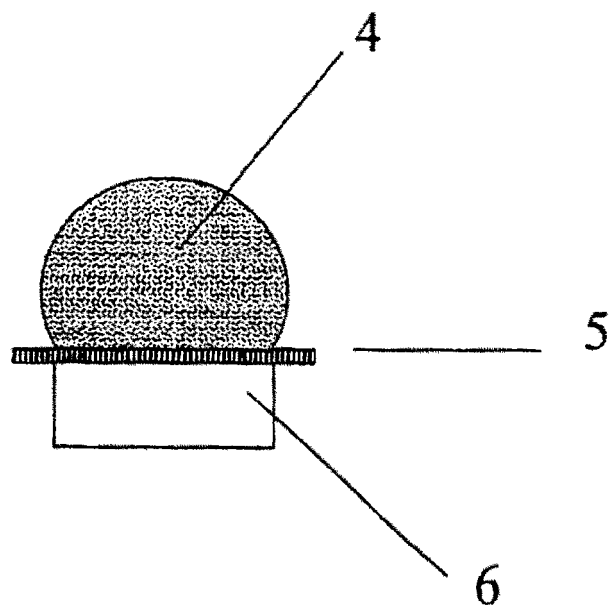


Figura 5

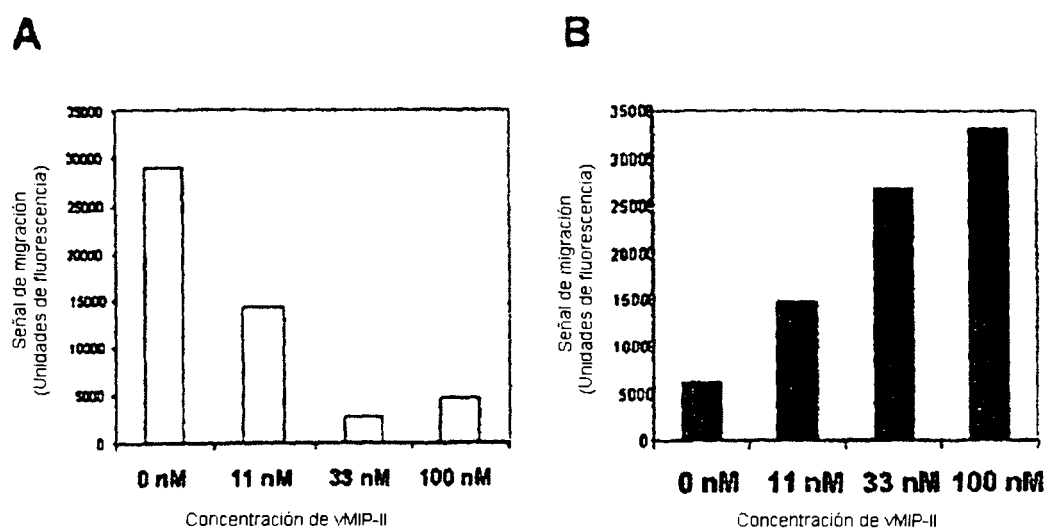


Figura 6

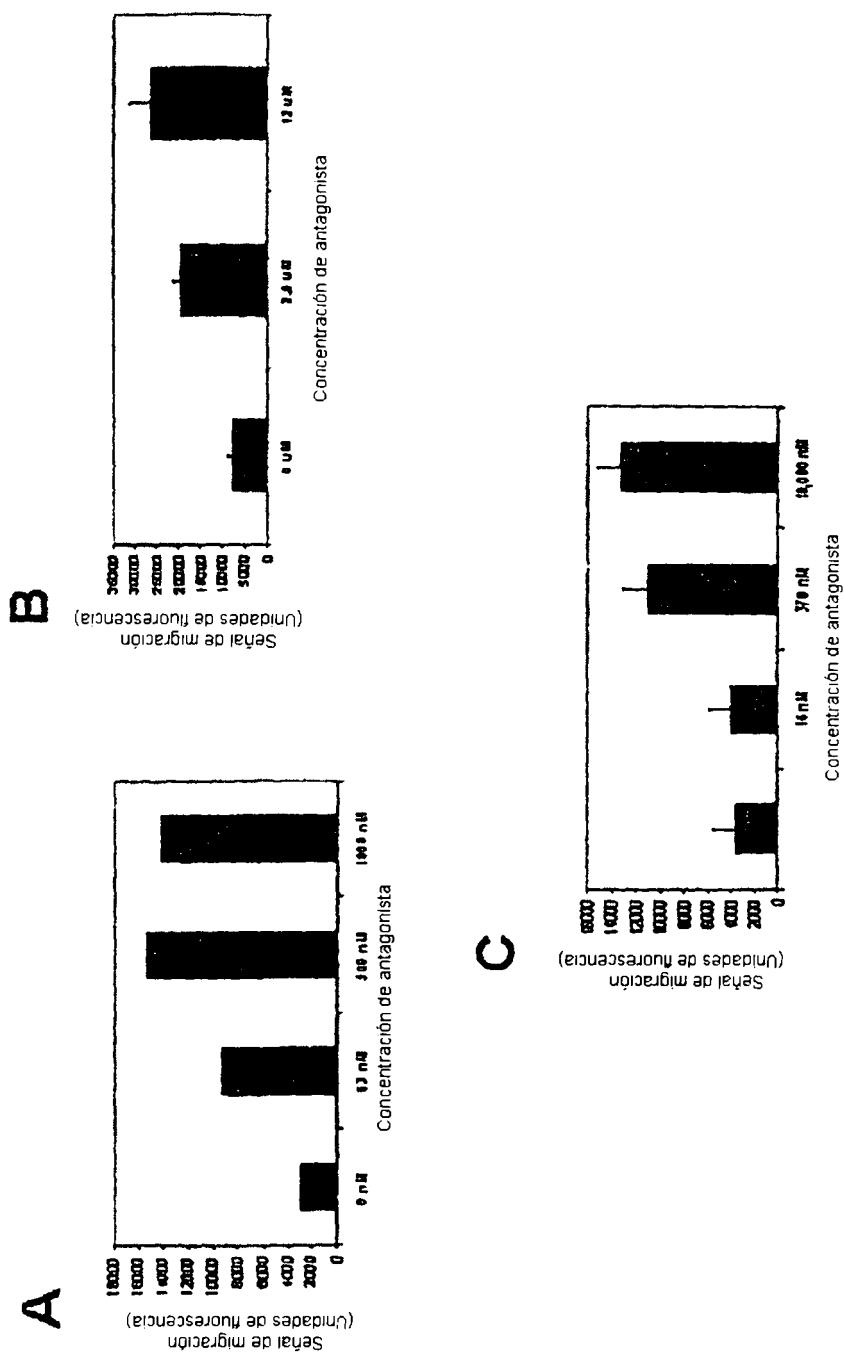


Figura 7

