



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 359 629**

(51) Int. Cl.:

**C07H 21/04** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02718923 .2**

(96) Fecha de presentación : **08.02.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1366058**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

(54) Título: **Receptor de quimiocina de proteína G (CCR5) humano HDGNR10.**

(30) Prioridad: **09.02.2001 PCT/US01/04153**  
**09.02.2001 US 779880**  
**12.06.2001 US 297257 P**  
**08.08.2001 US 310458 P**  
**12.10.2001 US 328447 P**  
**21.12.2001 US 341725 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.05.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.05.2011**

(73) Titular/es: **HUMAN GENOME SCIENCES, Inc.**  
**9410 Key West Avenue**  
**Rockville, Maryland 20850, US**

(72) Inventor/es: **Roschke, Viktor;**  
**Rosen, Craig, A. y**  
**Ruben, Steven, M.**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 359 629 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

Receptor de quimiocina de proteína G (CCR5) humano HDGNR10.

**Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen con el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), como se define en las reivindicaciones así como polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos y vectores y células hospedadoras correspondientes. La invención también se refiere a un método para preparar un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende expresar el anticuerpo o fragmento del mismo, codificado por el polinucleótido como se define en las reivindicaciones y recuperar dicho anticuerpo o fragmento del mismo. La invención se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención y el uso de los anticuerpos de la invención para el tratamiento o prevención de VIH o artritis reumatoide. También se proporcionan métodos para detectar la expresión de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que puede usarse para detectar enfermedades, trastornos y/o afecciones relacionadas con el sistema inmune. En particular, la invención se refiere a métodos para detectar, diagnosticar o pronosticar infección por VIH o artritis reumatoide y/o afecciones asociadas con infección por VIH. También se proporcionan kits que comprenden anticuerpos de la invención. El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también se conoce como CCR5.

**Antecedentes de la Invención**

Está bien establecido que muchos procesos biológicos médicamente significativos están mediados por proteínas que participan en las rutas de transducción de señal que implican proteínas G y/o segundos mensajeros, por ejemplo, AMPc (Lefkowitz, *Nature*, 351: 353-354 (1991)). En la presente memoria estas proteínas se denominan proteínas que participan en rutas con proteínas G o proteínas PPG. Algunos ejemplos de estas proteínas incluyen receptores GPC, tales como los de agentes adrenérgicos y dopamina (Koblika, B. K., *et al.*, *PNAS*, 84: 46-50 (1987); Koblika, B. K., *et al.*, *Science*, 238: 650-656 (1987); Bunzow, J. R., *et al.*, *Nature*, 336: 783-787 (1988)), las proteínas G en sí mismas, las proteínas efectoras, por ejemplo, fosfolipasa C, adenil ciclasa y fosfodiesterasa, y las proteínas de actuación, por ejemplo, proteína quinasa A y proteína quinasa C (Simon, M. I., *et al.*, *Science*, 252: 802-8 (1991)).

Por ejemplo, en una forma de transducción de señal, el efecto de unión de hormonas es la activación de una enzima, adenilato ciclasa, dentro de la célula. La activación de enzimas por hormonas es dependiente de la presencia del nucleótido GTP y GTP también influye en la unión a hormonas. Una proteína G conecta los receptores de hormona con adenilato ciclasa. Se ha mostrado que la proteína G intercambia GTP por GDP unido cuando se activa por receptores de hormona. La forma que porta GTP se une después a una adenilato ciclasa activada. La hidrólisis de GTP a GDP, catalizada por la proteína G en sí misma, devuelve la proteína G a su forma basal inactivada. De este modo, la proteína G sirve un papel doble, como intermediario que transmite la señal del receptor al efector y como un reloj que controla la duración de la señal.

La superfamilia de gen de proteína de membrana de los receptores acoplados a proteína G se ha caracterizado por tener siete dominios transmembrana potenciales. Se cree que los dominios representan  $\alpha$ -hélices transmembrana conectadas por bucles extracelulares o citoplasmáticos. Los receptores acoplados a proteína G incluyen una amplia variedad de receptores biológicamente activos, tales como hormonales, virales, de factores de crecimiento y neuroreceptores.

Los receptores acoplados a proteína G se han caracterizado como inclusivos de estos siete tramos hidrófobos conservados de aproximadamente 20 a 30 aminoácidos, que conectan al menos ocho bucles hidrófilos divergentes. La familia de la proteína G de receptores acoplados incluye receptores de dopamina que se unen a fármacos neurolépticos usados para el tratamiento de trastornos sicóticos y neurológicos. Otros ejemplos de miembros de esta familia incluyen receptores de calcitonina, adrenérgicos, de endotelina, de AMPc, de adenosina, muscarínicos, de acetilcolina, de serotonina, de histamina, de trombina, de quinina, de hormona estimulante de folículos, de opsinas, de receptor de gen de diferenciación endotelial 1 y receptores de rodopsinas, odorantes, citomegalovirus, etc.

Los receptores acoplados a proteína G pueden estar acoplados intracelularmente por proteínas G heterotriméricas a diversas enzimas, canales iónicos y transportadores intracelulares (véase, Johnson *et al.*, *Endoc., Rev.*, 10: 317-331 (1989)). Diferentes subunidades  $\alpha$  de proteína G estimulan preferentemente efectores particulares para modular diversas funciones biológicas en una célula. La fosforilación de restos citoplasmáticos de receptores acoplados a proteína G se han identificado como un mecanismo importante para la regulación de acoplamiento de proteína G de algunos receptores acoplados a proteína G. Los receptores acoplados a proteína G se encuentran en numerosos sitios dentro de un hospedador mamífero.

Las quimiocinas, también denominadas citocinas intercrinas, son una subfamilia de citocinas relacionadas estructural y funcionalmente. Estas moléculas son de 8-10 kd de tamaño. En general, las quimiocinas muestran una homología de 20% a 75% en el nivel de aminoácidos y se caracterizan por cuatro restos de cisteína conservados que forman dos enlaces disulfuro. Basándose en la disposición de los dos primeros restos de cisteína, las quimiocinas se han clasificado en dos subfamilias, alfa y beta. En la subfamilia alfa, las dos primeras cisteínas se separan por un aminoácido y por lo tanto se denominan la subfamilia "C-X-C". En la subfamilia beta, las dos cisteínas están en una posición adyacente, y se denominan, por lo tanto, la subfamilia "C-C". Hasta el momento, se han identificado al

menos nueve miembros diferentes de esta familia en seres humanos.

Las citocinas intercrinas muestran una amplia diversidad de funciones. Una característica distintiva es su capacidad para inducir migración quimiotáctica de distintos tipos celulares, incluyendo monocitos, neutrófilos, linfocitos T, basófilos y fibroblastos. Muchas quimiocinas tienen actividad proinflamatoria y están implicadas en múltiples etapas durante una reacción inflamatoria. Estas actividades incluyen estimulación de liberación de histamina, enzima lisosomal y liberación de leucotrieno, adherencia aumentada de células inmunes diana a células endoteliales, unión mejorada de proteínas del complemento, expresión inducida de moléculas de adhesión de granulocitos y receptores del complemento y explosión respiratoria. Además de su implicación en inflamación, se ha demostrado que ciertas quimiocinas muestran otras actividades. Por ejemplo, la proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP-1) es capaz de suprimir la proliferación de células madre hematopoyéticas, el factor plaquetario 4 (PF-4) es un potente inhibidor del crecimiento de células endoteliales, la Interleucina 8 (IL-8) promueve la proliferación de queratinocitos y GRO es un factor de crecimiento autocrino para células de melanoma.

A la luz de las diversas actividades biológicas, no es sorprendente que las quimiocinas se hayan implicado en varias afecciones fisiológicas y enfermedades, incluyendo tráfico de linfocitos, cicatrización, regulación hematopoyética y trastornos inmunológicos tales como alergia, asma y artritis.

De este modo, existe una necesidad de polipéptidos que modulen la regulación del sistema inmune, puesto que alteraciones de dicha regulación pueden estar implicadas en enfermedades, trastornos y/o afecciones que se relacionan con el sistema inmune. Por lo tanto, existe una necesidad para identificación y caracterización de tales polipéptidos humanos que pueden desempeñar un papel en la detección, prevención, mejora o corrección de tales enfermedades, trastornos y/o afecciones.

El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) es un receptor acoplado a proteína G transmembrana de siete pasos que se expresa en células del sistema inmune tales como, por ejemplo macrófagos, incluyendo células dendríticas inmaduras tales como células de Langerhans y linfocitos T, incluyendo linfocitos efectores Th0 y Th1. El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también se ha detectado en microglía, astrocitos, neuronas y células endoteliales vasculares del sistema nervioso central (SNC). También se expresa receptor de quimiocina de proteína G (CCR5) en monocitos y linfocitos T en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y también se ha implicado en otras formas de artritis.

Los ligandos de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluyen MIP-1 $\alpha$ , MTP-1 $\beta$ , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, RANTES, y Eotaxina. CCR5 también es un correceptor principal para VIH y también puede reconocerse por otros agentes infecciosos, tales como otros virus, para permitir su entrada en la célula. Se ha descubierto recientemente que ciertos individuos que albergan una mutación del gen de CCR5 eran resistentes a infección por VIH a pesar de múltiples exposiciones al virus. Esta mutación anulaba la expresión de CCR5 en la superficie celular (Liu *et al.*, Cell 86:1 (1996)).

VIH es actualmente la enfermedad infecciosa letal más importante en el mundo, causando 2,6 millones de muertes en 1999. El número de muertes resultantes de infección por VIH continúa aumentando; en 1999, hubo 5,6 millones de casos nuevos de infección por VIH y 33,6 millones de personas infectadas viviendo en el mundo. Aunque actualmente existen 14 fármacos aprobados para tratar VIH, hasta la mitad de los pacientes no consiguen tratarse con éxito (definiéndose el éxito como no tener ARN de VIH detectable en suero (que en efecto es igual o menor de 50 copias/ml de ARN de VIH-1) después de un año de régimen farmacológico. Las razones para la incapacidad de estos regímenes farmacológicos para tratar de forma eficaz VIH son múltiples: el uso de ciertos fármacos da como resultado el desarrollo de cepas de VIH resistentes a fármacos; algunos individuos son intolerantes a ciertos fármacos o los fármacos tienen efectos secundarios negativos; los pacientes tienen dificultad siguiendo regímenes de dosificación complejos; y los fármacos pueden no ser capaces de acceder a las reservas de VIH en el cuerpo. De este modo, sigue existiendo la necesidad en la técnica de desarrollar vacunas y terapias de VIH mejoradas.

#### **Compendio de la Invención**

La presente invención se refiere a un anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo que se une al polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo:

(a) la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo expresado por la línea celular de hibridoma depositada con el Nº de Depósito de ATCC PTA-4054; y

(b) la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo expresado por la línea celular de hibridoma depositada con el Nº de Depósito de ATCC PTA-4054.

Además, la presente invención se refiere a un anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo que se une específicamente al polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo las secuencias de aminoácidos de cada uno de los dominios VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3 del anticuerpo expresado por la línea celular de hibridoma depositada con el Nº de Depósito de ATCC PTA-4054;

teniendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo una actividad seleccionada del grupo que consiste en:

(a) inhibición de la unión de RANTES con las células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5);

5 (b) inhibición de la unión de MIP-1alfa con células que expresan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5); y

(c) inhibición de la unión de MIP-1 beta con células que expresan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5);

y teniendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo una actividad seleccionada del grupo que consiste en:

(d) inhibición de unión de VIH con células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5); y

10 (e) inhibición de la infección por VIH de células que expresan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

La invención se refiere adicionalmente a un anticuerpo expresado por la línea celular depositada con el N° de Depósito de ATCC PTA-4054. Además, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención, a un vector que comprende el polinucleótido de la invención y a una célula hospedadora que comprende el vector de la invención o el polinucleótido de la invención.

15 La invención también abarca un método para preparar un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende:

(a) expresar el anticuerpo o fragmento del mismo codificado por el polinucleótido de la invención; y

(b) recuperar dicho anticuerpo o fragmento del mismo.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la invención y, opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Además, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo humano o humanizado o fragmentos del mismo de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de infección por VIH o de artritis reumatoide y al anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de infección por VIH o de artritis reumatoide.

25 La presente invención también se refiere a un método para detectar la expresión de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende:

(a) ensayar la expresión de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una muestra biológica de un individuo usando el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la invención; y

(b) comparar el nivel de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con un nivel convencional de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

30 Además, la presente invención se refiere a un método para detectar, diagnosticar o pronosticar infección por VIH y/o afecciones asociadas con infección por VIH que comprende:

(a) ensayar la expresión de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una muestra biológica de un individuo usando el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la invención; y

35 (b) comparar el nivel de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con un nivel convencional de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

La presente invención también proporciona un método para detectar, diagnosticar o pronosticar artritis reumatoide que comprende:

(a) ensayar la expresión de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una muestra biológica de un individuo usando el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la invención; y

40 (b) comparar el nivel de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR35) con un nivel convencional de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un kit que comprende el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la invención.

45 La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen al polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como se define en las reivindicaciones. La presente descripción abarca anticuerpos (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos) que se unen inmuno-específicamente con un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmento



polipeptídico o variante de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). En particular, la descripción abarca anticuerpos (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos) que se unen inmuno-específicamente con un polipéptido o fragmento de polipéptido o variante del Receptor de Quimiocina de proteína G humano (CCR5) tales como los de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado.

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y uso de los anticuerpos de la invención para prevenir o tratar infección por VIH o artritis reumatoide.

La presente invención se refiere a métodos para detectar, diagnosticar o pronosticar infección por MV y/o afecciones asociadas con infección por VIH o artritis reumatoide. Otras enfermedades o trastornos que pueden detectarse, diagnosticarse o pronosticarse con los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitación, trastornos inmunes (por ejemplo, trastornos autoinmunes tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Grave y artritis reumatoide), trastornos neurodegenerativos (por ejemplo enfermedad de Alzheimer) trastornos inflamatorios (por ejemplo, asma, trastornos alérgicos o enfermedades inflamatorias del riñón, tales como glomerulonefritis) enfermedades infecciosas (por ejemplo, infecciones de Hepatitis, infecciones virales de herpes y otras infecciones virales) y trastornos proliferativos.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse como una herramienta de diagnóstico para detectar la expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G humano (CCR5) en células.

La presente invención también abarca líneas celulares que expresan anticuerpos de la invención que se unen inmuno-específicamente con el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G humano (CCR5).

Además, la presente invención abarca los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención expresados por dichas líneas celulares, así como las secuencias de aminoácidos que codifican los anticuerpos expresados por estas líneas celulares. Se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en fragmentos o variantes de estos anticuerpos por ejemplo, cadenas pesadas, dominios VH, CDR de VH, cadenas ligeras, dominios VL o CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los que pueden expresarse por una línea celular que expresa anticuerpos, que se unen inmuno-específicamente con el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos y/o moléculas. En realizaciones altamente preferidas, se abarcan anticuerpos de la invención, o fragmentos de los mismos, que se unen con las regiones/dominios extracelulares del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Los presentes inventores han generado líneas celulares de hibridoma que expresan anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con uno o más polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, SEC ID N°: 2 o el polipéptido codificado por el clon depositado). De este modo, la descripción abarca estas líneas celulares, enumeradas en la Tabla 2 a continuación que se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") en las fechas enumeradas en la Tabla 2 y recibieron los Números de Depósito de ATCC identificados en la Tabla 2. La ATCC se localiza en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos. El depósito en la ATCC se hizo conforme a los términos del tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del depósito de microorganismos con fines de patente. La presente invención abarca el anticuerpo expresado por la línea celular depositada con el N° de Depósito de ATCC PTA-4054.

Además, la presente invención abarca los polinucleótidos que codifican el anticuerpo expresado por esta línea celular así como las secuencias de aminoácidos que codifican el anticuerpo expresado por esta línea celular. Se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de este anticuerpo (por ejemplo, cadenas pesadas, dominios de VH, CDR de VH, cadenas ligeras, dominios de VL o CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las expresadas por una o más líneas celulares mencionadas en la Tabla 2), que se unen inmuno-específicamente con el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), así como moléculas de ácido nucleico que codifican este anticuerpo y/o molécula. La presente descripción abarca anticuerpos, o fragmentos o variantes de los mismos, que se unen a las regiones/dominios extracelulares del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

La presente invención también proporciona anticuerpos de la invención que pueden unirse al polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que se acopla con un marcador detectable, tal como una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente o un marcador bioluminiscente. Los anticuerpos de la invención pueden unirse a los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que se acoplan con un agente terapéutico o citotóxico. Los anticuerpos de la invención pueden unirse al polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que se acopla con un material radiactivo.

La presente invención proporciona adicionalmente los anticuerpos de la invención que inhiben la capacidad de VIH para unirse y para inhibir la infección por VIH de células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). En realizaciones altamente preferidas de la presente invención, los anticuerpos anti-receptor de quimiocina de proteína G (CCR5) de la presente invención como se definen en las reivindicaciones se usan para tratar o prevenir infección por VIH. En otras realizaciones altamente preferidas, los anticuerpos anti Receptor de Quimiocina de proteína G de la presente invención son para administración a un individuo solos o en combinación con otros

compuestos terapéuticos, especialmente agentes antirretrovirales, para tratar o prevenir la infección por VIH.

Se describen anticuerpos que se unen a uno o más polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que actúan como agonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos de la invención estimulan la quimiotaxis de las células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos inhiben la unión del ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos regulan positivamente la expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Se describen anticuerpos que regulan negativamente la expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos anti Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) regulan de forma negativa la expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mediante la promoción de la internalización del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos que inhiben la unión de un ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), es decir MIP1-beta, MIP-1alfa y RANTES, con células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

La presente invención también proporciona una molécula o moléculas de ácido nucleico, generalmente aisladas, que codifican un anticuerpo (incluyendo moléculas, tales como scFv, dominios VH o dominios VL, que comprenden, o como alternativa que consisten en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo) de la invención. La presente invención también proporciona una célula hospedadora transformada con una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (incluyendo moléculas, tales como scFv, dominios VH o dominios VL, que comprenden, o como alternativa que consisten en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo) de la invención y descendientes de la misma. La presente invención también proporciona un método para la producción de un anticuerpo (incluyendo la molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo) de la invención. La presente invención proporciona adicionalmente un método para expresar un anticuerpo (incluyendo una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo) de la invención a partir de una molécula de ácido nucleico. Estos y otros aspectos de la invención se describen en más detalle posteriormente.

La presente descripción describe vacunas que comprenden, o como alternativa que consisten en, polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos, variantes o derivados de los mismos.

Se describen métodos para explorar con respecto a compuestos que se unen a y activan o inhiben la activación de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Se describen compuestos que son para administración a un hospedador que se unen y activan el polipéptido receptor que son útiles en la estimulación de la hematopoyesis, cicatrización, coagulación, angiogénesis, para tratar tumores sólidos, infecciones crónicas, leucemia, enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T, infecciones parasitarias, psoriasis y para estimular la actividad del factor de crecimiento.

También se describe la administración de los polipéptidos receptores mediante terapia génica para tratar afecciones relacionadas con la expresión inferior a lo normal de los polipéptidos o expresión inferior a lo normal de un ligando para el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

De acuerdo con otra realización más de la presente invención se proporcionan composiciones farmacéuticas para su administración a un hospedador que se unen e inhiben la activación del polipéptido de CCR5 que son útiles en la prevención y/o tratamiento de artritis reumatoide.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente descripción, se describen sondas de ácido nucleico que comprenden moléculas de ácido nucleico de suficiente longitud para hibridar específicamente con las secuencias polinucleotídicas del CCR5.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente descripción, se describen ensayos de diagnóstico para detectar enfermedades relacionadas con mutaciones en las secuencias de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos y para detectar un nivel alterado de la forma soluble de los polipéptidos del receptor.

De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente descripción, se describen procedimientos para utilizar tales polipéptidos receptores o polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, para fines *in vitro* relacionados con investigación científica, síntesis de ADN y fabricación de vectores de ADN.

Estos y otros aspectos de la presente invención deberían resultar evidentes para los expertos en la materia a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

### **Breve Descripción de los Dibujos**

Los siguientes dibujos son ilustrativos de realizaciones de la invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención como se abarca por las reivindicaciones.

La FIGURA 1 muestra la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente del receptor acoplado a proteína G (CCR5). Se utiliza la abreviatura de una letra convencional para los aminoácidos. La secuenciación se realizó usando un secuenciador de ADN Automático 373 (Applied Biosystems, Inc.).

La FIGURA 2 ilustra un alineamiento de aminoácidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y el receptor de MCP-1 humano (SEC ID N°: 9). Esta figura muestra las regiones de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y el producto de traducción del receptor A de MCP-1 humano A (MCP-1 RA) (SEC ID N°:9), determinado por análisis de BLAST. Los aminoácidos idénticos entre los dos polipéptidos se indican por líneas, mientras que los aminoácidos altamente conservativos se indican por dos puntos y los aminoácidos conservativos se indican por puntos. Mediante el examen de las regiones de aminoácidos idénticos, altamente conservados y conservados, el experto en la materia puede identificar fácilmente dominios conservados entre los dos polipéptidos.

La FIGURA 3 muestra un análisis de la secuencia de aminoácidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Se muestran las regiones alfa, beta, de giro y enrollamiento; hidrofilia e hidrofobicidad; regiones anfipáticas; regiones flexibles; índice antigénico y probabilidad de la superficie, y todas se generaron usando los ajustes por defecto. En el gráfico "Índice Antigénico o Jameson-Wolf", los picos positivos indican localizaciones de las regiones altamente antigénicas de la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), es decir, regiones de las que pueden obtenerse péptidos que portan epítomos. Los dominios definidos por estos gráficos se contemplan en la presente invención.

Los datos presentados en la FIGURA 3 también están representados en forma tabular en la Tabla 1. Las columnas están marcadas con los encabezamientos "Res", "Posición" y los Números Romanos I-XIV. Los encabezamientos de columna se refieren a las siguientes características de la secuencia de aminoácidos presentada en la FIGURA 3 y la Tabla 1: "Res": resto aminoácido de SEC ID N°:2 y FIGURA 1; "Posición": posición del resto correspondiente dentro de SEC ID N°: 2 y FIGURA 1; I: Alfa, Regiones - Garnier-Robson; II: Alfa, Regiones - Chou-Fasman; III: Beta, Regiones - Garnier-Robson; IV: Beta, Regiones - Chou-Fasman; V: Giro, Regiones - Garnier-Robson; VI: Giro, Regiones - Chou-Fasman VII: Enrollamiento, Regiones - Garnier-Robson; VIII: Representación de Hidrofilia - Kyte-Doolittle; IX: Representación de Hidrofobicidad - Hopp-Woods; X: Alfa, Regiones Anfipáticas - Eisenberg; XI: Beta, Regiones Anfipáticas - Eisenberg; XII: Regiones Flexibles - Karplus-Schulz; XIII: Índice Antigénico - Jameson-Wolf; y XIV: Representación de Probabilidad de Superficie - Emini.

La FIGURA 4 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de los dominios VH (SEC ID N°: 59-60) y VL (SEC ID N°: 61-62) del anticuerpo anti-CCR5 XF11.1D8. Cada CDR se indica mediante una línea sobre la secuencia de nucleótidos. Véase también Tabla 6.

La FIGURA 5 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de los dominios VH (SEC ID N°: 63-64) y VL (SEC ID N°: 65-66) del anticuerpo anti-CCR5 XF22.3C9 (es decir, XF22.3C9.6). Cada CDR está indicada mediante una línea sobre la secuencia de nucleótidos. Véase también, la Tabla 6.

La FIGURA 6 muestra la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos de los dominios VH (SEC ID N°: 67-68) y VL (SEC ID N°: 69-70) del anticuerpo anti-CCR5 XF22.9E6. Cada CDR está indicada mediante una línea sobre la secuencia de nucleótidos. Véase también Tabla 6.

### **Descripción Detallada**

De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se describe un ácido nucleico aislado (polinucleótido) que codifica el polipéptido maduro que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de FTG. 1 (SEC ID N°: 2) o el polipéptido maduro codificado por el clon depositado con N° de Depósito de ATCC 97183 el 1 de junio de 1995. Una muestra del clon depositado, que contiene la fase abierta de lectura del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), se ha obtenido de la ATCC y se ha vuelto a secuenciar. Los datos de secuencia del clon resecuenciado se muestran en SEC ID N°: 21 y 22. SEC ID N°: 21 difiere de SEC ID N°: 1 en 5 posiciones (nucleótidos 320, 433, 442, 646 y 1289 de SEC ID N°: 1) SEC ID N°: 22 difiere de SEC ID N°: 2 en 5 posiciones (restos aminoácidos 21, 59, 62, 130 y 344).

El polinucleótido se descubrió en una biblioteca genómica derivada de monocitos humanos. Está relacionado estructuralmente con la familia del receptor acoplado a proteína G. Contiene una fase abierta de lectura que codifica una proteína de 352 restos aminoácidos. La proteína muestra el mayor grado de homología con un receptor de MCP-1 (SEC ID N°: 9) con 70,1% de identidad y 82,9% de similitud sobre un tramo de 347 aminoácidos.

Los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1, la secuencia de nucleótidos del clon depositado HDGNR10 (Número de Depósito de ATCC 97183), la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 21), y/o fragmentos, variantes o derivados de las mismas.

El polinucleótido pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, incluyendo el ADN ADNc, ADN genómico y ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario y, si es monocatenario, puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (anti-sentido). La secuencia codificante que codifica el polipéptido maduro puede ser idéntica a la secuencia codificante mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1) o la del clon depositado o puede ser

una secuencia codificante diferente, codificando dicha secuencia codificante, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, el mismo polipéptido maduro que el ADN de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1) o el clon depositado.

5 El polinucleótido que codifica el polipéptido maduro de la FIGURA 1 o el polipéptido maduro codificado por el clon depositado puede incluir: solamente la secuencia codificante para el polipéptido maduro; la secuencia codificante para el polipéptido maduro y secuencia codificante adicional tal como un dominio transmembrana (TM) o intracelular; la secuencia codificante para el polipéptido maduro (y opcionalmente secuencia codificante adicional) y secuencia no codificante, tal como intrones o secuencia no codificante 5' y/o 3' de la secuencia codificante para el polipéptido maduro.

10 De este modo, la expresión "polinucleótido que codifica un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye solamente secuencia codificante para el polipéptido así como un polinucleótido que incluye secuencias codificantes y/o no codificantes adicionales.

15 La presente descripción se refiere adicionalmente a variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente memoria que codifican fragmentos, análogos y derivados del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de la FIGURA 1 o el polipéptido codificado por el clon depositado. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica de origen natural del polinucleótido o una variante de origen no natural del polinucleótido.

20 De este modo, se describen polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido maduro que se muestra en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2) o el mismo polipéptido maduro codificado por el clon depositado así como variantes de tales polinucleótidos, codificando dichas variantes un fragmento, derivado o análogo del polipéptido de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2) o el polipéptido codificado por el clon depositado. Tales variantes de nucleótidos incluyen variantes de delección, variantes de sustitución y variantes de adición o inserción.

25 Como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, el polinucleótido puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica de origen natural de la secuencia codificante mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1) o de la secuencia codificante del clon depositado. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia polinucleotídica que puede tener una sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos, que no altera sustancialmente la función del polipéptido codificado.

30 Los polinucleótidos también pueden codificar una forma soluble del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que es la parte extracelular del polipéptido que se ha escindido del dominio TM e intracelular del polipéptido de longitud completa.

35 Los polinucleótidos también pueden tener la secuencia codificante fusionada en fase con una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido descrito anteriormente. La secuencia marcadora puede ser un marcador de hexa-histidina proporcionado por un vector pQE-9 para posibilitar la purificación del polipéptido maduro fusionado con el marcador en el caso de un hospedador bacteriano o, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser un marcador de hemaglutinina (HA) cuando se usa un hospedador mamífero, por ejemplo, células COS-7. El marcador HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson, I., *et al.*, Cell, 37: 767 (1984)).

40 El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante (líder y posterior) así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

45 Los fragmentos del gen de longitud completa pueden usarse como una sonda de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de longitud completa y para aislar otros ADNc que tienen una alta similitud de secuencia con el gen o actividad biológica similar. Las sondas de este tipo preferentemente tienen al menos 30 bases y pueden contener, por ejemplo, 50 o más bases. La sonda puede usarse también para identificar un clon de ADNc correspondiente a un transcrito de longitud completa y un clon o clones genómicos que contienen el gen completo que incluye regiones reguladoras y promotoras, exones e intrones. Un ejemplo de una exploración comprende aislar la región codificante del gen usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda oligonucleotídica. Se usan oligonucleótidos marcados que tienen una secuencia complementaria a la del gen para explorar una biblioteca de ADNc, ADN genómico o ARNm humanos para determinar con qué miembros de la biblioteca hibrida la sonda.

50 Se describen adicionalmente polinucleótidos que hibridan con las secuencias descritas anteriormente en la presente memoria si existe al menos 70%, preferiblemente al menos 90% y más preferiblemente al menos 95% de identidad entre las secuencias. Se describen polinucleótidos, que hibridan en condiciones rigurosas con los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, la expresión "condiciones rigurosas" significa que la hibridación sólo se producirá si existe al menos 95% y preferiblemente al menos 97% de identidad entre las secuencias. Los polinucleótidos que hibridan con los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente memoria codifican polipéptidos que conservan la misma función o actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por los ADN de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1) o el clon depositado.

Como alternativa, el polinucleótido puede tener al menos 20 bases, preferiblemente 30 bases y más preferiblemente al menos 50 bases que hibridan con un polinucleótido y que tiene una identidad con el mismo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y que puede o no conservar actividad. Por ejemplo, tales polinucleótidos pueden emplearse como sondas para el polinucleótido de SEC ID N°: 1 o del clon depositado, por ejemplo, para la recuperación del polinucleótido o como una sonda de diagnóstico o como un cebador de PCR.

Se describen polinucleótidos que tienen al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 90% y más preferiblemente al menos 95% de identidad con un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 2 o el codificado por el clon depositado así como fragmentos de los mismos, teniendo dichos fragmentos al menos 30 bases y preferiblemente al menos 50 bases y con polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

El depósito o los depósitos indicados en la presente memoria se mantendrán bajo los términos del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con fines de Patente. Estos depósitos se proporcionan meramente por conveniencia para los expertos en la materia y no son una admisión de que se requiera un depósito bajo 35 U.S.C. §112. Puede requerirse una licencia para preparar o vender los materiales depositados y no se garantiza por la presente dicha licencia.

La presente descripción describe adicionalmente un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2) o que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el clon depositado (SEC ID N°: 22), así como fragmentos, análogos y derivados de dicho polipéptido.

Los términos “fragmento”, “derivado” y “análogo” cuando se refieren al polipéptido de la FIGURA 1 o al codificado por el clon depositado, significa un polipéptido que conserva sustancialmente la misma función o actividad biológica que dicho polipéptido, es decir actúa como un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o conserva la capacidad para unirse al ligando o el receptor incluso aunque el polipéptido no funcione como un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), por ejemplo, una forma soluble del receptor. Un análogo incluye una proproteína que puede activarse por escisión de la parte de proproteína para producir un polipéptido maduro activo.

El polipéptido puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético, preferiblemente un polipéptido recombinante.

El fragmento, derivado o análogo del polipéptido de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2) o el codificado por el clon depositado puede ser (i) uno en el que uno o más de los restos aminoacídicos se sustituyen con un resto aminoacídico conservado o no conservado (preferiblemente un resto aminoacídico conservado) y tal resto aminoacídico sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético o (ii) uno en el que uno o más de los restos aminoacídicos incluyen un grupo sustituyente o (iii) uno en el que el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol) o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionan con el polipéptido maduro para la purificación del polipéptido o (v) uno en el que un fragmento del polipéptido es soluble, es decir no está unido a membrana, pero se une a ligandos del receptor unido a membrana. Dichos fragmentos, derivados y análogos se consideran dentro del ámbito de los expertos en la materia a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Los polipéptidos y polinucleótidos se proporcionan preferiblemente en una forma aislada y preferiblemente se purifican hasta la homogeneidad.

Los polipéptidos incluyen el polipéptido de SEC ID N°: 2 (en particular el polipéptido maduro) o el codificado por el clon depositado así como polipéptidos que tienen al menos 70% de similitud (preferiblemente una identidad del 70%) con el polipéptido de SEC ID N°: 2) o con el codificado por el clon depositado y más preferiblemente una similitud del 90% (más preferiblemente una identidad del 90%) con el polipéptido de SEC ID N°: 2) o con el codificado por el clon depositado y aún más preferiblemente una similitud del 95% (aún más preferiblemente una identidad del 90%) con el polipéptido de SEC ID N°: 2 y con partes de dicho polipéptido conteniendo dicha parte del polipéptido generalmente al menos 30 aminoácidos y más preferiblemente al menos 50 aminoácidos.

Como se conoce en la técnica la “similitud” entre dos polipéptidos se determina por comparación de la secuencia de aminoácidos y sustituciones de aminoácidos conservadas de la misma del polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

Los fragmentos o partes de los polipéptidos pueden emplearse para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente por síntesis peptídica, por lo tanto, los fragmentos pueden emplearse como intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa. Los fragmentos o partes de los polinucleótidos pueden usarse para sintetizar polinucleótidos de longitud completa.

El término “gen” significa el segmento de ADN implicado en producir una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante “líder y posterior” así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

El término “aislado” significa que el material se elimina de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si es

de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presentes en un animal vivo no están aislados, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de alguno o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición y aún estar aislados en tanto que tal vector o composición no es parte de su ambiente natural.

Los polipéptidos incluyen el polipéptido de SEC ID N°: 2 o el codificado por el clon depositado (en particular el polipéptido maduro) así como polipéptidos que tienen al menos 70% de similitud (preferiblemente al menos 70% de identidad) y más preferiblemente al menos 90% de similitud (más preferiblemente al menos 90% de identidad) y aún más preferiblemente al menos 95% de similitud (aún más preferiblemente al menos 95% de identidad) con el polipéptido de SEC ID N°: 2 o con el codificado por el clon depositado y también incluye partes de tales polipéptidos conteniendo dicha parte del polipéptido generalmente al menos 30 aminoácidos y más preferiblemente al menos 50 aminoácidos.

Como se conoce en la técnica la "similitud" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustituciones de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

Pueden emplearse fragmentos o partes de los polipéptidos para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente mediante síntesis peptídica; por lo tanto, los fragmentos pueden emplearse como intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa. Pueden usarse fragmentos o partes de los polinucleótidos para sintetizar polinucleótidos de longitud completa.

Se describen vectores que incluyen polinucleótidos descritos anteriormente, células hospedadoras que se modifican por ingeniería genética con los vectores y la producción de los polipéptidos mediante técnicas recombinantes.

Las células hospedadoras están modificadas por ingeniería genética (transducidas, transformadas o transfectadas) con los vectores que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las células hospedadoras modificadas por ingeniería genética pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes de la presente invención. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión y resultarán evidentes para el experto en la materia.

Los polinucleótidos pueden emplearse para producir polipéptidos por técnicas recombinantes. De este modo, por ejemplo, el polinucleótido puede incluirse en cualquiera de una diversidad de vectores de expresión para expresar un polipéptido. Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo, derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como de vaccinia, adenovirus, virus de la gripe aviar y seudorrabia. Sin embargo, cualquier otro vector puede usarse siempre que sea replicable y viable en el hospedador.

La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el vector por una diversidad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados por procedimientos conocidos en la técnica. Se considera que tales procedimientos y otros están dentro del alcance de los expertos en la materia.

La secuencia de ADN en el vector de expresión se une operativamente con una secuencia o secuencias de control de la expresión apropiadas (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, pueden mencionarse: promotor LTR o SV40, el *lac* o *trp* de *E. coli*, el promotor P<sub>L</sub> de fago lambda y otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células procariontes o eucariotas o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosoma para iniciación de la traducción y un terminador de transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

Además, los vectores de expresión preferiblemente contienen uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para selección de células hospedadoras transformadas tales como resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para cultivo de células eucariotas o tales como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, así como un promotor o secuencia control apropiada, puede emplearse para transformar un hospedador apropiado para permitir que el hospedador exprese la proteína.

Como ejemplos representativos de hospedadores apropiados pueden mencionarse: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como levadura; células de insecto tales como *Drosophila* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus; células vegetales, etc. La selección de un hospedador apropiado se considera que está dentro del alcance de los expertos en la materia a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

De forma más particular, se describen construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias como se han descrito anteriormente de forma general. Las construcciones comprenden un vector, tal como un vector plasmídico o viral, es el que se ha insertado una secuencia descrita anteriormente en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, la construcción comprende adicionalmente secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor, unido operativamente a la secuencia. Los expertos en la materia conocen gran variedad de vectores y promotores adecuados, y estos están disponibles en el mercado. Los siguientes vectores se proporcionan como ejemplo. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pbs, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariotas: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Sin embargo, cualquier otro plásmido o vector puede usarse siempre que sea replicable y viable en el hospedador.

Las regiones promotoras pueden seleccionarse de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son PKK232-8 y PCM7. Promotores bacterianos nombrados particulares incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P<sub>R</sub>, P<sub>L</sub> y trp. Los promotores eucariotas incluyen CMV inmediato temprano, timidina quinasa de VHS, SV40 temprano y tardío, LTR de retrovirus y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y promotor apropiados está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica.

Se describen células hospedadoras que contienen las construcciones anteriormente descritas. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura o la célula hospedadora puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula hospedadora puede efectuarse por transfección de fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-Dextrano o electroporación (Davis, L., *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

Las construcciones de células hospedadoras pueden usarse de una manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Como alternativa, los polipéptidos pueden producirse sintéticamente por sintetizadores peptídicos convencionales.

Pueden expresarse proteínas maduras en células de mamífero, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir tales proteínas que usan ARN derivados de las construcciones de ADN. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores procariotas y eucariotas se describen en Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989).

La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos por eucariotas superiores aumenta mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación de pb 100 a 270, un potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula hospedadora, por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y *S. cerevisiae*, gen TRP1, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glucolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK),  $\alpha$ -factor, fosfatasa ácida o proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en una fase apropiada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción y preferentemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida en el espacio periplásmico o medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación N terminal que proporciona las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada de producto recombinante expresado.

Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen mediante la inserción de una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales de iniciación y terminación de la traducción adecuadas en fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y, si es deseable, proporcionar amplificación dentro del hospedador. Los hospedadores procariotas adecuados para transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque también pueden emplearse otros a elección.

Como un ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y origen bacteriano de replicación derivados de plásmidos disponibles en el mercado que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1

(Promega Biotec, Madison, WI, Estados Unidos). Estas secciones de "cadena principal" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural a expresar.

Después de la transformación de una cepa hospedadora adecuada y el crecimiento de la cepa hospedadora hasta una densidad celular apropiada, se induce el promotor seleccionado mediante medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional.

Las células se recolectan típicamente por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos y el extracto bruto resultante se conserva para purificación adicional.

Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o uso de agentes lisantes de célula, tales métodos se conocen bien para los expertos en la materia.

Diversos sistemas de cultivos celulares de mamíferos también pueden emplearse para expresar proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, Cell 23: 175 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados y también cualquier sitio de unión a ribosomas necesario, sitios de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. Las secuencias de ADN derivadas del corte y empalme de SV40 y los sitios de poliadenilación pueden usarse para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Pueden usarse etapas de plegamiento de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación finales.

Los polipéptidos pueden ser un producto purificado de forma natural o un producto de procedimientos sintéticos químicos o producirse por técnicas recombinantes de un hospedador procarionota o eucariota (por ejemplo, por células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos en cultivo). Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos pueden ser glucosilados o pueden ser no glucosilados. Los polipéptidos también pueden incluir un resto aminoacídico de metionina inicial.

Los polinucleótidos y polipéptidos pueden emplearse como reactivos y materiales de investigación para el descubrimiento de tratamientos y diagnósticos para enfermedades humanas.

El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede emplearse en un procedimiento para explorar con respecto a compuestos que activan (agonistas) o inhiben (antagonistas) la activación del polipéptido del receptor.

En general, dichos procedimientos de exploración implican proporcionar células apropiadas que expresan el polipéptido del receptor en la superficie de las mismas. Dichas células incluyen células de mamíferos, levadura, drosófila o *E. coli*. En particular, un polinucleótido que codifica el receptor se emplea para transfectar células para expresar de este modo el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). El receptor expresado se pone en contacto después con un compuesto de ensayo para observar la unión, estimulación o inhibición de una respuesta funcional.

Un procedimiento de exploración tal implica el uso de melanóforos que se transfectan para expresar el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Una técnica de exploración tal se describe en el documento PCT WO 92/01810 publicado el 6 de febrero de 1992.

De este modo, por ejemplo, tal ensayo puede emplearse para explorar con respecto a un compuesto que inhibe la activación del polipéptido del receptor poniendo en contacto las células de melanóforo que codifican el receptor con el ligando de receptor y un compuesto a explorar. La inhibición de la señal generada por el ligando indica que un compuesto es un antagonista potencial para el receptor, es decir, inhibe la activación del receptor.

La exploración puede emplearse para determinar un compuesto que activa el receptor poniendo en contacto tales células con compuestos a explorar y determinando si dicho compuesto genera una señal, es decir, activa el receptor.

Otras técnicas de exploración incluyen el uso de células que expresan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo células CHO transfectadas) en un sistema que mide los cambios de pH extracelular causados por activación del receptor, por ejemplo, como se describe en Science 246: 181-296 (octubre de 1989). Por ejemplo, los compuestos pueden ponerse en contacto con una célula que expresa el polipéptido receptor y una respuesta del segundo mensajero, por ejemplo transducción de señal o cambios de pH, puede medirse para determinar si el compuesto potencial activa o inhibe al receptor.



Otra técnica de exploración tal implica introducir ARN que codifica el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en oocitos de *Xenopus* para expresar de forma transitoria el receptor. Los oocitos con receptor, pueden después ponerse en contacto con un ligando del receptor y un compuesto a explorar, seguido de detección de inhibición o activación de una señal de calcio en el caso de exploración con respecto a compuestos que se cree que inhiben la activación del receptor.

Otra técnica de exploración implica expresar el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en el que el receptor se une a una fosfolipasa C o D. Como ejemplos representativos de tales células, pueden mencionarse células endoteliales, células de músculo liso, células de riñón embrionarias, etc. La exploración puede conseguirse como se ha descrito anteriormente en la presente memoria mediante la detección de la activación del receptor o la inhibición de activación del receptor de la segunda señal de fosfolipasa.

Otro método implica explorar con respecto a compuestos que inhiben la activación de los antagonistas del polipéptido receptor mediante la activación de la inhibición de unión de ligando marcado con células que tienen el receptor en la superficie de las mismas. Dicho método implica transfectar una célula eucariota con ADN que codifica el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de modo que la célula expresa el receptor en su superficie y poner en contacto la célula con un compuesto en presencia de una forma marcada de un ligando conocido. El ligando puede marcarse, por ejemplo, mediante radiactividad. La cantidad de ligando marcado unido a los receptores se mide, por ejemplo, midiendo la radiactividad de los receptores. Si el compuesto se une al receptor como se determina por una reducción de ligando marcado que se une a los receptores, la unión de ligando marcado con el receptor se inhibe.

Un anticuerpo, o en algunos casos un oligopéptido, puede activar un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), mediante su unión con el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y el inicio de la respuesta de segundo mensajero. Los anticuerpos incluyen anticuerpo anti-idiotípicos que reconocen determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Los compuestos agonistas potenciales también incluyen proteínas que están cercanamente relacionadas con el ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), por ejemplo, un fragmento del ligando.

Un anticuerpo, o en algunos casos un oligopéptido, puede antagonizar un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), mediante su unión con el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pero no siendo capaz de inducir una respuesta de segundo mensajero de modo que la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se evita. Los anticuerpos incluyen anticuerpos anti-idiotípicos que reconocen determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Los compuestos antagonistas potenciales también incluyen proteínas que están cercanamente relacionadas con el ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), por ejemplo, un fragmento del ligando que ha perdido la función biológica y no induce respuesta cuando se une con el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Una construcción antisentido preparada a través del uso de tecnología Antisentido, puede usarse para controlar la expresión génica a través de formación de triples hélices o ARN o ADN antisentido, basándose ambos métodos en la unión de un polinucleótido con ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia polinucleotídica, que codifica los polipéptidos maduros, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para ser complementario con una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice; véase Lee *et al.*, Nucl. Acids Res. 6: 3073 (1979); Cooney *et al.*, Science 241: 456 (1988); y Dervan *et al.*, Science 251: 1360 (1991)), evitando de este modo transcripción y la producción del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). El oligonucleótido de ARN anti-sentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de moléculas de ARNm a receptor acoplado a proteína G (antisentido - Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden suministrarse a células de modo que el ADN o ARN antisentido puede expresarse *in vivo* para inhibir la producción de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Una molécula pequeña que se une al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), haciéndolo inaccesible a ligandos de modo que se evita la actividad biológica normal, por ejemplo moléculas de tipo péptido o péptidos pequeños, también puede usarse para inhibir la activación del polipéptido receptor.

Una forma soluble del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), por ejemplo un fragmento de los receptores, puede usarse para inhibir la activación del receptor mediante unión con el ligando de un polipéptido descrito en la presente memoria y evitando que el ligando interaccione con el Receptor de Quimiocina de proteína G unido a membrana (CCR5).

Los compuestos que se unen y activan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden emplearse para estimular hematopoyesis, cicatrización, coagulación, angiogénesis, para tratar tumores sólidos, infecciones crónicas, leucemia, enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T, infecciones parasitarias, psoriasis y para estimular la actividad de factor de crecimiento.

Los compuestos que se unen e inhiben el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden emplearse para

tratar alergia, aterogénesis, anafilaxis, tumores malignos, inflamación crónica y aguda, reacciones alérgicas mediadas por histamina e IgE, fiebre independiente de prostaglandina, insuficiencia de médula ósea, silicosis, sarcoidosis, artritis reumatoide, choque y síndrome hipereosinofílico.

5 Los compuestos pueden emplearse en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo incluye pero sin limitación solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

10 Se describe un paquete farmacéutico o kit que comprende uno o más envases que contienen uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociado con dicho envase o dichos envases puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia de gobierno que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana. Además, los compuestos de la presente invención pueden emplearse junto con otros compuestos terapéuticos.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de una manera conveniente tal como por las vías tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad que es eficaz para el tratamiento y/o profilaxis del síntoma específico. En general las composiciones farmacéuticas se administrarán en una cantidad de al menos aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal y en la mayoría de los casos se administrarán en una cantidad de no más de aproximadamente 8 mg/kg de peso corporal por día. En la mayoría de los casos, la dosificación es de aproximadamente 10 µg/kg a 20 aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal diario, teniendo en cuenta las vías de administración, síntomas, etc.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y antagonistas o agonistas que son polipéptidos, también pueden emplearse mediante expresión de tales polipéptidos *in vivo*, que con frecuencia se denomina "terapia génica".

25 De este modo, por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genética células de un paciente con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifique un polipéptido *ex vivo*, proporcionándose después las células modificadas por ingeniería genética a un paciente a tratar con el polipéptido. Tales métodos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, pueden modificarse células por ingeniería genética mediante procedimientos conocidos en la técnica mediante el uso de una partícula retroviral que contiene ARN que codifica un polipéptido como se ha descrito anteriormente.

30 De forma similar, pueden modificarse por ingeniería genética células *in vivo* para la expresión de un polipéptido *in vivo* mediante, por ejemplo, procedimientos conocidos en la técnica. Como se conoce en la técnica, una célula productora para producir una partícula retroviral que contiene ARN que codifica el polipéptido puede administrarse a un paciente para modificar por ingeniería genética células *in vivo* y expresión del polipéptido *in vivo*. Estos y otros métodos para administrar un polipéptido por tal método deberían resultar evidentes para los expertos en la materia a partir de las enseñanzas de la presente descripción. Por ejemplo, el vehículo de expresión para modificar células por 35 ingeniería genética puede ser distinto de un retrovirus, por ejemplo, un adenovirus que puede usarse para modificar células por ingeniería genética *in vivo* después de la combinación con un vehículo de suministro adecuado.

40 Los retrovirus de los que pueden derivar los vectores plasmídicos retrovirales mencionados anteriormente en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, Virus de la Leucemia Murina de Moloney, virus de la necrosis del bazo, retrovirus tales como Virus del Sarcoma de Rous, Virus del Sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de la leucemia de los gibones, virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, Virus del Sarcoma Mieloproliferativo y virus del tumor de mama. El vector plasmídico retroviral deriva del virus de la Leucemia Murina de Moloney.

45 El vector incluye uno o más promotores. Los promotores adecuados que pueden emplearse incluyen, sin limitación, el LTR retroviral; el promotor SV40; y el promotor del citomegalovirus humano (CMV) descrito en Miller, *et al.*, Biotechniques 7: 980-990 (1989), o cualquier otro promotor (por ejemplo, promotores celulares tales como promotores celulares eucariotas incluyendo, pero sin limitación, los promotores de histona, pol III y β-actina). Otros promotores virales que pueden emplearse incluyen, pero sin limitación, promotores de adenovirus, promotores de timidina quinasa (TK) y promotores de parvovirus B19. La selección de un promotor adecuado resultará evidente para los expertos en la materia a partir de las enseñanzas contenidas en la presente memoria.

50 La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido está bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que pueden emplearse incluyen, sin limitación, promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal adenoviral; o promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor de virus sincitial respiratorio (VSR); promotores inducibles, tales como el promotor de MMT, el promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; el promotor de albúmina; el promotor de ApoA1; los promotores de globina humana; los promotores de timidina quinasa viral, tales como el promotor de timidina quinasa de Herpes Simple; LTR retrovirales (incluyendo los LTR retrovirales modificados descritos anteriormente en la presente memoria); el promotor de β-actina; y promotores de la hormona del crecimiento humana. El promotor también puede 55 ser el promotor nativo que controla los genes que codifican los polipéptidos.

El vector plasmídico retroviral se emplea para transducir líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Los ejemplos de células de empaquetamiento que pueden transfectarse incluyen, pero sin limitación, las líneas celulares PE501, PA317,  $\psi$ -2,  $\psi$ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2,  $\psi$ CRE,  $\psi$ CRIP, GP+E-86, GP+envAM12, y DAN como se describe en Miller, Human Gene Therapy 1: 5-14 (1990). El vector puede transducir las células de empaquetamiento a través de cualquier medio conocido en la técnica. Tales medios incluyen, pero sin limitación, electroporación, el uso de liposomas y precipitación por  $\text{CaPO}_4$ . En una alternativa, el vector plasmídico retroviral puede encapsularse en un liposoma o acoplarse a un lípido y después administrarse a un hospedador.

La línea celular productora genera partículas de vectores retrovirales infecciosas que incluyen la secuencia o las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos. Tales partículas de vector retroviral pueden emplearse después para transducir células eucariotas *in vitro* o *in vivo*. Las células eucariotas transducidas expresarán la secuencia o las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido. Las células eucariotas que pueden transducirse incluyen, pero sin limitación, células madre embrionarias, células de carcinoma embrionario, así como células madre hematopoyéticas, hepatocitos, fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células epiteliales bronquiales.

También se describe un método para determinar si un ligando que no se sabe que sea capaz de unirse a un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede unirse a un receptor tal que comprende poner en contacto una célula de mamífero que expresa un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con el ligando en condiciones que permitan la unión de ligandos con el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), detectar la presencia de un ligando que se une al receptor y determinar de este modo si el ligando se une al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los sistemas descritos anteriormente en la presente memoria para determinar agonistas y/o antagonistas también pueden emplearse para determinar ligandos que se unen al receptor.

Se describe un método para detectar la expresión de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en la superficie de una célula mediante la detección de la presencia de ARNm que codifica el receptor que comprende obtener ARNm total de la célula y poner en contacto el ARNm obtenido de este modo con una sonda de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico de al menos 10 nucleótidos capaz de hibridar específicamente con una secuencia incluida dentro de la secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor en condiciones hibridantes, detectar la presencia de ARNm hibridado con la sonda y de este modo detectar la expresión del receptor por la célula.

Se describe un método para identificar receptores relacionados con los polipéptidos receptores. Estos receptores relacionados pueden identificarse mediante homología con un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), mediante hibridación cruzada de baja rigurosidad o mediante la identificación de receptores que interaccionan con ligandos naturales y sintéticos relacionados y/o inducen comportamientos similares después de bloqueo genético o farmacológico de los polipéptidos receptores de quimiocina.

Pueden usarse fragmentos de los genes como una sonda de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar otros genes que tienen una alta similitud de secuencia con los genes o que tienen actividad biológica similar. Las sondas de este tipo tienen al menos 20 bases, preferiblemente al menos 30 bases y más preferiblemente al menos 50 bases o más. La sonda puede usarse también para identificar un clon de ADNc que se corresponde con un transcrito de longitud completa y un clon o clones genómicos que contienen el gen completo incluyendo regiones reguladora y promotora, exones e intrones. Un ejemplo de una exploración de este tipo comprende aislar la región codificante del gen mediante el uso de la secuencia conocida de ADN para sintetizar una sonda oligonucleotídica. Los oligonucleótidos marcados que tienen una secuencia complementaria a la de los genes descritos en la presente memoria se usan para explorar una biblioteca de ADNc, ADN genómico o ARNm humanos para determinar con que miembros de la biblioteca hibrida la sonda.

Se describe el uso de los genes como un diagnóstico, por ejemplo, algunas enfermedades resultarán de genes defectuosos heredados. Estos genes pueden detectarse mediante la comparación de las secuencias del gen defectuoso con las de uno normal. Posteriormente, puede verificarse que un gen "mutante" está asociado con una actividad receptora anómala. Además, pueden insertarse genes de receptores mutantes en un vector adecuado para la expresión en un sistema de ensayo funcional (por ejemplo, ensayo colorimétrico, expresión en placas de MacConkey, experimentos de complementación, en una cepa deficiente en receptor de células HEK293) como otro medio más para verificar o identificar la mutación. Una vez que se han identificado genes "mutantes", puede explorarse la población con respecto a vehículos del gen receptor "mutante".

Los individuos que portan mutaciones en el gen pueden detectarse en los niveles de ADN por una diversidad de técnicas. Pueden obtenerse ácidos nucleicos usados para diagnóstico de las células de un paciente, incluyendo pero sin limitación tales como de sangre, de orina, de saliva, de biopsia de tejido y material de autopsia. El ADN genómico puede usarse directamente para detección o puede amplificarse enzimáticamente mediante el uso de PCR (Saiki, *et al.*, Nature 324: 163-166 (1986)) antes del análisis. También puede usarse ARN o ADNc para el mismo propósito. Como ejemplo, pueden usarse cebadores de PCR complementarios al ácido nucleico de la presente invención para identificar y analizar mutaciones en el gen. Por ejemplo, pueden detectarse deleciones e inserciones mediante un cambio en tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Pueden identificarse mutaciones puntuales mediante la hibridación de ADN amplificado con ARN radiomarcado o, como alternativa,

secuencias de ADN antisentido radiomarcadas. Pueden distinguirse secuencias perfectamente coincidentes de dobles cadenas no coincidentes mediante digestión con RNasa A o por diferencias en temperaturas de fusión. Un diagnóstico tal sería particularmente útil para ensayos prenatales o incluso neonatales.

Las diferencias de secuencia entre el gen de referencia y "mutantes" puede revelarse mediante el método de la secuenciación de ADN directa. Además, pueden usarse segmentos de ADN clonado como sondas para detectar segmentos de ADN específicos. La sensibilidad de este método se potencia en gran medida cuando se combina con PCR. Por ejemplo, un cebador de secuencia se usa con un producto de PCR bicatenario o una molécula molde monocatenaria generada por una PCR modificada. La determinación de la secuencia se realiza por procedimientos convencionales con nucleótido radiomarcado o mediante un procedimiento de secuenciación automática con marcadores fluorescentes.

Los ensayos genéticos basados en diferencias de secuencia de ADN pueden conseguirse mediante detección de las alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de ADN en geles con o sin agentes desnaturalizantes. Los cambios de secuencias en localizaciones específicas también pueden revelarse por ensayos de protección del núcleo, tales como protección de S1 y RNasa o el método de escisión química (por ejemplo Cotton, *et al.*, PNAS, USA 85: 4397-4401 (1985)).

Además, algunas enfermedades son un resultado de, o están caracterizadas por cambios en la expresión génica que pueden detectarse mediante cambios en el ARNm. Como alternativa, los genes pueden usarse como una referencia para identificar individuos que expresan una disminución de las funciones asociada con receptores de este tipo.

La presente descripción también se refiere a un ensayo de diagnóstico para detectar niveles alterados de formas solubles de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en diversos tejidos. Los ensayos usados para detectar niveles de los polipéptidos receptores solubles en una muestra derivada de un hospedador se conocen bien para los expertos en la materia e incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia de Western y preferiblemente como ensayo de ELISA.

Un ensayo de ELISA inicialmente comprende preparar un anticuerpo específico para antígenos de los polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Además se prepara un anticuerpo informador contra el anticuerpo monoclonal. Al anticuerpo informador se une un reactivo detectable tal como radiactividad, fluorescencia o, en este ejemplo, una enzima peroxidasa de rábano rusticano. Se retira ahora una muestra de un hospedador y se incuba en un soporte sólido, por ejemplo una placa de poliestireno, que se une a las proteínas en la muestra. Cualquier sitio de unión de proteína libre en la placa se cubre después por incubación con una proteína no específica tal como albúmina de suero bovino. A continuación, el anticuerpo monoclonal se incuba en la placa, tiempo durante el cual los anticuerpos monoclonales se unen a cualquier proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) unida a la placa de poliestireno. Todos los anticuerpos monoclonales no unidos se retiran por lavado con tampón. El anticuerpo informador unido a peroxidasa de rábano rusticano se coloca ahora en la placa dando como resultado la unión del anticuerpo informador con cualquier anticuerpo monoclonal unido a proteínas Receptoras de Quimiocina de proteína G (CCR5). Después se retira por lavado el anticuerpo informador no unido. Se añaden después sustrato de peroxidasa a la placa y la cantidad de color desarrollado en un periodo de tiempo dado es una medida de la cantidad de proteínas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) presentes en un volumen dado de una muestra de paciente cuando se compara frente a una curva patrón.

Las secuencias también son valiosas para identificación cromosómica. La secuencia se dirige específicamente a y puede hibridar con una localización particular en un cromosoma humano individual. Además, existe una necesidad actual para identificar sitios particulares en los cromosomas. Pocos reactivos marcadores de cromosomas basados en datos de secuencias reales (polimorfismos de repetición) están disponibles actualmente para marcar localizaciones cromosómicas. El mapeo de ADN en cromosomas es una primera etapa importante al correlacionar esas secuencias con genes asociados con enfermedad.

Brevemente, las secuencias pueden mapearse en cromosomas mediante la preparación de cebadores de PCR (preferiblemente 15-25 pb) del clon. Se usa análisis informático del ADN del clon depositado para seleccionar rápidamente cebadores que no abarcan más de un exón en el ADN genómico, complicando de este modo el proceso de amplificación. Estos cebadores se usan después para la exploración por PCR de híbridos celulares somáticos que contienen cromosomas humanos individuales. Solamente los híbridos que contienen el gen humano que corresponde al cebador producirán un fragmento amplificado.

El mapeo de PCR de híbridos celulares somáticos es un procedimiento rápido para asignar un ADN particular a un cromosoma particular. Usando los mismos cebadores oligonucleotídicos, la sublocalización puede conseguirse con paneles de fragmentos de cromosomas específicos o grupos de clones genómicos grandes de una manera análoga. Otras estrategias de mapeo que pueden usarse de forma similar para mapear en su cromosoma incluyen hibridación *in situ*, preexploración con cromosomas seleccionados por flujo marcados y preselección por hibridación para construir bibliotecas de ADN específico de cromosomas.

Puede usarse hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) de un clon de ADN en una distribución cromosómica de

metafase para proporcionar una localización cromosómica precisa en una etapa. Esta técnica puede usarse con ADN tan corto como 50 ó 60 bases. Para una revisión de esta técnica, véase Verma *et al.*, Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York (1988).

Una vez que se ha mapeado una secuencia en una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma puede correlacionarse con datos de mapa genético. Tales datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en línea a través de Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre genes y enfermedades que se han mapeado en la misma región cromosómica se identifica después a través de análisis de ligación (herencia conjunta de genes físicamente adyacentes).

A continuación, es necesario determinar las diferencias en el ADNc o la secuencia genómica entre individuos afectados y no afectados. Si una mutación se observa en algunos o todos los individuos afectados pero no en ningún individuo normal, entonces la mutación probablemente es el agente causante de la enfermedad.

Con la resolución actual de las técnicas de mapeo genético y mapeo físico, un ADNc localizado de forma precisa en una región cromosómica asociada con la enfermedad podría ser uno de entre 50 y 500 genes causantes potenciales (esto asume una resolución de mapeo de 1 megabase y un gen por 20 kb).

Los polipéptidos, sus fragmentos u otros derivados o análogos de los mismos, o células que los expresan pueden usarse como un inmunógeno para producir anticuerpos para los mismos. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. Se describen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados, así como fragmentos Fab o el producto de una biblioteca de expresión de Fab. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de tales anticuerpos y fragmentos.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos que corresponden a una secuencia descrita anteriormente pueden obtenerse por inyección directa de los polipéptidos en un animal o mediante la administración de los polipéptidos a un animal, preferiblemente no humano. El anticuerpo obtenido de este modo se unirá después a los polipéptidos en sí mismos. De esta manera, incluso una secuencia que codifica solamente un fragmento de los polipéptidos puede usarse para generar anticuerpos que se unen a todos los polipéptidos nativos. Tales anticuerpos pueden usarse después para aislar el polipéptido de tejido que expresa ese polipéptido.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuos. Los ejemplos incluyen la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, Nature 256: 495-497 (1975)), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, Immunology Today 4: 72 (1983)), y la técnica de hibridoma-VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole, *et al.*, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), págs. 77-96).

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla para productos polipeptídicos inmunogénicos descritos en la presente memoria. Además, pueden usarse ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados para productos polipeptídicos o inmunogénicos.

La presente invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos; sin embargo, debe entenderse que la presente invención no se limita a tales ejemplos. Todas las partes o cantidades a no ser que se especifique de otro modo, están por peso.

Para facilitar el entendimiento de los siguientes ejemplos se describirán ciertos métodos y/o términos de frecuente aparición.

Los "plásmidos" se designan mediante una p precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos de partida en la presente memoria están disponibles en el mercado, disponible públicamente de forma no restringida o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con procedimientos publicados. Además, plásmidos equivalentes a los descritos se conocen en la técnica y resultarán evidentes para los expertos en la materia.

"Digestión" de ADN se refiere a escisión catalítica del ADN con una enzima de restricción que actúa solamente en ciertas secuencias en el ADN. Las diversas enzimas de restricción usadas en la presente memoria están disponibles en el mercado y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requisitos se usaron como conocen los expertos en la materia. Para fines analíticos, típicamente se usa 1 µg de plásmido o fragmento de ADN con aproximadamente 2 unidades de enzima en aproximadamente 20 µl de solución de tampón. Para el fin de aislar fragmentos de ADN para la construcción de plásmidos, típicamente se digieren de 5 a 50 µg de ADN con de 20 a 250 unidades de enzima en un volumen mayor. Los tampones y cantidades de sustrato apropiados para enzimas de restricción particulares se especifican por el fabricante. Se usan de forma ordinaria tiempos de incubación de aproximadamente 1 hora a 37°C, pero pueden variar de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de la digestión la reacción se somete a electroforesis directamente en un gel de poliacrilamida para aislar el fragmento deseado.

La separación por tamaño de los fragmentos escindidos se realiza usando gel de poliacrilamida al 8 por ciento

descrito por Goeddel, D. *et al.*, Nucleic Acids Res. 8: 4057 (1980).

“Oligonucleótidos” se refiere a polidesoxinucleótidos monocatenarios o dos hebras complementarias de polidesoxinucleótido que pueden sintetizarse químicamente. Tales oligonucleótidos sintéticos no tienen fosfato 5' y de este modo no se ligarán con otro oligonucleótido sin añadir un fosfato con un ATP en presencia de una quinasa. Un oligonucleótido sintético se ligará con un fragmento que no se ha desfosforilado.

“Ligación” se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico bicatenarios (Maniatis, T., *et al.*, *Id.*, p. 146). A no ser que se proporcione de otro modo, la ligación debe conseguirse usando tampones y condiciones conocidas con 10 unidades de ADN ligasa T4 (“ligasa”) por cada 0,5 µg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a ligar.

A no ser que se indique de otro modo, la transformación se realizó como se describe en el método de Graham, F. y Van der Eb, A., Virology 52: 456-457 (1973).

En la presente invención, “aislado” se refiere a material retirado de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si es de origen natural) y de este modo está alterado “por la mano del hombre” de su estado natural. Por ejemplo, un polinucleótido aislado podría ser parte de un vector o una composición de materia o podría estar contenido dentro de una célula y aún así estar “aislado” debido a que el vector, composición de materia o célula particular no es el ambiente original del polinucleótido. El término “aislado” no se refiere a bibliotecas genómicas o de ADNc, preparaciones de célula total completa o ARNm, preparaciones de ADN genómico (incluyendo las separadas por electroforesis y transferidas a manchas de transferencia), preparaciones de ADN genómico de célula completa cortado u otras composiciones en las que la técnica no demuestra características distintivas del polinucleótido/secuencias.

Una proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) “secretada” o “soluble” se refiere a una proteína capaz de dirigirse al RE, vesículas secretoras o el espacio extracelular como resultado de una secuencia señal, así como una proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) liberada en el espacio extracelular sin contener necesariamente una secuencia señal. Si la proteína secretada del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se libera al espacio extracelular, la proteína secretada del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede experimentar un procesamiento extracelular para producir una proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) “madura”. La liberación en el espacio extracelular puede producirse por muchos mecanismos, incluyendo exocitosis y escisión proteolítica. Los ejemplos de proteínas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) secretadas o solubles incluyen fragmentos que comprenden, o como alternativa que consisten en, partes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) descrito en la presente memoria. Los fragmentos secretados o solubles preferidos comprenden un bucle extracelular, un bucle intracelular, el domino extracelular N terminal o el domino intracelular C terminal o fragmentos de los mismos. Los fragmentos secretados o solubles preferidos adicionales comprenden un epítipo del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), tal como se describe en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, un “polinucleótido” del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se refiere a una molécula que tiene una secuencia de ácido nucleico contenida en SEC ID N°: 1 o el ADN del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) contenido dentro del clon depositado en la ATCC. Por ejemplo, el polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede contener la secuencia de nucleótidos de la secuencia genómica de longitud completa, incluyendo las secuencias no traducidas 5' y 3', la región codificante, con o sin la secuencia señal, la región codificante de la proteína secretada, así como fragmentos, epítopos, dominios y variantes de la secuencia de ácido nucleico. Además, como se usa en la presente memoria, un “polipéptido” del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se refiere a una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos traducida generada del polinucleótido como se define de forma general.

Los polinucleótidos tienen al menos 15, al menos 30, al menos 50, al menos 100, al menos 125, al menos 500 o al menos 1000 nucleótidos continuos pero son de menos o igual a 300 kb, 200 kb, 100 kb, 50 kb, 15 kb, 10 kb, 7,5 kb, 5 kb, 2,5 kb, 2,0 kb o 1 kb, de longitud. Los polinucleótidos comprenden una parte de las secuencias codificantes, como se describe en la presente memoria, pero no comprenden toda o una parte de ningún intrón. Los polinucleótidos que comprenden secuencias codificantes no contienen secuencias codificantes de un gen flanqueante genómico (es decir 5' o 3' del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de interés en el genoma). Los polinucleótidos no contienen la secuencia codificante de más de 1000, 500, 250, 100; 50, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 ó 1 gen o genes flanqueantes genómicos.

Un clon representativo que contiene la fase abierta de lectura de la secuencia de SEC ID N°: 1 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (“ATCC”) el 1 de junio de 1995 y obtuvo el Número de Depósito de ATCC 97183. La ATCC está localizada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos. El depósito de ATCC se realizó conforme a los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines de patente.

Un “polinucleótido” del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también incluye los polinucleótidos capaces de hibridar, en condiciones de hibridación rigurosas con secuencias contenidas en SEC ID N°: 1, el complemento de

las mismas o el ADN dentro del clon depositado. "Condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a una incubación durante una noche a 42 grados C en una solución que comprende formamida 50%, SSC 5x (NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano 10% y ADN de esperma de salmón cortado, desnaturalizado 20 µg/ml, seguido del lavado de los filtros en SSC 0,1x a aproximadamente 65 grados C.

También se contemplan moléculas de ácido nucleico que hibridan con los polinucleótidos de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en condiciones de hibridación de baja rigurosidad. Los cambios en la rigurosidad de la hibridación y la detección de la señal se consiguen principalmente a través de la manipulación de la concentración de formamida (porcentajes menores de formamida dan como resultado una menor rigurosidad); condiciones salinas o temperatura. Por ejemplo, las condiciones de baja rigurosidad incluyen una incubación durante una noche a 37 grados C en una solución que comprende SSPE 6X (SSPE 20X = NaCl 3 M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M; EDTA 0,02 M, pH 7,4), SDS 0,5%, formamida 30%, ADN de bloqueo de esperma de salmón 100 µg/ml; seguido de lavados a 50 grados C con SSPE 1X, SDS 0,1%. Además, para conseguir una rigurosidad aún menor, pueden hacerse lavados realizados después de hibridación rigurosa a concentraciones salinas mayores (por ejemplo SSC 5X).

Obsérvese que pueden conseguirse variaciones en las condiciones anteriores a través de la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos usados para suprimir el fondo en los experimentos de hibridación. Los reactivos de bloqueo típicos incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado y formulaciones patentadas disponibles en el mercado. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas con la compatibilidad.

Por supuesto, un polinucleótido que hibrida solamente con secuencias de poliA+ (tales como cualquier región poliA+ 3' terminal de un ADN mostrada en la lista de secuencias) o con un tramo complementario de restos T (o U), no se incluiría en la definición de "polinucleótido", puesto que un polinucleótido tal hibridaría con cualquier molécula de ácido nucleico que contenga un tramo de poli (A) o el complemento del mismo (por ejemplo, prácticamente cualquier clon de ADN bicatenario generado usando oligo dT como un cebador).

El polinucleótido de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ADN o ARN no modificado o ADN o ARN modificado. Por ejemplo, los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden estar compuestos de ADN mono o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden estar compuestos de regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también pueden contener una o más bases modificadas de cadenas principales de ADN o ARN modificadas con respecto a estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases no habituales tales como inosina. Puede realizarse una diversidad de modificaciones al ADN y al ARN; de este modo, "polinucleótido" abarca formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente.

Los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden estar compuestos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden modificarse por procedimientos naturales, tales como procesamiento postraduccion, o por técnicas de modificación químicas que se conocen bien en la materia. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en un gran volumen de bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden producirse en cualquier sitio en el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), incluyendo la cadena principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxi terminales. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o diversos grados en varios sitios en un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) dado. Además, un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinización, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procedimientos naturales postraduccionales o pueden prepararse por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto de hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinización. (Véase, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION

OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, Meth Enzymol 182: 626-646 (1990); Rattan *et al.*, Ann NY Acad Sci 663: 48-62 (1992).

“SEC ID N°: 1” se refiere a la secuencia polinucleotídica del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mientras que “SEC ID N°: 2” se refiere a la secuencia polipeptídica del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

- 5 Un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) “que tiene actividad biológica” se refiere a polipéptidos que muestran actividad similar, pero necesariamente idéntica a, una actividad de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), incluyendo formas maduras, según se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de dosis. En el caso en el que exista dependencia de dosis, no es necesario que sea idéntica a la del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), sino más bien sustancialmente similar a la dependencia de dosis en una actividad dada en comparación con el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, el polipéptido candidato mostrará una actividad mayor o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferiblemente, no más de aproximadamente 10 veces menos actividad y más preferiblemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad en relación con el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)).

#### 15 **Polinucleótidos y polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

- Se aisló el clon HDGMR10 de una biblioteca de ADN genómico de monocitos humanos. Este clon contiene la región codificante completa identificada como SEC ID N°: 2. El clon depositado contiene un inserto de ADN que tiene un total de 1414 nucleótidos, que codifica una fase abierta de lectura predicha de 352 restos aminoácidos. (Véase FIGURA 1). La fase abierta de lectura comienza en una metionina N terminal localizada en la posición de nucleótido 259 y termina en el último triplete que codifica un aminoácido en la posición de nucleótido 1314. El codón de terminación está en las posiciones 1315-1317.

- El análisis de expresión posterior también mostró expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en macrófagos, incluyendo células dendríticas inmaduras tales como células de Langerhans, y linfocitos T, incluyendo linfocitos efector Th0 y Th1, un patrón coherente con la expresión específica del sistema inmune. También se ha detectado el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en microglía, astrocitos, neuronas y células endoteliales vasculares del sistema nervioso central (SNC). El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también se expresa en monocitos y linfocitos T en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y también se ha implicado en otras formas de artritis.

- Receptores de Quimiocina acoplados a proteína G.** Usando análisis BLAST, se descubrió que SEC ID N°: 2 era homóloga a miembros de la familia del Receptor de Quimiocina ACOPLADO a proteína G. Particularmente, SEC ID N°: 2 contiene dominios homólogos al producto de traducción del ARNm de MonoMac 6 para el receptor de MCP-1 humano (MCP-1R) A (FIGURA 2) (N° de Acceso de GenBank U03882; SEC ID N°: 9), incluyendo el dominio transmembrana que contiene siete segmentos transmembrana característicos de la familia del receptor acoplado a proteína G, que comienza con el aminoácido 37 de SEC ID N°: 2 o el polipéptido codificado por el clon depositado. El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también incluye el motivo DRY, que se sabe que es necesario para la transducción de señal, hallado en muchos receptores acoplados a proteína G inmediatamente después del tercer segmento transmembrana. Debido a que se cree que MCP-1R es importante en el sistema inmune, la homología entre MCP-1R y el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) sugiere que el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también puede estar implicado en el sistema inmune.

- También se ha aislado una segunda secuencia de MCP-1R que es idéntica a la secuencia del MCP-1RA de la región no traducida 5' a través del séptimo dominio transmembrana potencial pero que contiene una cola citoplasmática diferente. Esta segunda secuencia, denominada MCP-1RB, parece ser una versión de corte y empalme alternativo de MCP-1RA. Se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N° 5.707.815.

- Dominios.** Usando análisis de BLAST, se descubrió que SEC ID N°: 2 era homóloga a miembros de la familia del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Particularmente, SEC ID N°: 2 contiene dominios homólogos al producto de traducción del ARNm de MonoMac 6 para el receptor de MCP-1 humano (MCP-1R) A (FIGURA 2) (N° de Acceso de GenBank U03882; SEC ID N°: 9), incluyendo los siguientes dominios conservados: (a) un dominio extracelular N terminal predicho localizado aproximadamente en los aminoácidos 1 a 36; (b) un dominio transmembrana predicho localizado aproximadamente en los aminoácidos 37 a 305; y (c) un dominio intracelular C terminal predicho localizado aproximadamente en los aminoácidos 306 a 352. El dominio transmembrana predicho incluye: siete segmentos transmembrana aproximadamente en los aminoácidos 37 a 58 (segmento 1), 68 a 88 (segmento 2), 103 a 124 (segmento 3), 142 a 166 (segmento 4), 196 a 223 (segmento 5), 236 a 260 (segmento 6) y 287 a 305 (segmento 7); tres bucles intracelulares aproximadamente en los aminoácidos 59 a 67 (bucle intracelular 1), 125 a 141 (bucle intracelular 2) y 224 a 235 (bucle intracelular 3); y tres bucles extracelulares aproximadamente en los aminoácidos 89 a 102 (bucle extracelular 1), 167 a 195 (bucle extracelular 2) y 261 a 274 (bucle extracelular 3). Se describen estos fragmentos polipeptídicos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como se ha definido anteriormente o como se codifica por el clon depositado (SEC ID N°: 22) así como combinaciones de estas y otras regiones descritas en la presente memoria. También se describen polipéptidos que excluyen uno o más de estos dominios, segmentos y bucles. Los “bucles” también se denominan “regiones”, “dominios” y “partes” en la



presente memoria y en la técnica, por ejemplo, “regiones” extracelulares, “regiones” intracelulares, “dominios” extracelulares y “dominios” intracelulares, “partes” extracelulares y “partes” intracelulares.

SEC ID N°: 1 y la SEC ID N°: 2 traducida son suficientemente precisas y adecuadas de otro modo para una diversidad de usos bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente a continuación. Por ejemplo, SEC ID N°: 1 es útil para diseñar sondas de hibridación de ácido nucleico que detectarán secuencia de ácido nucleico contenidas en SEC ID N°: 1 o el ADN contenido en el clon depositado. Estas sondas también hibridarán con moléculas de ácido nucleico en muestras biológicas, permitiendo de este modo una diversidad de métodos forenses y de diagnóstico de la invención. De forma similar, los polipéptidos identificados a partir de SEC ID N°: 2 pueden usarse, por ejemplo, para generar anticuerpos que se unen específicamente a proteínas del Receptor de Quimiocina de proteína G.

Sin embargo, las secuencias de ADN generadas por reacciones de secuenciación pueden contener errores de secuenciación. Los errores existen como nucleótidos identificados erróneamente o como inserciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de ADN generada. Los nucleótidos insertados o deleccionados erróneamente causan desplazamientos de fase en las fases de lectura de la secuencia de aminoácidos predicha. En estos casos, la secuencia de aminoácidos predicha difiere de la secuencia de aminoácidos real, incluso aunque la secuencia de ADN generada puede ser idéntica en más del 99,9% a la secuencia de ADN real (por ejemplo, una inserción o deleción de una base en una fase abierta de lectura de más de 1000 bases).

En consecuencia, para las aplicaciones que requieren precisión en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos, la presente invención proporciona no solamente la secuencia de nucleótidos generada identificada como SEC ID N°: 1 y la secuencia de aminoácidos traducida predicha identificada como SEC ID N°: 2, sino también una muestra de ADN plasmídico que contiene un ADN humano del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) depositado en la ATCC. La secuencia de nucleótidos del clon del Receptor de Quimiocina de proteína G depositado (CCR5) puede determinarse fácilmente mediante la secuenciación del clon depositado de acuerdo con métodos conocidos. La secuencia de aminoácidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) predicha puede verificarse después a partir de tales depósitos. Además, la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el clon depositado también puede determinarse directamente por secuenciación peptídica o mediante la expresión de la proteína en una célula hospedadora adecuada que contiene el ADN del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) humano depositado, recogiendo la proteína y determinado su secuencia. Una muestra del clon depositado, que contiene la fase abierta de lectura del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), se ha obtenido de la ATCC y se ha resecuenciado. Los datos de secuencia del clon resecuenciado se muestran en SEC ID N°: 21 y 22. SEC ID N°: 21 difiere de SEC ID N°: 1 en 5 posiciones (nucleótidos 320, 433, 442, 646 y 1289 de SEC ID N°: 1) SEC ID N°: 22 difiere de SEC ID N°: 2 en 5 posiciones (restos aminoacídicos 21, 59, 62, 130 y 344).

La presente descripción también se refiere al gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) correspondiente a SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 o el clon depositado. El gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede aislarse de acuerdo con métodos conocidos usando la información de secuencia descrita en la presente memoria. Tales métodos incluyen preparar sondas o cebadores de la secuencia descrita e identificar o amplificar el gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de fuentes apropiadas de material genómico.

También se describen variantes alélicas, ortólogos y/u homólogos de especie. Pueden usarse procedimientos conocidos en la técnica para obtener genes de longitud completa, variantes alélicas, variantes de corte y empalme, partes codificantes de longitud completa, ortólogos y/u homólogos de especie de genes que corresponden a SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 o al clon depositado, usando información de las secuencias descritas en la presente memoria o los clones depositados en la ATCC. Por ejemplo, pueden aislarse e identificarse variantes alélicas y/u homólogos de especie preparando sondas o cebadores adecuados a partir de las secuencias proporcionadas en la presente memoria y explorando una fuente de ácido nucleico adecuada con respecto a variantes alélicas y/o el homólogo deseado.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden prepararse de cualquier manera adecuada. Tales polipéptidos incluyen polipéptidos de origen natural aislados, polipéptidos producidos de forma recombinante, polipéptidos producidos de forma sintética o polipéptidos producidos por una combinación de estos métodos. Los medios para preparar tales polipéptidos se conocen bien en la técnica.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden estar en forma de la proteína secretada, incluyendo la forma madura, o pueden ser parte de una proteína mayor, tal como una proteína de fusión (véase posteriormente). Con frecuencia es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contiene secuencias secretoras o líder, prosequencias, secuencias que ayudan a la purificación, tales como múltiples restos de histidina o una secuencia adicional para estabilidad durante la producción recombinante.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se proporcionan preferiblemente en una forma aislada y preferiblemente están sustancialmente purificados. Una versión producida de forma recombinante de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que incluye el polipéptido secretado, puede purificarse sustancialmente usando técnicas descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica, tales como, por ejemplo, por el método de una etapa descrito en Smith y Johnson, Gene 67: 31-40 (1988). Los

polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también pueden purificarse de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes usando técnicas descritas en la presente memoria o conocidas de otra forma en la materia, tales como, por ejemplo, anticuerpos de la invención inducidos contra la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

- 5 Se describe un polinucleótido que comprende, o como alternativa que consiste en, la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 1 y/o un clon contenido en el depósito de ATCC 97183. También se describe un polipéptido que comprende, o como alternativa, que consiste en, la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 y/o un polipéptido codificado por el clon contenido en el depósito de ATCC 97183. Los polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 y/o una secuencia
- 10 polipeptídica codificada por el clon contenido en el depósito de ATCC 97183 también se describen.

### **Secuencias Señal**

Se describen en la presente memoria fusiones de una secuencia señal con el polipéptido de SEC ID N°: 2, y fragmentos de la misma, y/o el polipéptido codificado por el clon depositado, y fragmentos del mismo, para dirigir secreción del polipéptido o fragmento. También se describen polinucleótidos que codifican tales fusiones.

- 15 También se describen formas maduras del polipéptido que tiene la secuencia de SEC ID N°: 2, y fragmentos de la misma, y/o la secuencia polipeptídica codificada por el clon depositado y fragmentos de la misma. También se describen polinucleótidos que codifican las formas maduras (tales como, por ejemplo, la secuencia polinucleotídica de SEC ID N°: 1, y fragmentos de la misma, y/o la secuencia polinucleotídica contenida en el clon depositado y fragmentos de la misma).
- 20 De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen una secuencia señal o líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena creciente a través del retículo endoplasmático rugoso. La mayoría de las células de mamífero e incluso células de insecto escinden proteínas secretadas con la misma especificidad. Sin embargo, en algunos casos, la escisión de una proteína secretada no es completamente uniforme, lo que da como resultado dos o más especies maduras de la
- 25 proteína. Adicionalmente, se ha conocido desde hace tiempo que la especificidad de escisión de una proteína secretada se determina en última instancia por la estructura primaria de la proteína completa, es decir, es inherente en la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

- Están disponibles métodos para predecir si una proteína tiene una secuencia señal, así como el punto de escisión para esa secuencia. Por ejemplo, el método de McGeoch, *Virus Res.* 3: 271-286 (1985), usa la información de una región cargada N terminal corta y una región no cargada posterior de la proteína completa (no escindida). El método de von Heinje, *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690 (1986) usa la información de los restos que rodean al sitio de escisión, típicamente los restos -13 a +2, indicando +1 el extremo amino terminal de la proteína secretada. La precisión de la predicción de los puntos de escisión de proteínas secretoras de mamífero conocidas para cada uno de estos métodos está en el intervalo de 75-80% (von Heinje, mencionado anteriormente). Sin embargo, los dos
- 30 métodos no siempre producen el mismo punto o puntos de escisión predichos para una proteína dada.

La secuencia de aminoácidos deducida de un polipéptido secretado puede analizarse por un programa informático denominado SignalP (Henrik Nielsen *et al.*, *Protein Engineering* 10:1-6 (1997)), que predice la localización celular de una proteína basándose en la secuencia de aminoácidos. Como parte de esta predicción informática de localización, se incorporan los métodos de McGeoch y von Heinje.

- 40 Como apreciaría un experto en la materia, sin embargo, los sitios de escisión a veces varían de un organismo a otro y no pueden predecirse con absoluta seguridad. La escisión de una secuencia señal heteróloga en una proteína de fusión puede producirse en el punto de unión de las secuencias polipeptídicas o la escisión puede producirse en una posición a cada lado del punto de unión. En consecuencia, se describen polipéptidos secretados que tienen una secuencia mostrada en SEC ID N°: 2, y fragmentos de los mismos, que tienen un extremo N terminal que comienza en un espacio de 5 restos (es decir, + o - 5 restos) del punto de escisión predicho. De forma similar, también se reconoce que en algunos casos, la escisión de la secuencia señal de una proteína secretada no es completamente uniforme, dando como resultado más de una especie secretada. Se describen estos polipéptidos y fragmentos, y los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos y fragmentos.
- 45

- Además, la secuencia señal identificada por el análisis anterior puede no predecir necesariamente la secuencia señal de origen natural. Por ejemplo, la secuencia señal de origen natural puede estar más arriba de la secuencia señal predicha. Sin embargo, es probable que la secuencia señal predicha sea capaz de dirigir la proteína secretada al RE. Sin embargo, se describe la proteína madura o fragmento producido por expresión de la secuencia polinucleotídica de SEC ID N°: 1 o un fragmento de la misma y/o la secuencia polinucleotídica contenida en el clon depositado o un fragmento de la misma, en una célula de mamífero (por ejemplo, células COS, como se describe posteriormente). Se describen estos polipéptidos y los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos.
- 50
- 55

### **Variantes de Polinucleótido y Polipéptido**

Se describe en la presente memoria una variante de la secuencia polinucleotídica descrita en SEC ID N°: 1, la hebra

complementaria a la misma y/o la secuencia contenida en un clon depositado.

También se describen variantes de la secuencia polipeptídica descrita en SEC ID N°: 2 y/o codificada por un clon depositado.

- 5 “Variante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pero que conserva propiedades esenciales del mismo. Generalmente, las variantes son globalmente muy similares y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

10 Se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden, o como alternativa que consisten en, una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a, por ejemplo, la secuencia codificante de nucleótidos de SEC ID N°: 1 o la hebra complementaria a la misma, la secuencia codificante de nucleótidos contenida en un clon depositado o la hebra complementaria a la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 2, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido codificado por el clon depositado HDGNR10 y/o fragmentos polinucleotídicos de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, los fragmentos descritos en la presente memoria). Los polinucleótidos que hibridan con estas  
15 moléculas de ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones de menor rigurosidad también se describen, así como polipéptidos codificados por estos polinucleótidos.

También se describen polipéptidos que comprenden, o como alternativa que consisten en, una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a, por ejemplo, la secuencia polipeptídica mostrada en SEC ID N°: 2, la secuencia polipeptídica codificada por el clon depositado y/o fragmentos polipeptídicos de cualquiera de estos polipéptidos (por ejemplo, los fragmentos descritos en la presente memoria).  
20

Mediante un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95% “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia descrita en la presente memoria, se pretende que la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico sea idéntica a las secuencias de referencia excepto en que la secuencia de nucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). En otras palabras, para obtener un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos al menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede delecionarse o sustituirse con otro nucleótido o varios nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. La secuencia de búsqueda puede ser una secuencia completa mostrada en SEC ID N°: 1, la ORF (fase abierta de lectura) del ADN de HDGNR10 en el clon depositado o cualquier fragmento especificado como se ha descrito en la presente memoria.  
25  
30

En términos prácticos, si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a una secuencia de nucleótidos o polipéptidos descrito anteriormente puede determinarse convencionalmente usando programas informáticos conocidos. Un método referido para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia de búsqueda (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también denominado un alineamiento de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci. (1990) 6: 237-245). En un alineamiento de secuencia las secuencias de búsqueda y sujeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN puede compararse convirtiendo las U a T. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en un alineamiento de FASTDB de secuencias de ADN para calcular porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuple=4, Penalización de Emparejamiento Erróneo=1, Penalización de Unión=30, Longitud de Grupo de Selección Aleatoria=0, Puntuación de Corte=1, Penalización de Hueco=5, Penalización de Tamaño de Hueco 0,05, Tamaño de Ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos sujeto, la que sea más corta.  
35  
40

Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de búsqueda debido a delecciones 5' ó 3', no debido a delecciones internas, debe realizarse una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta truncamientos 5' y 3' de la secuencia sujeto cuando calcula el porcentaje de identidad. Para secuencias sujeto truncadas en los extremos 5' ó 3', en relación con la secuencia de búsqueda, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia de búsqueda que están 5' y 3' de la secuencia sujeto, que no se emparejan/alinean, como un porcentaje del total de bases de la secuencia de búsqueda. Si un nucleótido se empareja/alinea está determinado por los resultados del alineamiento de secuencia de FASTDB. Este porcentaje se resta después del porcentaje de identidad, calculado mediante el anterior programa FASTDB usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida es lo que se usa para los fines de la presente invención. Solamente se calculan las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto, como se presenta por el alineamiento de FASTDB, que no se emparejan/alinean con la secuencia de búsqueda, con el fin de ajustar manualmente el porcentaje de identidad para la puntuación del porcentaje de identidad.  
45  
50  
55

Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases se alinea con una secuencia de búsqueda de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las delecciones se producen en el extremo 5' de la secuencia sujeto y, por lo

tanto, el alineamiento de FASTDB no muestra una coincidencia/alineamiento de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no emparejadas representan 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no emparejados/número total de bases en la secuencia de búsqueda) de modo que se resta el 10% de la puntuación del porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes coincidieran perfectamente el porcentaje de identidad final sería de 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases se compara con una secuencia de búsqueda de 100 bases. En esta ocasión, las delecciones son delecciones internas de modo que no existen bases en el extremo 5' ó 3' de la secuencia sujeto que no coincidan/se alineen con la búsqueda. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solamente se corrigen manualmente con respecto a bases 5' y 3' de la secuencia sujeto que no coinciden/se alinean con la secuencia de búsqueda. No se realizan otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Mediante un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de búsqueda descrita anteriormente, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sujeto sea idéntica a la secuencia de búsqueda excepto en que la secuencia polipeptídica sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de búsqueda. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de búsqueda, hasta 5% de los restos aminoacídicos en la secuencia sujeto pueden insertarse, deleccionarse, (indels) o sustituirse con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En términos prácticos, si cualquier polipéptido particular es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o a la secuencia de aminoácidos codificada por el clon depositado puede determinarse de forma convencional usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar el mejor emparejamiento global entre una secuencia de búsqueda (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también denominado alineamiento de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci. 6: 237-245(1990)). En un alineamiento de secuencia las secuencias de búsqueda y sujeto son ambas secuencias de nucleótidos o ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento de secuencias global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en un alineamiento de aminoácidos de FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuple=2, Penalización de Emparejamiento Erróneo=1, Penalización de Unión=20, Longitud de Grupo de Selección Aleatoria=0, Puntuación de Corte=1, Tamaño de Ventana=longitud de secuencia, Penalización de Hueco=5, Penalización de Tamaño de Hueco 0,05, Tamaño de Ventana=500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos sujeto, la que sea más corta.

Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de búsqueda debido a delecciones N o C terminales, no debido a delecciones internas, debe realizarse una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta truncamientos N y C terminales de la secuencia sujeto cuando calcula el porcentaje de identidad global. Para secuencias sujeto truncadas en los extremos N y C terminal, en relación con la secuencia de búsqueda, el porcentaje de identidad se corrige mediante el cálculo del número de restos de la secuencia de búsqueda que están N y C terminal de la secuencia sujeto, que no coinciden/se alinean con un resto sujeto correspondiente, como un porcentaje del total de bases de la secuencia de búsqueda. Si un resto coincide/se alinea se determina por resultados del alineamiento de secuencia FASTDB. Este porcentaje se resta después del porcentaje de identidad, calculado por el anterior programa FASTDB usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación de porcentaje de identidad final es lo que se usa para los fines de la presente invención. Solamente los restos de los extremos N y C terminal de la secuencia sujeto, que no coinciden/se alinean con la secuencia de búsqueda, se consideran para los fines del ajuste manual de la puntuación del porcentaje de identidad. Es decir, solamente las posiciones de restos de búsqueda fuera de los restos N y C terminal más lejanos de la secuencia sujeto.

Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 restos aminoacídicos se alinea con una secuencia de búsqueda de 100 restos para determinar el porcentaje de identidad. La delección se produce en el extremo N terminal de la secuencia sujeto y, por lo tanto, el alineamiento de FASTDB no muestra una coincidencia/alineamiento de los primeros 10 restos en el extremo N terminal. Los 10 restos no emparejados representan el 10% de la secuencia (número de restos en los extremos N y C terminal no coincidentes/número total de restos en la secuencia de búsqueda) de modo que se resta el 10% de la puntuación del porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. Si los 90 restos restantes fueran perfectamente coincidentes el porcentaje de identidad final sería de 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 restos se compara con una secuencia de búsqueda de 100 restos. En esta ocasión, las delecciones son delecciones internas de modo que no existen restos en los extremos N y C terminal de la secuencia sujeto que no coincidan/se alineen con la búsqueda. En este caso el porcentaje de identidad calculado mediante FASTDB no se corrige manualmente. De nuevo, solamente las posiciones de restos fuera de los extremos N y C terminal de la secuencia sujeto, como se presentan en el alineamiento FASTDB, que no son coincidentes/se alinean con la secuencia de búsqueda se corrigen manualmente. No se realizan otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Las variantes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden contener alteraciones en las regiones

codificantes, regiones no codificantes o ambas. Se prefieren especialmente las variantes polinucleotídicas que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, pero que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Se prefieren variantes de nucleótidos producidas por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Además, se prefieren también variantes en las que se sustituyen, delecionan o añaden 5-10, 1-5 ó 1-2 aminoácidos en cualquier combinación. Pueden producirse variantes del polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) por una diversidad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (cambiar los codones en el ARNm humano a los preferidos por un hospedador bacteriano tal como *E. coli*).

Las variantes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de origen natural se denominan "variantes alélicas", y se refieren a una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar en el nivel polinucleotídico y/o polipeptídico. Como alternativa, pueden producirse variantes de origen no natural mediante técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

Usando métodos conocidos de ingeniería proteica y tecnología de ADN recombinante, pueden generarse variantes para mejorar o alterar las características de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden deleccionarse del extremo N terminal o C terminal de la proteína secretada sin pérdida sustancial de función biológica. Los autores de Ron *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993), indicaron proteínas variantes de KGF que tenían actividad de unión a heparina incluso después de deleccionar 3, 8 ó 27 restos aminoacídicos amino terminales. De forma similar, el interferón gamma mostró hasta 10 veces una actividad mayor después de deleccionar 8-10 restos aminoacídicos del extremo carboxi terminal de esta proteína (Dobeli *et al.*, J. Biotechnology 7: 199-216 (1988).)

Además, amplias pruebas demuestran que las variantes con frecuencia conservan una actividad biológica similar a la de la proteína de origen natural. Por ejemplo, Gayle y colaboradores (J. Biol. Chem 268: 22105-22111 (1993)) realizaron un análisis exhaustivo mutacional de la citocina humana IL-1a. Usaron mutagénesis aleatoria para generar más de 3.500 mutantes individuales de IL-1a que promediaban 2,5 cambios aminoacídicos por variante sobre la longitud total de la molécula. Se examinaron múltiples mutaciones en cada posición de aminoácido posible. Los investigadores descubrieron que "la mayor parte de la molécula podría alterarse con poco efecto en [unión o actividad biológica]." (Véase, Resumen.) De hecho, sólo 23 secuencias de aminoácidos únicas, de entre más de 3.500 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que difería significativamente en actividad del tipo silvestre.

Además, incluso si la delección de uno o más aminoácidos del extremo N terminal o C terminal de un polipéptido da como resultado la modificación o pérdida de una o más funciones biológicas, aún pueden conservarse otras actividades biológicas. Por ejemplo, la capacidad de una variante de delección de inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen la forma secretada probablemente se conservará cuando menos de la mayoría de los restos de la forma secretada se retiren del extremo N terminal o C terminal. Si un polipéptido particular que carece de los restos N terminal o C terminal de una proteína conserva tales actividades inmunogénicas puede determinarse por métodos rutinarios descritos en la presente memoria y conocidos de otro modo en la técnica.

De este modo, se describen adicionalmente variantes de polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que muestran actividad biológica sustancial. Tales variantes incluyen deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas de acuerdo con reglas generales conocidas en la técnica para tener poco efecto en la actividad.

La presente solicitud se refiere a moléculas de ácido nucleico al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria, (por ejemplo, que codifican un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una delección N y/o C terminal descrita posteriormente como m-n de SEC ID N°: 2) o que corresponden al polipéptido codificado por el clon depositado, independientemente de si codifican un polipéptido que tiene actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Esto se debe a que incluso cuando una molécula de ácido nucleico particular no codifica un polipéptido que tiene actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), un experto en la materia aún sabría cómo usar la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, como una sonda de hibridación o un cebador de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los usos de las moléculas de ácido nucleico que no codifican un polipéptido que tiene actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluyen, entre otros, (1) aislar un gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o variantes alélicas o de corte y empalme del mismo en una biblioteca de ADN; (2) hibridación *in situ* (por ejemplo, "FISH") con extensiones cromosómicas de metafase para proporcionar localización cromosómica precisa del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), como se describe en Verma *et al.*, Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York (1988); y (3) análisis de transferencia de Northern para detectar expresión de ARNm del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en tejidos específicos.

Se prefieren, sin embargo, moléculas de ácido nucleico que tengan secuencias al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria, que, de hecho, codifican un polipéptido que tiene actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Por "un polipéptido que

tiene actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)" se pretenden polipéptidos que muestran actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad funcional de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) completo (de longitud completa), Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) maduro y Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) soluble (por ejemplo, que tienen secuencias contenidas en las regiones o el dominio extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G), según se mide, por ejemplo, en un inmunoensayo o ensayo biológico particular. Por ejemplo, una actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede medirse de forma rutinaria determinando la capacidad de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para unirse a un ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). La actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también puede medirse determinando la capacidad de un polipéptido, tal como un ligando afín que está libre o se expresa en una superficie celular, para inducir a las células que expresan el polipéptido.

Por supuesto, debido a la degeneración del código genético, un experto en la materia reconocerá inmediatamente que un gran número de las moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico del clon depositado, la secuencia de ácido nucleico mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1), o fragmentos de la misma, codificarán polipéptidos "que tienen actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)". De hecho, puesto que las variantes degeneradas de cualquiera de estas secuencias nucleotídicas codifican todas el mismo polipéptido, en muchos casos, esto resultará evidente para el experto en la materia incluso sin realizar el ensayo de comparación anteriormente descrito. Se reconocerá adicionalmente en la técnica que, para tales moléculas de ácido nucleico que no son variantes degeneradas, un número razonable también codificará un polipéptido que tiene actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Esto se debe a que el experto en la materia es completamente consciente de sustituciones de aminoácidos que tienen menos probabilidad o ninguna probabilidad de efectuar función proteica de forma significativa (por ejemplo, reemplazando un aminoácido alifático con un segundo aminoácido alifático), como se describe adicionalmente posteriormente.

Por ejemplo, se proporcionan directrices con respecto a cómo preparar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas en Bowie *et al.*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," Science 247: 1306-1310 (1990), en el que los autores indican que existen dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio.

La primera estrategia explota la tolerancia de sustituciones de aminoácidos por selección natural durante el proceso de la evolución. Por comparación de secuencias de aminoácidos en diferentes especies, pueden identificarse aminoácidos conservados. Estos aminoácidos conservados son probablemente importantes para la función proteica. Por el contrario, las posiciones de aminoácidos en las que las sustituciones se han tolerado por selección natural indican que estas posiciones no son críticas para la función proteica. Por lo tanto, las posiciones que toleran sustitución de aminoácidos podrían modificarse manteniendo aún la actividad biológica de la proteína.

La segunda estrategia usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones críticas para la función proteica. Por ejemplo, pueden usarse la mutagénesis dirigida o mutagénesis de exploración de alanina (introducción de mutaciones sencillas de alanina en cada resto en la molécula). (Cunningham y Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)). Las moléculas mutantes resultantes pueden después ensayarse con respecto a actividad biológica.

Como indican los autores, estas dos estrategias han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a sustituciones de aminoácidos. Los autores indican adicionalmente qué cambios de aminoácidos son probablemente permisivos en ciertas posiciones de aminoácidos en la proteína. Por ejemplo, la mayoría de los restos aminoacídicos internados (dentro de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, mientras que pocas características de las cadenas laterales de superficie se conservan generalmente. Además, las sustituciones de aminoácidos conservativas toleradas implican el reemplazo de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; el reemplazo de los restos hidroxilos Ser y Thr; el reemplazo de los restos ácidos Asp y Glu; el reemplazo de los restos de amida Asn y Gln, el reemplazo de los restos básicos Lys, Arg y His; el reemplazo de los restos aromáticos Phe, Tyr y Trp y el reemplazo de los aminoácidos de tamaño pequeño Ala, Ser, Thr, Met y Gly.

Por ejemplo, pueden realizarse cambios dirigidos en el nivel de aminoácidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) reemplazando un aminoácido particular con un aminoácido conservativo. Las mutaciones conservativas preferidas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (SEC ID N°: 2) incluyen: M1 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; D2 reemplazado con E; Y3 reemplazado con F, o W; Q4 reemplazado con N; V5 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; S6 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; S7 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; I9 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; Y10 reemplazado con F, o W; D11 reemplazado con E; I12 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; N13 reemplazado con Q; Y14 reemplazado con F, o W; Y15 reemplazado con F, o W; T16 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; S17 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; E18 reemplazado con D; K22 reemplazado con H, o R; I23 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; N24 reemplazado con Q; V25 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; K26 reemplazado con H, o R; Q27 reemplazado con N; I28 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; A29 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; A30 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; R31 reemplazado con H, o K; L32 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L33 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L36 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; Y37

reemplazado con F, o W; S38 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; L39 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V40 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F41 reemplazado con W, o Y; I42 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F43 reemplazado con W, o Y; G44 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; F45 reemplazado con W, o Y; V46 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; G47 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; N48 reemplazado con Q; M49 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; L50 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V51 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; I52 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L53 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; I54 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L55 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; I56 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; N57 reemplazado con Q; Q59 reemplazado con N; R60 reemplazado con H, o K; L61 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; E62 reemplazado con D; S63 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; M64 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; T65 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; D66 reemplazado con E; I67 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; Y68 reemplazado con F, o W; L69 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L70 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; N71 reemplazado con Q; L72 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; A73 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; 174 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; S75 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; D76 reemplazado con E; L77 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; F78 reemplazado con W, o Y; F79 reemplazado con W, o Y; L80 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L81 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; T82 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; V83 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F85 reemplazado con W, o Y; W86 reemplazado con F, o Y; A87 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; H88 reemplazado con K, o R; Y89 reemplazado con F, o W; A90 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; A91 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; A92 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; Q93 reemplazado con N; W94 reemplazado con F, o Y; D95 reemplazado con E; F96 reemplazado con W, o Y; G97 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; N98 reemplazado con Q; T99 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; M100 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; Q102 reemplazado con N; L103 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L104 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; T105 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; G106 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; L107 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; Y108 reemplazado con F, o W; F109 reemplazado con W, o Y; I110 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; G111 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; F112 reemplazado con W, o Y; F113 reemplazado con W, o Y; S114 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; G115 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; I116 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F117 reemplazado con W, o Y; F118 reemplazado con W, o Y; I119 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; I120 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L121 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L122 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; T123 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; I124 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; D125 reemplazado con E; R126 reemplazado con H, o K; Y127 reemplazado con F, o W; L128 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; A129 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; I130 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; V131 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; H132 reemplazado con K, o R; A133 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; V134 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F135 reemplazado con W, o Y; A136 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; L137 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; K138 reemplazado con H, o R; A139 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; R140 reemplazado con H, o K; T141 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; V142 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; T143 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; F144 reemplazado con W, o Y; G145 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; V146 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; V147 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; T148 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; S149 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; V150 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; I151 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; T152 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; W153 reemplazado con F, o Y; V154 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; V155 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; A156 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; V157 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F158 reemplazado con W, o Y; A159 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; S160 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; L161 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; G163 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; I164 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; I165 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F166 reemplazado con W, o Y; T167 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; R168 reemplazado con H, o K; S169 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; Q170 reemplazado con N; K171 reemplazado con H, o R; E172 reemplazado con D; G173 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; L174 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; H175 reemplazado con K, o R; Y176 reemplazado con F, o W; T177 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; S179 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; S180 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; H181 reemplazado con K, o R; F182 reemplazado con W, o Y; Y184 reemplazado con F, o W; S185 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; Q186 reemplazado con N; Y187 reemplazado con F, o W; Q188 reemplazado con N; F189 reemplazado con W, o Y; W190 reemplazado con F, o Y; K191 reemplazado con H, o R; N192 reemplazado con Q; F193 reemplazado con W, o Y; Q194 reemplazado con N; T195 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; L196 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; K197 reemplazado con H, o R; I198 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; V199 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; 1200 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L201 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; G202 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; L203 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V204 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; L205 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L207 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L208 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V209 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; M210 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; V211 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; I212 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; Y214 reemplazado con F, o W; S215 reemplazado con A, G, I, L, S, T, M, o V; G216 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; I217 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L218 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; K219 reemplazado con H, o R; T220 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; L221 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L222 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; R223 reemplazado con H, o K; R225 reemplazado con H, o K; N226 reemplazado con Q; E227 reemplazado con D; K228 reemplazado con H, o R; K229 reemplazado con H, o R; R230 reemplazado con H, o K; H231 reemplazado con K, o R; R232 reemplazado con H, o K; A233 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; V234 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; R235 reemplazado con H, o K; L236 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; I237 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F238 reemplazado con W, o Y; T239 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; I240 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; M241 reemplazado con A,

- G, I, L, S, T, o V; I242 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; V243 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; Y244 reemplazado con F, o W; F245 reemplazado con W, o Y; L246 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; F247 reemplazado con W, o Y; W248 reemplazado con F, o Y; A249 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; Y251 reemplazado con F, o W; N252 reemplazado con Q; I253 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; V254 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; L255 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L256 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L257 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; N258 reemplazado con Q; T259 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; F260 reemplazado con W, o Y; Q261 reemplazado con N; E262 reemplazado con D; F263 reemplazado con W, o Y; F264 reemplazado con W, o Y; G265 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; L266 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; N267 reemplazado con Q; N268 reemplazado con Q; S270 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; S271 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; S272 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; N273 reemplazado con Q; R274 reemplazado con H, o K; L275 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; D276 reemplazado con E; Q277 reemplazado con N; A278 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; M279 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; Q280 reemplazado con N; V281 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; T282 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; E283 reemplazado con D; T284 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; L285 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; G286 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; M287 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; T288 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; H289 reemplazado con K, o R; I292 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; N293 reemplazado con Q; I295 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; I296 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; Y297 reemplazado con F, o W; A298 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; F299 reemplazado con W, o Y; V300 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; G301 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; E302 reemplazado con D; K303 reemplazado con H, o R; F304 reemplazado con W, o Y; R305 reemplazado con H, o K; N306 reemplazado con Q; Y307 reemplazado con F, o W; L308 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L309 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V310 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F311 reemplazado con W, o Y; F312 reemplazado con W, o Y; Q313 reemplazado con N; K314 reemplazado con H, o R; H315 reemplazado con K, o R; I316 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; A317 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; K318 reemplazado con H, o R; R319 reemplazado con H, o K; F320 reemplazado con W, o Y; K322 reemplazado con H, o R; S325 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; I326 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F327 reemplazado con W, o Y; Q328 reemplazado con N; Q329 reemplazado con N; E330 reemplazado con D; A331 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; E333 reemplazado con D; R334 reemplazado con H, o K; A335 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; S336 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; S337 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; V338 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; Y339 reemplazado con F, o W; T340 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; R341 reemplazado con H, o K; S342 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; T343 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; G344 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; E345 reemplazado con D; Q346 reemplazado con N; E347 reemplazado con D; I348 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; S349 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; V350 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; G351 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; y/o L352 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V.
- Las mutaciones conservativas preferidas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) según se codifica por el clon depositado HDGMR10 (SEC ID Nº: 22) incluyen : M1 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; D2 reemplazado con E; Y3 reemplazado con F, o W; Q4 reemplazado con N; V5 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; S6 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; S7 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; I9 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; Y10 reemplazado con F, o W; D11 reemplazado con E; I12 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; N13 reemplazado con Q; Y14 reemplazado con F, o W; Y15 reemplazado con F, o W; T16 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; S17 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; E18 reemplazado con D; Q21 reemplazado con N; K22 reemplazado con H, o R; I23 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; N24 reemplazado con Q; V25 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; K26 reemplazado con H, o R; Q27 reemplazado con N; I28 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; A29 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; A30 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; R31 reemplazado con H, o K; L32 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L33 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L36 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; Y37 reemplazado con F, o W; S38 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; L39 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V40 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F41 reemplazado con W, o Y; I42 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F43 reemplazado con W, o Y; G44 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; F45 reemplazado con W, o Y; V46 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; G47 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; N48 reemplazado con Q; M49 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; L50 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V51 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; I52 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L53 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; I54 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L55 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; I56 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; N57 reemplazado con Q; K59 reemplazado con H, o R; R60 reemplazado con H, o K; L61 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; K62 reemplazado con H, o R; S63 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; M64 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; T65 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; D66 reemplazado con E; I67 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; Y68 reemplazado con F, o W; L69 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L70 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; N71 reemplazado con Q; L72 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; A73 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; I74 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; S75 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; D76 reemplazado con E; L77 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; F78 reemplazado con W, o Y; F79 reemplazado con W, o Y; L80 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L81 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; T82 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; V83 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F85 reemplazado con W, o Y; W86 reemplazado con F, o Y; A87 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; H88 reemplazado con K, o R; Y89 reemplazado con F, o W; A90 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; A91 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; A92 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; Q93 reemplazado con N; W94 reemplazado con F, o Y; D95 reemplazado con E; F96 reemplazado con W, o Y; G97 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; N98 reemplazado con Q; T99 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; M100



reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; Q102 reemplazado con N; L103 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L104 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; T105 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; G106 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; L107 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; Y108 reemplazado con F, o W; F109 reemplazado con W, o Y; I110 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; G111 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; F112 reemplazado con W, o Y; F113 reemplazado con W, o Y; S114 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; G115 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; I116 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F117 reemplazado con W, o Y; F118 reemplazado con W, o Y; I119 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; I120 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L121 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L122 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; T123 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; I124 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; D125 reemplazado con E; R126 reemplazado con H, o K; Y127 reemplazado con F, o W; L128 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; A129 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; V130 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; V131 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; H132 reemplazado con K, o R; A133 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; V134 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F135 reemplazado con W, o Y; A136 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; L137 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; K138 reemplazado con H, o R; A139 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; R140 reemplazado con H, o K; T141 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; V142 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; T143 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; F144 reemplazado con W, o Y; G145 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; V146 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; V147 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; T148 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; S149 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; V150 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; I151 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; T152 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; W153 reemplazado con F, o Y; V154 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; V155 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; A156 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; V157 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F158 reemplazado con W, o Y; A159 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; S160 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; L161 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; G163 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; I164 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; I165 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F166 reemplazado con W, o Y; T167 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; R168 reemplazado con H, o K; S169 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; Q170 reemplazado con N; K171 reemplazado con H, o R; E172 reemplazado con D; G173 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; L174 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; H175 reemplazado con K, o R; Y176 reemplazado con F, o W; T177 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; S179 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; S180 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; H181 reemplazado con K, o R; F182 reemplazado con W, o Y; Y184 reemplazado con F, o W; S185 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; Q186 reemplazado con N; Y187 reemplazado con F, o W; Q188 reemplazado con N; F189 reemplazado con W, o Y; W190 reemplazado con F, o Y; K191 reemplazado con H, o R; N192 reemplazado con Q; F193 reemplazado con W, o Y; Q194 reemplazado con N; T195 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; L196 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; K197 reemplazado con H, o R; I198 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; V199 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; L200 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L201 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; G202 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; L203 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V204 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; L205 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L207 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L208 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V209 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; M210 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; V211 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; I212 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; Y214 reemplazado con F, o W; S215 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o r V; G 2 16 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; I217 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; L218 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; K219 reemplazado con H, o R; T220 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; L221 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L222 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; R223 reemplazado con H, o K; R225 reemplazado con H, o K; N226 reemplazado con Q; E227 reemplazado con D; K228 reemplazado con H, o R; K229 reemplazado con H, o R; R230 reemplazado con H, o K; H231 reemplazado con K, o R; R232 reemplazado con H, o K; A233 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; V234 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; R235 reemplazado con H, o K; L236 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; I237 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F238 reemplazado con W, o Y; T239 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; I240 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; M241 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; I242 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; V243 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; Y244 reemplazado con F, o W; F245 reemplazado con W, o Y; L246 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; F247 reemplazado con W, o Y; W248 reemplazado con F, o Y; A249 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; Y251 reemplazado con F, o W; N252 reemplazado con Q; I253 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; V254 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; L255 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L256 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L257 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; N258 reemplazado con Q; T259 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; F260 reemplazado con W, o Y; Q261 reemplazado con N; E262 reemplazado con D; F263 reemplazado con W, o Y; F264 reemplazado con W, o Y; G265 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; L266 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; N267 reemplazado con Q; N268 reemplazado con Q; S270 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; S271 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; S272 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; N273 reemplazado con Q; R274 reemplazado con H, o K; L275 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; D276 reemplazado con E; Q277 reemplazado con N; A278 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; M279 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; Q280 reemplazado con N; V281 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; T282 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; E283 reemplazado con D; T284 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; L285 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; G286 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; M287 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o V; T288 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; H289 reemplazado con K, o R; I292 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; N293 reemplazado con Q; I295 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; I296 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; Y297 reemplazado con F, o W; A298 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; F299 reemplazado con W, o Y; V300 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; G301 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; E302 reemplazado con D; K303 reemplazado con H, o R; F304 reemplazado con W, o Y; R305 reemplazado con H, o K; N306 reemplazado con Q; Y307 reemplazado con F, o W;

L308 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; L309 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V; V310 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; F311 reemplazado con W, o Y; F312 reemplazado con W, o Y; Q313 reemplazado con N; K314 reemplazado con H, o R; H315 reemplazado con K, o R; I316 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; A317 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; K318 reemplazado con H, o R; R319 reemplazado con H, o K; F320 reemplazado con W, o Y; K322 reemplazado con H, o R; S325 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; I326 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; F327 reemplazado con W, o Y; Q328 reemplazado con N; Q329 reemplazado con N; E330 reemplazado con D; A331 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; E333 reemplazado con D; R334 reemplazado con H, o K; A335 reemplazado con G, I, L, S, T, M, o V; S336 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; S337 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; V338 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; Y339 reemplazado con F, o W; T340 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; R341 reemplazado con H, o K; S342 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; T343 reemplazado con A, G, I, L, S, M, o V; E344 reemplazado con D; E345 reemplazado con D; Q346 reemplazado con N; E347 reemplazado con D; I348 reemplazado con A, G, L, S, T, M, o V; S349 reemplazado con A, G, I, L, T, M, o V; V350 reemplazado con A, G, I, L, S, T, o M; G351 reemplazado con A, I, L, S, T, M, o V; y/o L352 reemplazado con A, G, I, S, T, M, o V.

Las construcciones resultantes pueden explorarse rutinariamente con respecto a actividades o funciones descritas a lo largo de la memoria descriptiva y se conocen en la técnica. Preferiblemente, las construcciones resultantes tienen una actividad o función del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) aumentada y/o disminuida, mientras que las restantes actividades o funciones del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se mantienen. Más preferiblemente, las construcciones resultantes tienen más de una actividad o función del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) aumentada y/o disminuida, mientras que el resto de las actividades o funciones del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) restantes se mantienen.

Además de la sustitución de aminoácidos conservativa las variantes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluyen (i) sustituciones con uno o más de los restos aminoacídicos no conservados, en las que los restos aminoacídicos sustituidos pueden o no ser uno codificado por el código genético o (ii) sustitución con uno o más restos aminoacídicos que tienen un grupo sustituyente o (iii) fusión del polipéptido maduro con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la estabilidad y/o solubilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol) o (iv) fusión del polipéptido con aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo, un péptido de región de fusión Fc de IgG o secuencia secretora o líder o una secuencia que facilita la purificación. Tales polipéptidos variantes se consideran dentro del ámbito para los expertos en la materia a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Por ejemplo, las variantes del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que contienen sustituciones aminoacídicas de aminoácidos cargados con otros aminoácidos cargados o neutros pueden producir proteínas con características mejoradas, tales como menos agregación. La agregación de formulaciones farmacéuticas reduce la actividad y aumenta el aclaramiento debido a la actividad inmunogénica del agregado. (Pinckard *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 2: 331-340 (1967); Robbins *et al.*, Diabetes 36: 838-845 (1987); Cleland *et al.*, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 307-377 (1993)).

Por ejemplo, las sustituciones no conservativas preferidas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (SEC ID N°: 2) incluyen: M1 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; D2 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y3 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; Q4 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; V5 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S6 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S7 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P8 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; I9 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y10 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; D11 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I12 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; N13 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; Y14 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; Y15 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; T16 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S17 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E18 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; P19 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; C20 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o P; P21 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; K22 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I23 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; N24 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; V25 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; K26 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; Q27 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; I28 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A29 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A30 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; R31 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; L32 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L33 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P34 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; P35 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; L36 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y37 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; S38 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L39 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V40 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F41 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; I42 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F43 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; G44 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F45 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; V46 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G47 reemplazado con D, E, H, K,

[illegible]

[illegible]

- Q, F, W, Y, P, o C; M279 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Q280 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; V281 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T282 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E283 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; T284 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L285 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G286 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; M287 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T288 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; H289 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; C290 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o P; C291 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o P; I292 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; N293 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; P294 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I295 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; I296 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y297 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; A298 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F299 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; V300 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G301 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E302 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; K303 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; F304 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; R305 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; N306 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; Y307 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; L308 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L309 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V310 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F311 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; F312 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; Q313 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; K314 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; H315 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I316 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A317 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; K318 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; R319 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; F320 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; C321 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o P; K322 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; C323 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o P; C324 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o P; S325 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; I326 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F327 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; Q328 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; Q329 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; E330 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; A331 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P332 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; E333 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; R334 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; A335 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S336 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S337 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V338 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y339 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; T340 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; R341 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; S342 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T343 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G344 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E345 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; Q346 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; E347 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I348 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S349 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V350 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G351 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; y/o L352 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C.
- Además, las sustituciones no conservativas preferidas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como se codifican por el clon depositado HDGNR10 (SEC ID N°: 22) incluyen: M1 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; D2 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y3 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; Q4 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; V5 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S6 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S7 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P8 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I9 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y10 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; D11 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I12 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; N13 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; Y14 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; Y15 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; T16 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S17 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E18 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; P19 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; C20 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o P; Q21 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; K22 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I23 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; N24 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; V25 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; K26 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; Q27 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; I28 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A29 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A30 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; R31 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I32 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L33 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P34 reemplazado con D, E, H, Y, R, A, G, I,

[illegible]

[illegible]



C; N267 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; N268 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; C269 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o P; S270 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S271 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S272 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; N273 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, P, W, Y, P, o C; R274 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; L275 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, P, W, Y, P, o C; D276 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; Q277 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; A278 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; M279 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Q280 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; V281 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T282 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E283 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; T284 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L285 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G286 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; M287 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T288 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; H289 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; C290 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o P; I292 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; N293 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; P294 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; I295 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; 1296 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y297 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; A298 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F299 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; V300 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G301 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E302 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; K303 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; F304 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; R305 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; N306 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, P, W, Y, P, o C; Y307 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; L308 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L309 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V310 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F311 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; F312 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; Q313 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; K314 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; H315 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, P, W, Y, P, o C; L316 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A317 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; K318 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; R319 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, P, W, Y, P, o C; F320 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; C321 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o P; K322 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; C323 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o P; C324 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o P; S325 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; I326 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F327 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; Q328 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; Q329 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; E330 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; A331 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P332 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; E333 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; R334 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; A335 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S336 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S337 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V338 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y339 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; T340 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; R341 reemplazado con D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; S342 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T343 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E344 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; E345 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; Q346 reemplazado con D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; E347 reemplazado con H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; 1348 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S349 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V350 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G351 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; y/o L352 reemplazado con D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C.

Las construcciones resultantes pueden explorarse de forma rutinaria con respecto a actividades o funciones descritas a lo largo de la memoria descriptiva y conocidas en la técnica. Preferiblemente, las construcciones resultantes tienen una actividad o función del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) aumentada y/o disminuida, mientras que las actividades o funciones restantes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se mantienen. Más preferiblemente, las construcciones resultantes tienen más de una actividad o función del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) aumentada y/o disminuida, mientras que las actividades o funciones restantes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se mantienen.

Adicionalmente, más de un amino ácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) puede reemplazarse con los aminoácidos sustituidos como se ha descrito anteriormente (de forma conservativa o no conservativa). Los aminoácidos sustituidos pueden aparecer en la forma de longitud completa, madura o de proproteína de la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), así como los mutantes de delección N terminal y C terminal, que tienen la fórmula general m-n, enumerados posteriormente.



Se describe adicionalmente un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una sustitución de aminoácido, pero no más de 50 sustituciones de aminoácidos, incluso más preferiblemente no más de 40 sustituciones de aminoácidos, aún más preferiblemente, no más de 30 sustituciones de aminoácidos e incluso aún más preferiblemente, no más de 20 sustituciones de aminoácidos. Por supuesto, en orden de preferencia creciente, es altamente preferible para un polipéptido tener una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), que contiene al menos uno, pero no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos. El número de adiciones, sustituciones y/o deleciones en la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 o la codificada por el clon depositado o fragmentos de la misma (por ejemplo, la forma madura y/o otros fragmentos descritos en la presente memoria) es 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 ó 50-150; son preferibles sustituciones de aminoácidos conservativas.

### ***Fragmentos Polinucleotídicos y Polipeptídicos***

La presente descripción también se refiere a fragmentos polinucleotídicos de los polinucleótidos de CCR5. Un "fragmento polinucleotídico" se refiere a un polinucleótido corto que tiene una secuencia de ácido nucleico que: es una parte de la contenida en un clon depositado o que codifica el polipéptido codificado por el clon depositado; es una parte de la mostrada en SEC ID N°: 1 o la hebra complementaria a la misma o es una parte de una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de SEC ID N°:2. Los fragmentos de nucleótidos preferiblemente son de al menos aproximadamente 15 nt, y más preferiblemente al menos aproximadamente 20 nt, aun más preferiblemente al menos aproximadamente 30 nt, y aún más preferiblemente, al menos aproximadamente 40 nt, al menos aproximadamente 50 nt, al menos aproximadamente 75 nt, o al menos aproximadamente 150 nt de longitud. Un fragmento "de al menos 20 nt de longitud", por ejemplo; se pretende que incluya 20 o más bases contiguas de la secuencia de ADN de HDGMR10 contenida en un clon depositado o la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°:1. En este contexto "aproximadamente" incluye el valor nombrado particularmente, un valor mayor o menor en varios nucleótidos (5, 4, 3, 2 ó 1) en cualquiera de los extremos o en ambos extremos. Estos fragmentos de nucleótidos tienen usos que incluyen, sin limitación, como sondas y cebadores de diagnóstico como se analiza en la presente memoria. Por supuesto, se prefieren fragmentos mayores (por ejemplo, 50, 150, 500, 600, 1000 nucleótidos).

Además, los ejemplos representativos de fragmentos polinucleotídicos incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden, o como alternativa que consisten en, una secuencia de aproximadamente el número de nucleótido 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 651-700, 701-750, 751-800, 800-850, 851-900, 901-950, 951-1000, 1001-1050, 1051-1100, 1101-1150, 1151-1200, 1201-1250, 1251-1300, 1301-1350, 1351-1400 ó 1401 hasta el extremo de SEC ID N°:1 o la hebra complementaria de la misma o el ADN de HDGMR10 contenido en el clon depositado. En este contexto "aproximadamente" incluye los intervalos nombrados particularmente e intervalos mayores o menores en varios nucleótidos (5, 4, 3, 2 ó 1), en cualquiera de los extremos o en ambos extremos. Preferiblemente, estos fragmentos codifican un polipéptido que tiene actividad biológica. Más preferiblemente, estos polinucleótidos pueden usarse como sondas o cebadores como se analiza en la presente memoria. También se describen polinucleótidos que hibridan con estas moléculas de ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones menos rigurosas, al igual que polipéptidos codificados por estos polinucleótidos. Un "fragmento polipeptídico" se refiere a una secuencia de aminoácidos que es una parte de la contenida en SEC ID N°: 2 o codificada por el ADN de HDGMR10 contenida en el clon depositado. Los fragmentos proteicos (polipeptídicos) pueden ser "independientes" o estar comprendidos dentro de un polipéptido mayor del que el fragmento forma una parte o región, más preferiblemente como una región continua única. Los ejemplos representativos de fragmentos polipeptídicos son, por ejemplo, fragmentos que comprenden, o como alternativa que consisten en, de aproximadamente el número de aminoácido 1-20, 21-40, 41-60, 61-80, 81-100, 102-120, 121-140, 41-160 ó 161 hasta el extremo de la región codificante. Además, los fragmentos polipeptídicos pueden ser de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ó 150 aminoácidos de longitud. En este contexto "aproximadamente" incluye los intervalos o valores nombrados particularmente e intervalos o valores mayores o menores en varios aminoácidos (5, 4, 3, 2 ó 1), en cualquiera de los extremos o en ambos extremos. También se describen polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Incluso si la delección de uno o más aminoácidos del extremo N terminal de una proteína da como resultado una modificación de pérdida de una o más funciones biológicas de la proteína, otras actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas, capacidad de multimerizar, capacidad de unirse a ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)) aún pueden conservarse. Por ejemplo, la capacidad de las muteínas acortadas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen las formas completas o maduras de los polipéptidos generalmente se conservarán cuando menos de la mayoría de los restos del polipéptido completo o maduro se retiren del extremo N terminal. Si un polipéptido particular que carece de los restos N terminales de un polipéptido completo conserva tales actividades inmunológicas puede determinarse fácilmente por métodos rutinarios descritos en la presente memoria y conocidos de otra forma en la técnica. Es posible que una muteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con un gran número de restos aminoácidos N terminales delecionados pueda conservar algunas actividades biológicas o inmunogénicas. De hecho, los péptidos compuestos de tan pocos como seis restos aminoácidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puedan con frecuencia inducir una respuesta inmune.

Los fragmentos polipeptídicos preferidos incluyen la proteína secretada así como la forma madura. Fragmentos polipeptídicos preferidos adicionales incluyen la proteína secretada o la forma madura que tiene una serie continua de restos delecionados del extremo carboxi o amino terminal o ambos. Por ejemplo, cualquier número de aminoácidos.

- 5 En consecuencia, los fragmentos polipeptídicos incluyen la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) secretada así como la forma madura. Fragmentos polipeptídicos preferidos adicionales incluyen la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) secretada o la forma madura que tiene una serie continua de restos delecionados del extremo amino o carboxi terminal o ambos. Por ejemplo, cualquier número de aminoácidos, que varían de 1 a 60, pueden deleccionarse del extremo amino terminal del polipéptido o la forma madura del
- 10 Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) secretado. De forma similar, cualquier número de aminoácidos, variando de 1 a 30, puede deleccionarse del extremo carboxiterminal de la proteína o forma madura del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) secretado. Además, se prefiere cualquier combinación de las anteriores delecciones del extremo amino y carboxi terminal. De forma similar, también se prefieren polinucleótidos que codifican estos fragmentos polipeptídicos.

- 15 Estos fragmentos polipeptídicos pueden conservar la actividad biológica de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o pueden ser útiles para generar o explorar con respecto a anticuerpos, como se describe adicionalmente posteriormente. También se describen polinucleótidos que codifican estos fragmentos polipeptídicos.

- 20 La presente solicitud también se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden, o como alternativa que consisten en, una secuencia polinucleotídica al menos 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) descrito anteriormente. También se describen las secuencias polinucleotídicas anteriores fusionadas con una secuencia polinucleotídica heteróloga.

- 25 Adicionalmente, la presente solicitud también se refiere a proteínas que contienen polipéptidos al menos 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a los fragmentos polipeptídicos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) expuestos anteriormente. También se describen polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

- Preferiblemente, los fragmentos polinucleotídicos codifican un polipéptido que demuestra una actividad funcional del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Por un polipéptido que demuestra "actividad funcional" del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se entiende un polipéptido capaz de presentar una o más actividades
- 30 funcionales conocidas asociadas con una proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de longitud completa (completa). Tales actividades funcionales incluyen, pero sin limitación, actividad biológica, antigenicidad [capacidad para unirse (o competir con un polipéptido de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con respecto a unión) con un anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)], inmunogenicidad (capacidad de generar anticuerpo que se une a un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)),
- 35 capacidad para formar multímeros con polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y capacidad para unirse a un receptor o ligando para un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

La actividad funcional de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y fragmentos, variantes derivadas y análogos de los mismos pueden ensayarse por diversos métodos.

- 40 Por ejemplo, en una realización en la que se ensaya con respecto a la capacidad de unirse o competir con polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de longitud completa por la unión con anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden usarse diversos inmunoensayos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo que usan técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión,
- 45 inmunoensayos *in situ* (usando marcadores coloidales, de oro, enzimáticos o de radioisótopos, por ejemplo), transferencias de Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinización), ensayos de fijación de complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. La unión a anticuerpo se detecta mediante la detección de un marcador en el anticuerpo primario. El anticuerpo primario se detecta mediante
- 50 la detección de unión de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se marca. Se conocen muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo.

- Cuando se identifica un ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o se evalúa la capacidad de un fragmento, variante o derivado polipeptídico para multimerizar, puede ensayarse la unión, por ejemplo, por medios bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía de gel reductor y no reductor, cromatografía de afinidad de proteínas y transferencia de afinidad. Véase generalmente, Phizicky, E., *et al.*, 1995, *Microbiol. Rev.* 59: 94-123. En otra realización, pueden ensayarse equivalentes fisiológicos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que se unen a sus sustratos (transducción de señal).
- 55

Además, los ensayos descritos en la presente memoria (véase Ejemplos) y conocidos de otro modo en la técnica

pueden aplicarse rutinariamente para medir la capacidad de los polipéptidos y fragmentos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), variantes derivadas y análogos de los mismos para inducir actividad biológica relacionada con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (*in vitro* o *in vivo*). Otros métodos resultarán conocidos para el experto en la materia.

Entre los fragmentos especialmente preferidos están fragmentos caracterizados por atributos estructurales o funcionales del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Tales fragmentos incluyen restos aminoacídicos que comprenden hélices alfa y regiones formadoras de hélice alfa ("regiones alfa"), láminas beta y regiones formadoras de láminas beta ("regiones beta"), vueltas y regiones formadoras de vueltas ("regiones de vuelta"), enrollamientos y regiones formadoras de enrollamientos ("regiones de enrollamiento"), regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones alfa anfipáticas, regiones beta anfipáticas, regiones formadoras de superficie y regiones de alto índice antigénico (es decir, que contienen cuatro o más aminoácidos contiguos que tienen un índice antigénico de más de o igual a 1,5, según se identifica usando los parámetros por defecto del programa de Jameson-Wolf) del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) completo (es decir de longitud completa) (SEC ID N°: 2) o codificadas por el clon depositado. Ciertas regiones preferidas son las expuestas en la FIGURA 3 e incluyen, sin limitación, regiones de los tipos anteriormente mencionados identificados por análisis de la secuencia de aminoácidos representada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2) o codificada por el clon depositado, tales regiones preferidas incluyen; regiones alfa, regiones beta, regiones de vuelta y regiones de enrollamiento predichas de Garnier-Robson; regiones alfa, regiones beta, regiones de vuelta y regiones de enrollamiento predichas de Chou-Fasman; regiones hidrófilas e hidrófobas predichas de Kyte-Doolittle; regiones alfa y beta anfipáticas de Eisenberg; regiones formadoras de superficie de Emini; y regiones de alto índice antigénico de Jameson-Wolf, como se predice usando los parámetros por defecto de estos programas informáticos. También se describen polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Los polinucleótidos codifican atributos funcionales del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). También se describen fragmentos que comprenden hélices alfa y regiones formadoras de hélices alfa ("regiones alfa"), láminas beta y regiones formadoras de láminas beta ("regiones beta"), vueltas y regiones formadoras de vueltas ("regiones de vuelta"), enrollamientos y regiones formadoras de enrollamientos ("regiones de enrollamiento"), regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones alfa anfipáticas, regiones beta anfipáticas, regiones flexibles, regiones formadoras de superficie y regiones de alto índice antigénico del Receptor de Quimiocina de proteína G.

Los datos que presentan los atributos funcionales o estructurales del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) expuesto en la FIGURA 1 o codificado por el clon depositado y/o la Tabla 1, como se ha descrito anteriormente, se generaron usando los diversos módulos y algoritmos del DNA\*STAR ajustado a parámetros por defecto. Los datos presentados en las columnas VIII, IX, XIII y XIV de la Tabla 1 pueden usarse para determinar regiones del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que muestran un alto grado de potencial para antigenicidad. Las regiones de alta antigenicidad se determinan a partir de los datos presentados en las columnas VIII, IX, XIII y/o IV seleccionando valores que representan regiones del polipéptido que probablemente se expongan en la superficie del polipéptido en un ambiente en el que el reconocimiento de antígenos puede producirse en el proceso de inicio de una respuesta inmune.

Ciertas regiones preferidas a este respecto se exponen en la FIGURA 3, pero pueden, como se muestra en la Tabla 1, representarse o identificarse mediante el uso de representaciones tabulares de los datos presentados en la FIGURA 3. El algoritmo informático DNA\*STAR usado para generar la FIGURA 3 (ajustado a los parámetros por defecto originales) se usó para presentar los datos en la FIGURA 3 en un formato tabular (Véase Tabla 1). El formato tabular de los datos de la FIGURA 3 puede usarse para determinar fácilmente los límites específicos de una región preferida.

Las regiones preferidas anteriormente mencionadas expuestas en la FIGURA 3 y en la Tabla 1 incluyen, pero sin limitación, regiones de los tipos anteriormente mencionados identificadas por análisis de la secuencia de aminoácidos expuesta en la FIGURA 1 o codificadas por el clon depositado. Como se expone en la FIGURA 3 y en la Tabla 1, tales regiones preferidas incluyen regiones alfa, regiones beta, regiones de vuelta y regiones de enrollamiento de Garnier-Robson; regiones alfa, regiones beta y regiones de enrollamiento de Chou-Fasman; regiones hidrófilas y regiones hidrófobas de Kyte-Doolittle, regiones alfa y beta anfipáticas de Eisenberg, regiones flexibles de Karplus-Schulz, regiones formadoras de superficie de Emini y regiones de Jameson-Wolf de alto índice antigénico.

**Tabla 1**

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Met	1	.	.	B	.	.	.	.	0,24	0,06	.	*	.	0,05	1,68
Asp	2	.	.	B	B	.	.	.	0,33	0,27	.	*	.	-	0,98
														0,30	
Tyr	3	.	.	B	B	.	.	.	0,42	0,23	.	*	.	-	1,02
														0,15	
Gln	4	.	.	B	B	.	.	.	0,60	0,19	.	*	.	-	1,38
														0,15	
Val	5	.	.	B	B	.	.	.	0,10	0,00	.	*	F	0,00	1,28
Ser	6	.	.	B	B	.	.	.	0,46	0,69	*	*	F	-	0,57
														0,45	
Ser	7	.	.	B	B	.	.	.	0,46	0,69	*	*	F	-	0,52
														0,45	
Pro	8	.	.	B	B	.	.	.	-0,19	0,29	*	*	F	0,00	1,17
Ile	9	.	.	B	B	.	.	.	-0,19	0,33	*	*	.	-	0,61
														0,30	
Tyr	10	.	.	B	.	.	.	.	0,42	0,34	*	.	.	-	0,73
														0,30	
Asp	11	.	.	B	.	.	T	.	0,48	0,71	.	.	.	-	0,74
														0,20	
Ile	12	.	.	B	.	.	T	.	0,47	1,04	.	.	.	-	1,66
														0,05	
Asn	13	.	.	B	.	.	T	.	0,38	0,84	*	.	.	-	1,53
											*			0,05	
Tyr	14	.	.	B	.	.	T	.	1,27	0,47	.	.	.	-	1,23
														0,05	
Tyr	15	.	.	.	B	T	.	.	1,30	0,47	.	*	.	-	3,03

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,05	
Thr	16	,	.	.	B	T	.	.	0,63	0,21	.	*	F	0,65	2,91
Ser	17	.	.	.	B	T	.	.	1,31	0,39	.	*	F	0,75	1,00
Glu	18	.	.	B	.	T	.	.	1,36	0,06	.	*	F	0,80	0,98
Pro	19	.	.	.	.	T	.	.	0,71	-	.	*	F	2,50	1,36
					.	T				0,70					
Cys	20	.	.	.	.	T	T	.	0,96	-	.	*	F	2,50	0,71
					.					0,50					
Pro	21	.	.	.	.	T	T	.	0,41	-	.	*	F	2,25	0,66
					.					0,49					
Lys	22	.	.	.	.	T	T	.	0,76	0,16	.	*	F	1,40	0,32
Ile	23	A	.	.	.	.	T	.	0,76	-	*	*	F	1,50	1,19
										0,27					
Asn	24	A	A	.	.	.	.	.	0,08	-	.	*	F	0,85	1,33
										0,44					
Val	25	A	A	.	.	.	.	.	0,16	-	.	*	.	0,30	0,47
										0,19					
Lys	26	.	A	B	.	.	.	.	-0,22	0,31	.	*	.	-	0,67
														0,30	
Gln	27	.	A	B	.	.	.	.	-0,16	0,13	*	*	.	-	0,42
														0,30	
Ile	28	.	A	B	.	.	.	.	-0,08	-	*	*	.	0,45	1,11
										0,27					
Ala	29	.	A	B	.	.	.	.	0,89	-	*	*	.	0,30	0,46
										0,23					
Ala	30	.	A	B	.	.	.	.	-0,24	0,46	*	*	.	-	0,22
														0,60	
Arg	31	.	A	B	.	.	.	.	-0,50	0,49	*	*	.	-	0,48
														0,60	

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Leu	32	.	A	B	.	.	.	.	-1,31	0,23	*	*	.	-	0,74
														0,30	
Leu	33	.	A	B	.	.	.	.	-0,67	0,41	*	*	.	-	0,60
														0,60	
Pro	34	.	.	.	.	.	T	C	-0,38	0,67	*	*	F	0,15	0,48
Pro	35	.	.	.	.	T	T	.	-0,60	1,06	.	.	F	0,35	0,78
Leu	36	.	.	B	.	.	T	.	-1,57	1,06	*	*	.	-	0,78
														0,20	
Tyr	37	.	.	B	.	.	T	.	-1,46	1,01	.	.	.	-	0,38
														0,20	
Ser	38	.	.	B	B	.	.	.	-1,53	1,37	.	.	.	-	0,21
														0,60	
Leu	39	.	.	B	B	.	.	.	-2,02	1,63	.	.	.	-	0,18
														0,60	
Val	40	.	.	B	B	.	.	.	-2,16	1,73	.	.	.	-	0,10
														0,60	
Phe	41	.	.	B	B	.	.	.	-2,04	1,40	.	.	.	-	0,07
														0,60	
Ile	42	.	.	B	B	.	.	.	-2,66	1,80	.	.	.	-	0,08
														0,60	
Phe	43	.	.	B	B	.	.	.	-2,70	1,76	.	.	.	-	0,08
														0,60	
Gly	44	.	.	B	B	.	.	.	-1,89	1,54	.	.	.	-	0,09
														0,60	
Phe	45	.	.	.	B	T	.	.	-1,63	1,16	.	.	.	-	0,20
														0,20	
Val	46	.	.	.	B	.	.	C	-1,74	1,09	.	.	.	-	0,23

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,40	
Gly	47	.	.	.	B	.	.	C	-1,71	0,99	.	.	.	-	0,19
														0,40	
Asn	48	A	.	.	B	.	.	.	-1,90	1,20	.	.	.	-	0,16
														0,60	
Met	49	A	.	.	B	.	.	.	-2,37	1,10	.	.	.	-	0,15
														0,60	
Leu	50	A	.	.	B	.	.	.	-2,56	1,14	.	.	.	-	0,13
														0,60	
Val	51	.	.	B	B	.	.	.	-2,51	1,40	.	.	.	-	0,06
														0,60	
Ile	52	.	.	B	B	.	.	.	-3,06	1,69	.	.	.	-	0,05
														0,60	
Leu	53	.	.	B	B	.	.	.	-3,06	1,76	.	.	.	-	0,04
														0,60	
Ile	54	.	.	B	B	.	.	.	-3,12	1,47	.	*	.	-	0,09
														0,60	
Leu	55	.	.	B	B	.	.	.	-2,31	1,40	*	.	.	-	0,07
														0,60	
Ile	56	.	.	B	B	.	.	.	-1,34	1,11	*	.	.	-	0,14
														0,60	
Asn	57	.	.	B	B	.	.	.	-1,27	0,43	.	*	.	-	0,39
														0,60	
Cys	58	.	A	B	B	.	.	.	-0,46	0,43	.	.	.	-	0,39
														0,60	
Gln	59	A	A	.	B	.	.	.	0,13	-	*	.	.	0,30	0,96
										0,26					

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Arg	60	A	A	.	B	.	.	.	0,34	-	.	.	F	0,75	0,80
										0,56					
Leu	61	A	A	.	B	.	.	.	0,92	-	.	.	F	0,60	1,47
										0,34					
Glu	62	.	A	B	B	.	.	.	0,92	-	.	*	F	0,60	1,23
										0,43					
Ser	63	.	A	B	.	.	.	.	0,70	-	*	*	F	0,90	1,05
										0,83					
Met	64	.	A	B	B	.	.	.	0,46	-	*	*	F	0,45	0,89
										0,14					
Thr	65	.	A	B	B	.	.	.	-0,47	-	.	*	F	0,45	0,80
										0,07					
Asp	66	A	A	.	B	.	.	.	-0,47	0,61	.	*	.	-	0,50
														0,60	
Ile	67	A	A	.	B	.	.	.	-0,47	0,91	.	.	.	-	0,41
														0,60	
Tyr	68	A	A	.	B	.	.	.	-0,98	0,70	.	.	.	-	0,46
														0,60	
Leu	69	A	A	.	B	.	.	.	-0,97	0,90	.	.	.	-	0,23
														0,60	
Leu	70	A	A	.	B	.	.	.	-1,54	1,40	.	*	.	-	0,33
														0,60	
Asn	71	A	A	.	B	.	.	.	-1,84	1,40	.	.	.	-	0,15
														0,60	
Leu	72	.	A	B	B	.	.	.	-0,96	1,03	*	.	.	-	0,24
														0,60	
Ala	73	A	A	.	B	.	.	.	-1,52	0,34	*	.	.	-	0,48



# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,30	
Ile	74	A	A	.	B	.	.	.	-1,41	0,34	.	.	.	-	0,25
														0,30	
Ser	75	A	A	.	B	.	.	.	-1,30	0,73	.	*	.	-	0,26
														0,60	
Asp	76	A	A	.	B	.	.	.	-2,11	0,83	.	.	.	-	0,22
														0,60	
Leu	77	.	A	B	B	.	.	.	-2,11	1,01	.	.	.	-	0,26
														0,60	
Phe	78	.	A	B	B	.	.	.	-1,83	1,01	.	.	.	-	0,16
														0,60	
Phe	79	.	A	B	B	.	.	.	-1,80	1,11	.	.	.	-	0,14
														0,60	
Leu	80	.	A	B	B	.	.	.	-1,71	1,76	.	*	.	-	0,13
														0,60	
Leu	81	.	A	B	B	.	.	.	-2,41	1,50	.	*	.	-	0,22
														0,60	
Thr	82	.	A	B	B	.	.	.	-1,89	1,50	.	*	.	-	0,22
														0,60	
Val	83	.	A	.	B	.	.	C	-1,78	1,63	.	*	.	-	0,29
														0,40	
Pro	84	A	A	.	B	.	.	.	-1,11	1,44	.	*	.	-	0,35
														0,60	
Phe	85	A	A	.	B	.	.	.	-0,54	1,26	.	.	.	-	0,33
														0,60	
Trp	86	A	A	.	B	.	.	.	-0,32	1,53	.	*	.	-	0,70
														0,60	

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Ala	87	A	A	.	B	.	.	.	-0,60	1,39	.	.	.	-	0,45
														0,60	
His	88	A	A	.	B	.	.	.	-0,33	1,46	.	.	.	-	0,53
														0,60	
Tyr	89	A	A	.	B	.	.	.	-0,12	1,17	.	.	.	-	0,51
														0,60	
Ala	90	A	A	.	B	.	.	.	0,29	0,66	.	*	.	-	0,87
														0,60	
Ala	91	A	A	.	.	.	.	.	0,58	1,07	.	*	.	-	0,67
														0,60	
Ala	92	A	A	.	.	.	.	.	0,47	0,57	.	*	.	-	0,72
														0,60	
Gln	93	A	A	.	.	.	.	.	0,16	0,60	.	*	.	-	0,62
														0,60	
Trp	94	A	A	.	.	.	.	.	0,40	0,53	.	*	.	-	0,60
														0,60	
Asp	95	.	.	.	.	T	T	.	0,68	0,43	.	*	.	0,20	0,96
Phe	96	.	.	.	.	T	T	.	0,67	0,41	.	*	.	0,20	0,80
Gly	97	.	.	.	.	T	T	.	0,59	0,63	*	*	F	0,35	0,75
Asn	98	.	.	.	.	T	T	.	0,59	0,29	*	*	F	0,65	0,24
Thr	99	.	.	.	B	T	.	.	0,07	0,69	*	.	.	-	0,48
														0,20	
Met	100	.	.	.	B	T	.	.	-0,74	0,59	*	.	.	-	0,40
														0,20	
Cys	101	.	.	B	B	.	.	.	-0,36	0,84	*	.	.	-	0,21
														0,60	
Gln	102	.	.	B	B	.	.	.	-0,36	0,93	*	.	.	-	0,21

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,60	
Leu	103	.	.	B	B	.	.	.	-1,17	0,87	*	.	.	-	0,21
														0,60	
Leu	104	.	.	B	B	.	.	.	-1,10	0,94	.	.	.	-	0,32
														0,60	
Thr	105	.	.	B	B	.	.	.	-1,20	1,13	*	.	.	-	0,29
														0,60	
Gly	106	.	.	B	B	.	.	.	-1,42	1,51	*	.	.	-	0,30
														0,60	
Tyr	108	.	.	B	B	.	.	.	-1,66	1,26	.	.	.	-	0,18
														0,60	
Phe	109	.	.	B	B	.	.	.	-1,54	1,56	.	.	.	-	0,15
														0,60	
Ile	110	.	.	B	B	.	.	.	-1,53	1,91	.	.	.	-	0,16
														0,60	
Gly	111	.	.	B	B	.	.	.	-1,53	1,61	.	.	.	-	0,14
														0,60	
Phe	112			B	B				-1,61	1,29	.	.	.	-	0,16
														0,60	
Phe	113	.	.	B	B	.	.	.	-2,07	1,19	.	.	.	-	0,16
														0,60	
Ser	114	.	.	.	B	.	.	C	-2,07	1,29	.	.	.	-	0,14
														0,40	
Gly	115	.	.	.	B	.	.	C	-2,07	1,64	.	.	.	-	0,14
														0,40	
Ile	116	.	.	.	B	.	.	C	-2,61	1,54	.	.	.	-	0,11
														0,40	

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Phe	117	.	.	B	B	.	.	.	-2,72	1,44	.	.	.	-	0,06
														0,60	
Phe	118	.	.	B	B	.	.	.	-2,83	1,74	.	.	.	-	0,05
														0,60	
Ile	119	.	.	B	B	.	.	.	-2,84	2,00	.	.	.	-	0,06
														0,60	
Ile	120	.	.	B	B	.	.	.	-3,39	1,80	.	*	.	-	0,10
														0,60	
Leu	121	.	.	B	B	.	.	.	-2,50	1,70	*	.	.	-	0,08
														0,60	
Leu	122	.	.	B	B	.	.	.	-1,69	0,91	*	.	.	-	0,18
														0,60	
Thr	123	A	.	.	B	.	.	.	-1,23	0,23	*	.	.	-	0,52
														0,30	
Ile	124	A	.	.	B	.	.	.	-1,16	0,60	*	.	.	-	0,98
														0,30	
Asp	125	A	.	.	.	.	T	.	-0,86	0,30	*	.	F	0,25	0,98
Arg	126	A	.	.	.	.	T	.	-0,93	0,11	*	.	.	0,10	0,69
Tyr	127	A	.	.	.	.	T	.	-0,98	0,31	*	.	.	0,10	0,69
Leu	128	A	.	.	.	.	T	.	-0,70	0,27	*	.	.	0,10	0,30
Ala	129	A	.	.	B	.	.	.	-0,40	0,77	*	.	.	-	0,21
														0,50	
Ile	130	A	.	.	B	.	.	.	-1,26	1,27	*	.	.	-	0,14
														0,60	
Val	131	A	.	.	B	.	.	.	-2,07	1,16	*	.	.	-	0,12
														0,60	
His	132	A	.	.	B	.	.	.	-2,41	1,26	.	.	.	-	0,11

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,60	
Ala	133	A	.	.	B	.	.	.	-2,41	1,26	.	*	.	-	0,15
														0,60	
Val	134	A	.	.	B	.	.	.	-1,78	1,26	.	*	.	-	0,17
														0,60	
Phe	135	A	.	.	B	.	.	.	-1,48	0,61	.	*	.	-	0,25
														0,60	
Ala	136	A	.	.	B	.	.	.	-0,51	0,61	.	*	.	-	0,25
														0,60	
Leu	137	A	.	.	B	.	.	.	-0,79	0,11	.	*	.	-	0,65
														0,30	
Lys	138	A	.	.	B	.	.	.	-1,06	-	.	*	F	0,60	1,09
										0,04					
Ala	139	A	.	.	B	.	.	.	-0,51	-	.	*	F	0,45	0,80
										0,19					
Arg	140	A			B				-0,51	-	.	*	F	0,60	1,40
										0,20					
Thr	141	.	.	B	B	.	.	.	-0,27	-	.	*	F	0,45	0,61
										0,10					
Val	142	.	.	B	B	.	.	.	-0,31	0,33	.	*	.	-	0,59
														0,30	
Thr	143	.	.	B	B	.	.	.	-1,21	0,47	.	*	.	-	0,23
														0,60	
Phe	144	.	.	B	B	.	.	.	-0,93	1,11	.	.	.	-	0,12
														0,60	
Gly	145	.	.	B	B	.	.	.	-1,34	1,11	.	.	.	-	0,23
														0,60	

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Val	146	.	.	B	B	.	.	.	-1,89	0,86	.	.	.	-	0,21
														0,60	
Val	147	.	.	B	B	.	.	.	-1,92	1,01	.	.	.	-	0,18
														0,60	
Thr	148	.	.	B	B	.	.	.	-1,92	0,91	.	.	.	-	0,13
														0,60	
Ser	149	.	.	B	B	.	.	.	-1,51	0,97	*	.	.	-	0,25
														0,60	
Val	150	.	.	B	B	.	.	.	-2,02	1,24	*	.	.	-	0,35
														0,60	
Ile	151	.	.	B	B	.	.	.	-2,02	1,24	*	.	.	-	0,18
														0,60	
Thr	152	.	.	B	B	.	.	.	-1,76	1,40	*	.	.	-	0,10
														0,60	
Trp	153	.	.	B	B	.	.	.	-2,30	1,51	*	.	.	-	0,14
														0,60	
Val	154	.	.	B	B	.	.	.	-2,70	1,51	*	.	.	-	0,14
														0,60	
Val	155	.	.	B	B	.	.	.	-2,43	1,61	*	.	.	-	0,09
														0,60	
Ala	156	.	.	B	B	.	.	.	-1,84	1,63	*	.	.	-	0,08
														0,60	
Val	157	.	.	B	B	.	.	.	-2,34	1,10	.	.	.	-	0,15
														0,60	
Phe	158	.	.	B	B	.	.	.	-2,27	1,14	.	.	.	-	0,17
														0,60	
Ala	159	.	.	B	B	.	.	.	-1,76	0,93	.	.	.	-	0,25

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,60	
Ser	160	.	.	.	B	.	.	C	-1,79	0,86	.	.	.	-	0,34
														0,40	
Leu	161	.	.	.	B	.	.	C	-2,09	0,90	.	.	.	-	0,27
														0,40	
Pro	162	.	.	.	B	.	.	C	-1,93	0,80	.	.	.	-	0,19
														0,40	
Gly	163	.	.	.	B	T	.	.	-1,54	1,09	*	.	.	-	0,12
														0,20	
Ile	164	.	.	B	B	.	.	.	-0,84	1,19	.	.	.	-	0,22
														0,60	
Ile	165	.	.	B	B	.	.	.	-0,84	0,50	.	*	.	-	0,27
														0,60	
Phe	166	.	.	B	B	.	.	.	-0,03	0,46	.	.	.	-	0,37
														0,26	
Thr	167	.	.	B	.	.	T	.	0,22	0,43	*	.	F	0,63	0,91
Arg	168	.	.	B	.	.	T	.	0,57	-	*	.	F	2,02	2,60
										0,26					
Ser	169	.	.	.	.	.	T	C	1,11	-	*	.	F	2,86	5,21
										0,94					
Gln	170	.	.	.	.	T	T	.	1,19	-	*	.	F	3,40	3,57
										1,30					
Lys	171	.	.	.	.	T	.	.	1,86	-	*	.	F	2,86	1,50
										1,10					
Glu	172	.	.	.	.	T	.	.	1,91	-	*	.	F	2,52	1,53
										0,60					
Gly	173	.	.	.	B	T	.	.	1,50	-	*	*	F	1,68	1,38

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
										0,23					
Leu	174	.	.	B	B	.	.	.	1,13	-	.	.	.	0,64	1,00
										0,14					
His	175	.	.	B	B	.	.		0,83	0,43	.	.	.	-	0,31
														0,60	
Tyr	176	.	.	B	B	.	.	.	0,49	0,81	.	.	.	-	0,42
														0,60	
Thr	177	.	.	B	B	.	.	.	0,46	0,77	.	*	.	-	0,68
														0,60	
Cys	178	.	.	B	.	.	T	.	0,10	0,59	.	*	.	-	0,68
														0,20	
Ser	179	.	.	.	.	T	T		0,70	0,87	.	*	.	0,20	0,38
Ser	180	.	.	.	.	T	T		0,49	0,54	.	.	.	0,20	0,40
His	181	.	.	.	.	T	T		0,43	0,81	.	.	.	0,35	1,18
Phe	182	.	.	.	.	.	T	C	0,74	0,63	.	.	.	0,15	1,18
Pro	183	.	.	.	.	T	T	.	1,17	0,64	.	.	.	0,35	1,52
Tyr	184	.	.	.	.	T	T	.	1,47	1,01	.	*	.	0,35	1,75
Ser	185	.	.	.	.	T	T	.	1,07	0,91	.	.	.	0,35	3,50
Gln	186	.	.	B	B	.	.	.	0,81	0,91	*	.	.	-	1,96
														0,45	
Tyr	187	.	.	.	B	T	.	.	1,56	1,40	*	.	.	-	1,31
														0,05	
Gln	188	.	.	.	B	T	.	.	1,77	0,64	*	.	.	-	1,96
														0,05	
Phe	189	.	.	.	B	T	.	.	1,31	0,66	*	*	.	-	1,82
														0,05	
Trp	190	.	.	.	B	T	.	.	1,61	1,04	*	*	.	-	1,01



# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,05	
Lys	191	.	.	B	B	.	.	.	1,30	0,69	*	*	.	-	1,01
														0,45	
Asn	192	.	.	.	B	T	.	.	0,73	0,77	*	.	.	-	1,68
														0,05	
Phe	193	.	.	.	B	T	.	.	0,78	0,67	*	*	.	-	1,32
														0,05	
Gln	194	A	.	.	B	.	.	.	0,59	-	*	.	F	0,60	1,32
										0,24					
Thr	195	.	.	.	B	.	.	C	0,02	0,44	*	*	F	-	0,57
														0,25	
Leu	196	.	.	B	B	.	.	.	-0,91	0,69	*	.	.	-	0,49
														0,60	
Lys	197	.	.	B	B	.	.	.	-1,72	0,59	.	.	.	-	0,20
														0,60	
Ile	198	.	.	B	B	.	.	.	-1,37	0,87	*	.	.	-	0,11
														0,60	
Val	199	.	.	B	B	.	.	.	-2,18	0,81	*	*	.	-	0,14
														0,60	
Ile	200	.	.	B	B	.	.	.	-2,72	0,81	.	*	.	-	0,06
														0,60	
Leu	201	.	.	B	B	.	.	.	-2,72	1,46	.	*	.	-	0,06
														0,60	
Gly	202	.	.	B	B	.	.	.	-2,98	1,46	.	*	.	-	0,07
														0,60	
Leu	203	.	.	B	B	.	.	.	-2,90	1,24	.	.	.	-	0,15
														0,60	

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Val	204	.	.	B	B	.	.	.	-2,86	1,24	.	.	.	-	0,15
														0,60	
Leu	205	.	.	B	B	.	.	.	-2,82	1,24	.	.	.	-	0,12
														0,60	
Pro	206	.	.	B	B	.	.	.	-2,61	1,46	.	.	.	-	0,11
														0,60	
Leu	207	.	.	B	B	.	.	.	-3,12	1,39	.	.	.	-	0,15
														0,60	
Leu	208	.	.	B	B	.	.	.	-3,20	1,39	.	.	.	-	0,13
														0,60	
Val	209	.	.	B	B	.	.	.	-3,01	1,39	.	.	.	-	0,06
														0,60	
Met	210	.	.	B	B	.	.	.	-2,44	1,53	.	.	.	-	0,04
														0,60	
Val	211	.	.	B	B	.	.	.	-2,53	1,60	.	.	.	-	0,07
														0,60	
Ile	212	.	.	B	B	.	.	.	-2,07	1,30	.	.	.	-	0,13
														0,60	
Cys	213	.	.	B	.	.	T	.	-2,14	1,09	.	.	.	-	0,13
														0,20	
Tyr	214	.	.	B	.	.	T	.	-2,10	1,16	.	.	.	-	0,13
														0,20	
Ser	215	.	.	B	.	.	T	.	-1,46	1,20	.	.	.	-	0,15
														0,20	
Gly	216	.	.	B	.	.	T	.	-0,91	0,51	*	.	.	-	0,55
														0,20	
Ile	217	.	.	B	B	.	.	.	-0,83	0,43	.	.	.	-	0,51

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,60	
Leu	218	.	.	B	B	.	.	.	-0,98	0,36	*	*	.	-	0,31
														0,30	
Lys	219	.	.	B	B	.	.	.	-0,62	0,66	*	*	F	-	0,26
														0,45	
Thr	220	.	.	B	B	.	.	.	-0,99	0,23	*	*	.	-	0,73
														0,30	
Leu	221	.	.	B	B	.	.	.	-0,53	0,11	*	*	.	-	0,47
														0,30	
Leu	222	A	.	.	B	.	.	.	0,36	-	*	*	.	0,60	0,46
										0,57					
Arg	223	A	.	.	B	.	.	.	1,17	-	*	*	.	0,30	0,52
										0,17					
Cys	224	A	.	.	.	.	T	.	1,17	-	.	*	.	1,15	1,08
										0,66					
Arg	225	A	.	.	.	.	T	.	1,52	-	*	*	F	1,30	2,63
										1,34					
Asn	226	A	.	.	.	.	T	.	2,44	-	*	*	F	1,30	2,68
										2,03					
Glu	227	A	.	.	.	.	T	.	3,22	-	.	*	F	1,30	9,80
										2,03					
Lys	228	A	.	.	.	.	.	.	3,22	-	.	*	F	1,10	6,81
										2,10					
Lys	229	A	.	.	.	.	.	.	3,30	-	*	*	F	1,10	8,29
										2,10					
Arg	230	A	.	.	.	.	.	.	2,33	-	*	.	F	1,10	4,83
										2,00					

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
His	231	A	.	.	B	.	.	.	2,44	-	*	*	.	0,75	1,79
										1,36					
Arg	232	A	.	.	B	.	.	.	1,63	-	*	.	.	0,75	1,76
										1,36					
Ala	233	A	.	.	B	.	.	.	0,70	-	*	*	.	0,60	0,74
										0,67					
Val	234	A	.	.	B	.	.	.	-0,04	0,01	*	.	.	-	0,38
														0,30	
Arg	235	A	.	.	B	.	.	.	-0,47	0,30	*	*	.	-	0,17
														0,30	
Leu	236	.	.	B	B	.	.	.	-1,32	0,79	*	*	.	-	0,24
														0,60	
Ile	237	.	.	B	B	.	.	.	-2,03	0,97	*	*	.	-	0,23
														0,60	
Phe	238	.	.	B	B	.	.	.	-2,33	0,94	*	*	.	-	0,11
														0,60	
Thr	239	.	.	B	B	.	.	.	-2,33	1,63	*	*	.	-	0,10
														0,60	
Ile	240	.	.	B	B	.	.	.	-2,69	1,59	*	*	.	-	0,10
														0,60	
Met	241	.	.	B	B	.	.	.	-2,58	1,66	.	.	.	-	0,19
														0,60	
Ile	242	.	.	B	B	.	.	.	-2,50	1,66	.	.	.	-	0,11
														0,60	
Val	243	.	.	B	B	.	.	.	-2,50	1,86	.	.	.	-	0,13
														0,60	
Tyr	244	.	.	B	B	.	.	.	-2,48	1,96	.	.	.	-	0,12

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,60	
Phe	245	.	.	B	B	.	.	.	-2,18	2,26	.	.	.	-	0,17
														0,60	
Leu	246	.	.	B	B	.	.	.	-1,79	2,07	.	.	.	-	0,24
														0,60	
Phe	247	.	.	.	B	T	.	.	-1,14	1,86	.	.	.	-	0,23
														0,20	
Trp	248	.	.	.	B	.	.	C	-0,28	1,86	.	*	.	-	0,42
														0,40	
Ala	249	.	.	.	.	.	T	C	-0,93	1,47	.	.	.	0,00	0,82
Pro	250	.	.	.	.	.	T	C	-1,09	1,47	.	*	.	0,00	0,67
Tyr	251	.	.	.	.	T	T	.	-1,09	1,33	.	.	.	0,20	0,47
Asn	252	.	.	B	.	.	T	.	-1,20	1,10	.	*	.	-	0,38
														0,20	
Ile	253	.	.	B	B	.	.	.	-1,72	1,29	.	*	.	-	0,20
														0,60	
Val	254	.	.	B	B	.	.	.	-1,13	1,54	.	*	.	-	0,11
														0,60	
Leu	255	.	.	B	B	.	.	.	-1,23	1,19	*	.	.	-	0,11
														0,60	
Leu	256	.	.	B	B	.	.	.	-1,69	1,27	*	.	.	-	0,22
														0,60	
Leu	257	.	.	B	B	.	.	.	-1,69	1,37	*	.	.	-	0,26
														0,60	
Asn	258	.	.	B	B	.	.	.	-0,80	1,13	*	.	.	-	0,54
														0,60	
Thr	259	A	.	.	B	.	.	.	-0,64	0,44	*	.	.	-	1,14

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
														0,45	
Phe	260	A	.	.	B	.	.	.	-0,53	0,54	*	.	.	-	1,20
														0,45	
Gln	261	.	.	B	B	.	.	.	-0,07	0,64	*	.	.	-	0,64
														0,60	
Glu	262	.	.	B	B	.	.	.	-0,07	0,67	*	.	.	-	0,44
														0,60	
Phe	263	.	.	B	.	.	.	.	-0,07	0,87	*	.	.	-	0,42
														0,40	
Phe	264	.	.	.	.	T	.	.	0,24	0,49	.	.	.	0,00	0,39
Gly	265	.	.	.	.	T	.	.	0,28	0,49	.	.	.	0,00	0,36
Leu	266	.	.	.	.	T	.	.	-0,02	1,06	.	.	.	0,00	0,22
Asn	267	.	.	.	.	T	.	.	-0,32	0,66	.	.	.	0,00	0,35
Asn	268	.	.	.	.	T	.	.	0,08	0,26	.	.	F	0,45	0,47
Cys	269	.	.	.	.	T	T	.	0,78	0,21	*	*	F	0,65	0,76
Ser	270	.	.	.	.	T	T	.	1,23	-	*	*	F	1,25	0,76
										0,07					
Ser	271	.	.	.	.	T	T	.	1,23	-	.	*	F	1,25	0,93
										0,47					
Ser	272	.	.	.	.	.	T	C	1,23	-	*	*	F	1,20	1,43
										0,19					
Asn	273	.	A	.	.	T	.	.	1,23	-		*	F	1,30	1,79
										0,76					
Arg	274	.	A	.	.	T	.	.	1,31	-	*	*	F	1,30	2,31
										0,74					
Leu	275	A	A	.	.	.	.	.	1,01	-	*	*	F	0,90	1,74
										0,63					

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Asp	276	A	A	.	.	.	.	.	1,31	-	*	*	F	0,60	1,07
										0,40					
Gln	277	A	A	.	.	.	.	.	0,76	-	*	*	.	0,30	0,95
										0,40					
Ala	278	A	.	.	B	.	.	.	0,44	0,24	*	*	.	-	0,85
														0,30	
Met	279	.	.	B	B	.	.	.	0,33	0,04	*	*	.	-	0,74
														0,30	
Gln	280	.	.	B	B	.	.	.	0,83	0,04	*	*	.	-	0,74
														0,30	
Val	281	.	.	B	B	.	.	.	0,02	0,13	*	.	.	-	1,05
														0,15	
Thr	282	A	.	.	B	.	.	.	-0,32	0,31	*	.	F	-	0,88
														0,15	
Glu	283	A	.	.	B	.	.	.	-0,33	0,13	*	.	F	-	0,50
														0,15	
Thr	284	A	.	.	B	.	.	.	-0,04	0,34	.	*	F	-	0,67
														0,15	
Leu	285	A	.	.	B	.	.	.	-0,08	0,19	.	.	.	-	0,67
														0,30	
Gly	286	.	.	.	B	T	.	.	0,11	0,20	.	.	.	0,10	0,52
Met	287	.	.	.	B	T	.	.	-0,24	0,77	.	.	.	-	0,19
														0,20	
Thr	288	.	.	B	B	.	.	.	-1,13	0,86	.	.	.	-	0,13
														0,60	
His	289	.	.	B	B	.	.	.	-0,82	0,86	.	.	.	-	0,09
														0,60	

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Cys	290	.	.	B	B	.	.	.	-0,22	0,83	.	.	.	-	0,15
														0,60	
Cys	291	.	.	B	B	.	.	.	-0,77	0,64	.	.	.	-	0,16
														0,60	
Ile	292	.	.	B	B	.	.	.	-1,06	0,84	.	.	.	-	0,08
														0,60	
Asn	293	.	.	B	B	.	.	.	-0,99	1,03	*	*	.	-	0,11
														0,60	
Pro	294	.	.	B	B	.	.	.	-1,54	1,21	*	.	.	-	0,31
														0,60	
Ile	295	.	A	B	B	.	.	.	-1,58	1,14	*	.	.	-	0,44
														0,60	
Ile	296	.	A	B	B	.	.	.	-1,77	1,24	*	.	.	-	0,24
														0,60	
Tyr	297	.	A	B	B	.	.	.	-1,22	1,49	*	.	.	-	0,11
														0,60	
Ala	298	.	A	B	B	.	.	.	-1,22	1,49	.	.	.	-	0,16
														0,60	
Phe	299	.	A	B	B	.	.	.	-0,97	0,80	.	.	.	-	0,40
														0,60	
Val	300	.	A	B	B	.	.	.	-0,78	0,11	*	*	.	-	0,51
														0,30	
Gly	301	A	A	.	B	.	.	.	0,22	0,14	*	*	F	-	0,44
														0,15	
Glu	302	A	A	.	.	.	.	.	0,47	-	*	*	F	0,45	0,99
										0,36					
Lys	303	A	A	.	.	.	.	.	0,81	-	*	*	F	0,90	2,14



# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
										0,74					
Phe	304	A	.	.	.	.	T	.	0,70	-	*	*	F	1,30	3,39
										0,63					
Arg	305	A	.	.	.	.	T	.	0,74	-	*	*	.	0,85	1,62
										0,37					
Asn	306	A	.	.	.	.	T	.	0,23	0,31	*	*	.	0,10	0,67
Tyr	307	A	.	.	.	.	T	.	-0,47	0,96	*	*	.	-	0,57
														0,20	
Leu	308	A	.	.	B	.	.	.	-1,21	0,96	*	*	.	-	0,25
														0,60	
Leu	309	A	.	.	B	.	.	.	-0,51	1,74	*	*	.	-	0,14
														0,60	
Val	310	A	.	.	B	.	.	.	-0,58	1,74	.	.	.	-	0,15
														0,60	
Phe	311	A	.	.	B	.	.	.	-0,61	0,99	*	.	.	-	0,36
														0,60	
Phe	312	A	.	.	B	.	.	.	-1,26	0,80	*	.	.	-	0,60
														0,60	
Gln	313	A	.	.	B	.	.	.	-1,03	0,80	*	.	.	-	0,57
														0,60	
Lys	314	A	.	.	B	.	.	.	-0,18	0,66	*	.	.	-	0,66
														0,60	
His	315	A	A	.	.	.	.	.	0,79	-	*	*	.	0,45	1,53
										0,13					
Ile	316	A	.	.	.	.	.	.	0,79	-	*	.	.	0,75	1,73
										0,91					
Ala	317	A	A	.	.	.	.	.	0,82	-	*	.	.	0,88	0,75

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
										0,53					
Lys	318	A	A	.	.	.	.	.	0,87	0,04	*	.	.	0,26	0,30
Arg	319		A	.	.	T	.	.	0,16	-	*	.	.	1,54	0,84
										0,46					
Phe	320	.	A	.	.	T	.	.	-0,48	-	*	.	.	2,12	0,45
										0,57					
Cys	321	.	.	.	.	T	T	.	0,11	-	*	.	.	2,80	0,12
										0,50					
Lys	322	.	.	.	.	T	T	.	-0,19	-	*	.	.	2,22	0,08
										0,11					
Cys	323	.	.	.	.	T	T	.	-0,93	0,57	*	.	.	1,04	0,07
Cys	324	.	.	.	.	T	T	.	-1,04	0,57	*	.	.	0,76	0,11
Ser	325	.	A	.	.	T	.	.	-0,34	0,40	*	.	.	0,38	0,09
Ile	326	.	A	B	.	.	.	.	0,32	0,80	*	.	.	-	0,30
														0,60	
Phe	327	.	A	B	.	.	.	.	-0,31	0,23	*	.	.	-	0,97
														0,30	
Gln	328	A	A	.	.	.	.	.	0,14	0,16	.	.	F	-	0,73
														0,15	
Gln	329	A	A	.	.	.	.	.	0,81	0,20	.	*	F	0,00	1,61
Glu	330	A	A	.	.	.	.	.	1,22	-	.	*	F	0,60	3,22
										0,49					
Ala	331	.	A	.	.	.	.	C	1,52	-	.	*	F	1,10	3,64
										1,27					
Pro	332	A	A	.	.	.	.	.	1,92	-	*	*	F	0,90	2,13
										1,17					

# ES 2 359 629 T3

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Glu	333	A	A	.	.	.	.	.	1,62	-	*	*	F	0,90	1,64
										1,19					
Arg	334	A	A	.	.	.	.	.	0,77	-	*	.	F	0,90	2,18
										0,80					
Ala	335	A	A	.	B	.	.	.	0,52	-	*	*	F	0,90	1,05
										0,66					
Ser	336	.	A	B	B	.	.	.	0,80	-	*	*	F	0,45	0,95
										0,33					
Ser	337	.	.	B	B	.	.	.	1,12	0,16	*	.	F	-	0,70
														0,15	
Val	338	.	.	B	B	.	.	.	0,82	0,16	*	*	.	-	1,35
														0,15	
Tyr	339	.	.	B	B	.	.	.	0,40	0,04	*	*	F	0,30	1,35
Thr	340	.	.	B	B	.	.	.	0,64	0,14	*	*	F	0,60	1,46
Arg	341	.	.	.	B	.	.	C	0,94	0,19	.	*	F	1,10	1,94
Ser	342	.	.	.	.	.	T	C	1,24	-	.	*	F	2,40	2,15
										0,46					
Thr	343	.	.	.	.	.	T	C	2,10	-	.	*	F	3,00	2,58
										0,81					
Gly	344	.	.	.	.	.	T	C	1,46	-	.	*	F	2,70	2,28
										1,30					
Glu	345	.	.	.	.	.	T	C	1,47	-	.	*	F	2,40	1,19
										0,61					
Gln	346	.	.	B	B	.	.	.	0,50	-	.	*	F	1,50	1,11
										0,61					
Glu	347	.	.	B	B	.	.	.	0,46	-	.	*	F	0,75	0,83
										0,46					

Res	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Ile	348	.	.	B	B	.	.	.	-0,04	-	.	*	F	0,45	0,47
										0,46					
Ser	349	.	.	B	B	.	.	.	-0,09	0,23	.	*	.	-	0,23
														0,30	
Val	350	.	.	B	B	.	.	.	-0,48	0,26	.	*	.	-	0,17
														0,30	
Gly	351	.	.	B	B	.	.	.	-0,87	0,69	.	*	.	-	0,30
														0,30	
Leu	352	A	.	.	B	.	.	.	-1,26	0,43	.	*	.	-	0,29
														0,60	

Entre los fragmentos altamente preferidos a este respecto están los que comprenden regiones del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que combinan varias características estructurales, tales como varias de las características expuestas anteriormente.

Otros fragmentos polipeptídicos preferidos son fragmentos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) biológicamente activos. Los fragmentos biológicamente activos son los que muestran actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una actividad deseada mejorada o una actividad no deseable disminuida. También se describen polinucleótidos que codifican estos fragmentos polipeptídicos.

Sin embargo, muchas secuencias polinucleotídicas tales como secuencias EST, están disponibles públicamente y accesibles a través de bases de datos de secuencias. Algunas de estas secuencias están relacionadas con SEC ID N°: 1 o con el clon depositado y pueden haber estado disponibles públicamente. Enumerar cada secuencia relacionada resultaría incómodo. En consecuencia, se excluyen preferiblemente de la presente descripción uno o más polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos descrita por la fórmula general de a-b, en la que a es cualquier número entero entre 1 y 1400 de SEC ID N°: 1, b es un número entero de 15 a 1414, correspondiendo tanto a como b a las posiciones de los restos nucleotídicos mostrados en SEC ID N°: 1 o del clon depositado y siendo b mayor o igual que a + 14.

### **Epítomos y Anticuerpos**

Se describen polipéptidos que comprende, o como alternativa que consisten en, un epítipo del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o un epítipo de la secuencia polipeptídica codificada por una secuencia polinucleotídica contenida en el N° de Depósito de ATCC 97183 o codificada por un polinucleótido que hibrida con el complemento de la secuencia de SEC ID N°: 1 o contenido en el N° de Depósito de ATCC 97183 en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones de hibridación menos rigurosas como se ha definido anteriormente. Se describen adicionalmente secuencias polinucleotídicas que codifican un epítipo de una secuencia polipeptídica descrita en la que (tal como, por ejemplo, la secuencia descrita en SEC ID N°: 1 o la secuencia del clon depositado), las secuencias polinucleotídicas de la hebra complementaria de una secuencia polinucleotídica que codifica un epítipo y secuencias polinucleotídicas que hibridan con la hebra complementaria en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones de hibridación menos rigurosas definidas anteriormente.

El término "epítomos", como se usa en la presente memoria, se refiere a partes de un polipéptido que tienen actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente en un ser humano. Se describe un polipéptido que comprende un epítipo, así como el polinucleótido que codifica este polipéptido. Un "epítipo inmunogénico", como se usa en la presente memoria, se define como una parte de una proteína que induce una respuesta de anticuerpo en un animal, según se determina por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por los métodos para generar anticuerpos descritos posteriormente. (Véase, por ejemplo, Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998- 4002 (1983)). La expresión "epítipo antigénico", como se usa en la presente memoria, se define como una parte de una proteína a la que un anticuerpo puede unir específicamente su antígeno como se determina por cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, por los inmunoensayos descritos

en la presente memoria. La unión inmuno-específica excluye unión no específica pero no necesariamente excluye reactividad cruzada con otros antígenos. Los epítomos antigénicos no necesitan necesariamente ser inmunogénicos. Puede usarse la proteína de longitud completa o un fragmento de péptido antigénico. Se muestran regiones que tienen un alto índice de antigenicidad en la Tabla 1 y FIGURA 3.

- 5 Se preparan preferiblemente anticuerpos de estas regiones o de fragmentos discretos en estas regiones. Sin embargo, pueden prepararse anticuerpos de cualquier región del péptido como se describe en la presente memoria. Un fragmento preferido produce un anticuerpo que disminuye o evita completamente la unión a ligando. Los anticuerpos pueden desarrollarse contra el receptor completo o partes del receptor, por ejemplo, el dominio carboxi terminal intracelular, el dominio amino terminal extracelular, el dominio transmembrana completo o segmentos transmembrana específicos, cualquiera de los bucles intracelulares o extracelulares o cualquier parte de estas regiones. También pueden desarrollarse anticuerpos contra sitios funcionales específicos, tales como el sitio de unión a ligando, el sitio de acoplamiento de proteína G o sitios que están glucosilados, fosforilados, miristoilados o amidados.

- 15 Pueden producirse fragmentos que funcionan como epítomos por cualquier medio convencional (Véase, por ejemplo Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135 (1985), descrito adicionalmente en la Patente de Estados Unidos Nº 4.631.211).

- 20 Los epítomos antigénicos preferiblemente contienen una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferiblemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, y más preferiblemente, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Los polipéptidos preferidos que comprenden epítomos inmunogénicos o antigénicos tienen al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 restos aminoácídicos de longitud. Los epítomos antigénicos preferidos no exclusivos adicionales incluyen los epítomos antigénicos descritos en la presente memoria, así como partes de los mismos. Los epítomos antigénicos son útiles, por ejemplo, para inducir anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente al epítomo. Los epítomos antigénicos preferidos incluyen los epítomos antigénicos descritos en la presente memoria, así como cualquier combinación de dos, tres, cuatro, cinco o más de estos epítomos antigénicos. Los epítomos antigénicos pueden usarse como las moléculas diana en inmunoensayos (Véase, por ejemplo, Wilson *et al.*, Cell 37: 767-778 (1984); Sutcliffe *et al.*, Science 219: 660-666 (1983)). No debe interpretarse, sin embargo, que estos fragmentos abarquen cualquier fragmento que pueda describirse antes de la invención.

- 30 De forma similar, pueden usarse epítomos inmunogénicos, por ejemplo, para inducir anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Sutcliffe *et al.*, mencionado anteriormente; Wilson *et al.*, mencionado anteriormente; Chow *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 910-914; y Bittle *et al.*, J. Gen. Virol. 66: 2347-2354 (1985). Los epítomos inmunogénicos preferidos incluyen los epítomos inmunogénicos descritos en la presente memoria, así como cualquier combinación de dos, tres, cuatro, cinco o más de estos epítomos inmunogénicos. Los polipéptidos que comprenden uno o más epítomos inmunogénicos pueden presentarse para inducir una respuesta de anticuerpo junto con una proteína vehículo, tal como una albúmina, a un sistema animal (tal como conejo o ratón) o, si el polipéptido es de suficiente longitud (al menos aproximadamente 25 aminoácidos), el polipéptido puede presentarse sin un vehículo. Sin embargo, los epítomos inmunogénicos que comprenden tan pocos como de 8 a 10 aminoácidos han demostrado ser suficientes para inducir anticuerpos capaces de unirse a, como mínimo, epítomos lineales en un polipéptido desnaturalizado (por ejemplo, en transferencia de Western).

- 45 Pueden usarse polipéptidos que portan epítomos para inducir anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, inmunización *in vivo*, inmunización *in vitro* y métodos de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, Sutcliffe *et al.*, mencionado anteriormente; Wilson *et al.*, mencionado anteriormente, y Bittle *et al.*, J. Gen. Virol., 66: 2347-2354 (1985). Si se usa inmunización *in vivo*, los animales pueden inmunizarse con péptido libre; sin embargo, el título de anticuerpos antipéptidos puede estimularse mediante el acoplamiento del péptido con un vehículo macromolecular, tal como hemacianina de lapa californiana (KLH) o toxoide del tétanos. Por ejemplo, pueden acoplarse péptidos que contienen restos de cisteína con un vehículo usando un enlazador tal como éster de maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), mientras que otros péptidos pueden acoplarse a vehículos usando un agente de enlace más general tal como glutaraldehído.

- 50 También pueden sintetizarse péptidos que portan epítomos como péptidos antigénicos múltiples (MAP), descritos primero por J. P. Tam en Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5409. Los MAP consisten en copias múltiples de un péptido específico unido a un núcleo de lisina no inmunogénico. Los péptidos MAP habitualmente contienen 4 u 8 copias del péptido con frecuencia denominadas péptidos MAP-4 o MAP-8. Como ejemplo no limitante los MAP pueden sintetizarse en una matriz de núcleo de lisina unida a un soporte de polietilenglicol-poliestireno (PEG-PS). El péptido de interés se sintetiza en los restos de lisina usando química de 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc). Por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA) ofrece resinas MAP, tales como, por ejemplo, la Rama de Resina de Fmoc 4 y la Rama de Resina Fmoc 8 que pueden usarse para sintetizar MAP. La escisión de los MAP de la resina se realiza con cócteles basados en ácido trifluoroacético (TFA) convencionales conocidos en la técnica. La purificación de los MAP, excepto para desalación, no es necesaria. Los péptidos MAP pueden usarse como una vacuna de inmunización que induce anticuerpos que reconocen tanto el MAP como la proteína nativa de la que se derivó el péptido.

Los péptidos que portan epítipo también pueden incorporarse en una proteína de cubierta de un virus que puede usarse después como un inmunógeno o una vacuna con la que inmunizar animales, incluyendo seres humanos, para potenciar la producción de anticuerpos anti-epítipo. Por ejemplo, el bucle V3 de la glucoproteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) se ha modificado por ingeniería genética para expresarse en la superficie de rinovirus. La inmunización con este rinovirus que presenta el péptido de bucle V3 produjo miméticos aparentemente eficaces del VIH, inmunógenos (según se midió por su capacidad para neutralizarse mediante anticuerpos anti VIH-1 así como su capacidad para inducir la producción de anticuerpos capaces de neutralizar VIH-1 en cultivo celular. Estas técnicas de uso de partículas virales modificadas por ingeniería genética como un inmunógeno se describen en más detalle en Smith *et al.*, Behring Inst Mitt Feb;(98): 229-39 (1997), Smith *et al.*, J Virol 72: 651-9 (1998), y Zhang *et al.*, Biol Chem 380: 365-74 (1999).

Los polipéptidos que portan epítipos pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de aminoácidos en el extremo amino y/o carboxi terminal del péptido. Tales modificaciones pueden realizarse, por ejemplo, para alterar la conformación del polipéptido que porta epítipo de modo que el epítipo tendrá una conformación más cercanamente relacionada con la estructura del epítipo en la proteína nativa. Un ejemplo de un polipéptido CCR5 que porta epítipo modificado es un polipéptido en el que se han añadido uno o más restos de cisteína al polipéptido para permitir la formación de un enlace disulfuro entre dos cisteínas, dando como resultado una estructura de bucle estable del epítipo que porta polipéptido en condiciones no reductoras. Pueden formarse enlaces disulfuro entre un resto de cisteína añadido al polipéptido y un resto de cisteína del epítipo de origen natural o pueden formarse entre dos cisteínas ambas de las cuales se han añadido al epítipo de origen natural que porta polipéptido. Adicionalmente, es posible modificar uno o más restos aminoácidos del polipéptido que porta epítipo de origen natural mediante su sustitución con cisteínas para promover la formación de estructuras en bucle con enlace disulfuro. Las moléculas de tioéter cíclicas de péptidos sintéticos pueden generarse rutinariamente usando técnicas conocidas en la materia y se describen en la publicación de PCT WO 97/46251. Otras modificaciones de polipéptidos que portan epítipos contempladas por la presente invención incluyen biotinylación.

Animales tales como conejos, ratas y ratones se inmunizan con péptidos libres o acoplados a vehículo o péptidos MAP, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal y/o intradérmica de emulsiones que contienen aproximadamente 100 µg de péptido o proteína vehículo y adyuvante de Freund o cualquier otro adyuvante conocido para estimular una respuesta inmune. Pueden necesitarse varias inyecciones de refuerzo, por ejemplo, a intervalos de aproximadamente dos semanas, para proporcionar una titulación útil de anticuerpo antipéptido que pueda detectarse, por ejemplo mediante ensayo de ELISA usando péptido libre adsorbido en una superficie sólida. El título de anticuerpos antipeptídicos en suero de un animal inmunizado puede aumentarse mediante la selección de anticuerpos antipeptídico, por ejemplo, mediante adsorción con el péptido en un soporte sólido y elución de los anticuerpos seleccionados de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Como apreciará un experto en la materia, y como se ha analizado anteriormente, los polipéptidos que comprenden un epítipo inmunogénico o antigénico pueden fusionarse con otras secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, los polipéptidos pueden fusionarse con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM) o partes de las mismas (CH1, CH2, CH3 o cualquier combinación de las mismas y partes de las mismas) de albúmina (incluyendo sin limitación albúmina humana recombinante o fragmentos o variantes de la misma (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.876.969 expedida el 2 de marzo de 1999, la Patente de EP 0 413 622 y la Patente de Estados Unidos Nº 5.766.883, expedida el 16 de junio de 1998)), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación y pueden aumentar la semivida *in vivo*. Esto se ha mostrado para proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de mamífero. Véase, por ejemplo, el documento EP 394.827; Traunecker *et al.*, Nature, 331: 84-86 (1988). El suministro potenciado de un antígeno a través de la barrera epitelial al sistema inmune se ha demostrado para antígenos (por ejemplo insulina) conjugados con un compañero de unión de FcRn tal como fragmentos Fc o IgG (véase, por ejemplo, las Publicaciones de PCT WO 96/22024 y WO 99/04813). Las proteínas de fusión de IgG que tienen una estructura dimérica unida por disulfuro debido a los enlaces disulfuro de la parte de IgG también se ha descubierto que son más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas que los polipéptidos monoméricos o fragmentos de los mismos por sí solos. Véase, por ejemplo, Fountoulakis *et al.*, J. Biochem., 270:3958-3964 (1995). Los ácidos nucleicos que codifican los epítipos anteriores también pueden recombinarse con una gen de interés como un marcador de epítipo (por ejemplo, el marcador de hemaglutinina ("HA") o marcador flag) para ayudar a la detección y purificación del polipéptido expresado. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht *et al.* permite la purificación fácil de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972- 897). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vaccinia de modo que la fase abierta de lectura del gen se fusiona de forma traduccional con un marcador amino-terminal que consiste en seis restos de histidina. El marcador sirve como un dominio de unión a la matriz para la proteína de fusión. Los extractos de células infectadas con el virus vaccinia recombinante se cargan en columnas de agarosa-ácido nitriloacético Ni<sup>2+</sup> y se pueden eluir de forma selectiva las proteínas marcadas con histidina con tampones que contienen imidazol.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de combinación de genes, combinación de motivos, combinación de exones y/o combinación de codones (denominadas de forma colectiva "barajado de

ADN"). El barajado de ADN puede emplearse para modular las actividades de polipéptidos, tales métodos pueden usarse para generar polipéptidos con actividad alterada, así como agonistas y antagonistas de los polipéptidos. Véase, generalmente, las Patentes de Estados Unidos N° 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 724-33 (1997); Harayama, Trends Biotechnol. 16(2): 76-82 (1998); Hansson, *et al.*, J. Mol. Biol. 287: 265-76 (1999); y Lorenzo y Blasco, Biotechniques 24(2): 308-13 (1998). La alteración de polinucleótidos correspondientes a SEC ID N°: 1 y los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos puede conseguirse mediante barajado de ADN. El barajado de ADN implica el ensamblaje de dos o más segmentos de ADN por recombinación homóloga o específica de sitio para generar variación en la secuencia del polinucleótido. Los polinucleótidos, o los polipéptidos codificados, pueden alterarse sometiéndolos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a error, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. En otra realización, uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de un polinucleótido que codifica un polipéptido pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

### Anticuerpos

Aparte de los anticuerpos de la invención mencionada anteriormente, el (TCR) que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido, fragmento polipeptídico o variante de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado y/o un epítipo (como se determinó por inmunoensayos bien conocidos en la técnica para ensayar unión de antígeno a anticuerpo específica.

Se sabe que la unidad estructural de anticuerpo básica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. La parte carboxiterminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Véase *generalmente*, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión a anticuerpo.

De este modo, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son el mismo.

Las cadenas muestran todas la misma estructura general de regiones flanqueantes relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las cadenas pesada y ligera de cada par se alinean por las regiones flanqueantes, permitiendo la unión a un epítipo específico. De N terminal a C terminal, las cadenas ligera y pesada comprenden los dominios, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), o Chothia y Lesk J Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia *et al.* Nature 342: 878-883 (1989).

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes: los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por una diversidad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny *et al.* J Immunol. 148: 1547-1553 (1992). Además, pueden formarse anticuerpos biespecíficos como "diacuerpos" (Holliger *et al.* "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments" PNAS USA 90:6444-6448 (1993)) o "Janusins" (Traut-necker *et al.* "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10: 3655-3659 (1991) y Trautnecker *et al.* "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" Int J Cancer Suppl 7: 51-52 (1992)).

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención), anticuerpos preparados de forma intracelular (es decir, intracuerpos) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes o fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. En una realización preferida, la inmunoglobulina es un isotipo IgM. En una realización preferida, la inmunoglobulina es un isotipo IgG1. En otra realización preferida, la inmunoglobulina es un isotipo IgG2. En otra realización preferida, la inmunoglobulina es un isotipo IgG4. Las inmunoglobulinas pueden tener tanto una cadena pesada como una ligera. Una serie de cadenas pesadas de IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY pueden emparejarse con una cadena ligera de las formas kappa o lambda.

Más preferiblemente los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humanos de la presente

invención e incluyen, sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la región o las regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que comprenden además cualquier combinación de una región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, murinos (por ejemplo, de ratón y rata), de asno, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo. Como se usan en la presente memoria, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe posteriormente y, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.939.598 de Kucherlapati *et al.*

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido descrito en la presente memoria o pueden ser específicos para un polipéptido descrito en la presente memoria así como para un epítomo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, las publicaciones de PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, *et al.*, J. Immunol. 147: 60-69 (1991); las Patentes de Estados Unidos N° 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

Los anticuerpos de la presente descripción pueden describirse o especificarse en términos del epítomo o los epítomos o parte o partes de un polipéptido descrito en la presente memoria que reconocen o al que se unen específicamente. El epítomo o los epítomos o parte o partes del polipéptido pueden especificarse como se describe en la presente memoria, por ejemplo, mediante posiciones N terminal y C terminal, por tamaño en restos aminoácidos contiguos o enumerados en las Tablas y Figuras. Los epítomos preferidos de la invención incluyen: Thr16-Va125, Gln59-Thr65, Thr167-Leu174, Ser 179-Ser185, Leu222-Ala233, Asn268-Gln277, His315-Ser325, Glu330-Ser336, Tyr339-Ile348 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado, así como polinucleótidos que codifican estos epítomos. Los epítomos incluso más preferidos incluyen péptidos que corresponden a los bucles extracelulares del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos y variantes del mismo, por ejemplo, aminoácidos 89-102, 167-195 y/o 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado. Los anticuerpos que se unen específicamente a cualquier epítomo o polipéptido también pueden excluirse. Por lo tanto, la presente invención incluye anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de CCR5 y permiten la exclusión de los mismos.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Se incluyen anticuerpos que no se unen a cualquier otro análogo, ortólogo u homólogo de un polipéptido descrito en la presente memoria. También se incluyen en la presente descripción anticuerpos que se unen a polipéptidos con al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% y al menos 50% de identidad (según se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con un polipéptido descrito en la presente memoria. Los anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada con homólogos murinos, de mono, de rata y/o de conejo de proteínas humanas y los epítomos correspondientes de los mismos. También se describen anticuerpos que no se unen a polipéptidos con menos de 95%, menos de 90%, menos de 85%, menos de 80%, menos de 75%, menos de 70%, menos de 65%, menos de 60%, menos de 55% y menos de 50% de identidad (según se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con un polipéptido descrito en la presente memoria. En una realización específica, la reactividad cruzada anteriormente descrita es con respecto a cualquier polipéptido antigénico o inmunogénico específico sencillo o una combinación o combinaciones de 2, 3, 4, 5 o más de los polipéptidos antigénicos y/o inmunogénicos específicos descritos en la presente memoria. Adicionalmente se incluyen en la presente descripción anticuerpos que se unen a polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan con un polinucleótido de la presente descripción en condiciones de hibridación rigurosas (como se ha descrito en la presente memoria).

Los anticuerpos (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos) pueden unirse inmuno-específicamente con un polipéptido o fragmento polipeptídico o variante del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) humano (SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado) y/o Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de mono. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención se unen inmuno-específicamente al Receptor de Quimiocina de proteína G humano. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención se unen inmuno-específicamente al Receptor de Quimiocina de proteína G humano y de mono. También preferiblemente, los anticuerpos de la invención se unen inmuno-específicamente al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) humano y al Receptor de Quimiocina de proteína G murino. Más preferiblemente, los anticuerpos se unen inmuno-específicamente y con mayor afinidad al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) humano que al Receptor de Quimiocina de proteína G murino.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la presente invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos), se unen inmuno-específicamente al



Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y no reaccionan de forma cruzada con cualquier otro antígeno. En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención se unen inmuno-específicamente con el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y no reaccionan de forma cruzada con otros receptores de quimiocina tales como, por ejemplo, US28, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 y/o CXCR5.

En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos se unen inmuno-específicamente al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y reaccionan de forma cruzada con otros receptor de quimiocina tales como, por ejemplo, US28, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 y/o CXCR5. En realizaciones más preferidas, los anticuerpos de la invención se unen inmuno-específicamente al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y no reaccionan de forma cruzada con CCR3 y/o CXCR4.

En una realización preferida, los anticuerpos se unen preferentemente al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado) o fragmentos y variantes del mismo en relación con su capacidad para unirse a otros antígenos (tales como, por ejemplo, otros receptores de quimiocina).

Como ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una constante de disociación ( $K_D$ ) que es menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra realización no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra realización no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo antígeno.

En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) que es menor que la  $k_{off}$  del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra realización no limitante, se considera que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la  $k_{off}$  del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra realización no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la  $k_{off}$  del anticuerpo para el segundo antígeno.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión con un polipéptido de CCR5. Las afinidades de unión pueden incluir las que tienen una constante de disociación o  $K_D$  menor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M. Las afinidades de unión pueden incluir las que tienen una constante de disociación o  $K_D$  menor de  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M o  $10^{-8}$  M. Las afinidades de unión pueden incluir las que tienen una constante de disociación o  $K_D$  menor de  $5 \times 10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M, o  $10^{-15}$  M. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la presente invención tiene una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-9}$  M o menos.

En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con una velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) de al menos  $10^{-3}$ /s o  $10^{-4}$ /s. Se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes de los mismos con una velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) menor o igual a  $5 \times 10^{-4}$  s $^{-1}$ ,  $10^{-4}$  s $^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  s $^{-1}$ , o  $10^{-5}$  s $^{-1}$   $5 \times 10^{-6}$  s $^{-1}$ ,  $10^{-6}$  s $^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  s $^{-1}$  o  $10^{-7}$  s $^{-1}$ . También se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos de CCR5 o fragmentos o variantes de los mismos con una velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) menor o igual a  $5 \times 10^{-2}$  s $^{-1}$ ,  $10^{-2}$  s $^{-1}$  o  $5 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ .

En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con una velocidad de asociación ( $k_{on}$ ) mayor o igual a  $10^3$  M $^{-1}$  s $^{-1}$ ,  $5 \times 10^3$  M $^{-1}$  s $^{-1}$ ,  $10^4$  M $^{-1}$  s $^{-1}$  o  $5 \times 10^4$  M $^{-1}$  s $^{-1}$ . Se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con una velocidad de asociación ( $k_{on}$ ) mayor o igual a  $10^5$  M $^{-1}$  s $^{-1}$ ,  $5 \times 10^5$  M $^{-1}$  s $^{-1}$ ,  $10^6$  M $^{-1}$  s $^{-1}$ , o  $5 \times 10^6$  M $^{-1}$  s $^{-1}$  o  $10^7$  M $^{-1}$  s $^{-1}$ .

La descripción también describe anticuerpos que inhiben de forma competitiva la unión de un anticuerpo con un epítipo como se determina por cualquier método conocido en la técnica para determinar unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos descritos en la presente memoria. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión al epítipo en al menos 95%, al menos 90%, al menos 85 %, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50%.

Los anticuerpos de la presente invención pueden actuar como antagonistas de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se describen anticuerpos que interrumpen las interacciones receptor/ligando con los polipéptidos descritos en la presente memoria parcial o completamente. Preferiblemente, los anticuerpos se unen a un epítipo antigénico descrito en la presente memoria o una parte del mismo. La descripción presenta anticuerpos específicos de receptor y anticuerpos específicos de ligando. La descripción también presenta anticuerpos específicos de receptor que no evitan la unión del ligando sino que evitan la activación del receptor. La activación del receptor (es decir, señalización) puede determinarse por técnicas descritas en la presente memoria o conocidas de

otro modo en la materia. Por ejemplo, la activación del receptor puede determinarse por detección de la fosforilación (por ejemplo, tirosina o serina/treonina) del receptor o su sustrato por inmunoprecipitación seguida de análisis de transferencia de Western. (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente). En realizaciones específicas, se proporcionan anticuerpos que inhiben la actividad del ligando o la actividad del receptor en al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50% de la actividad en ausencia del anticuerpo.

La descripción también presenta anticuerpos específicos de receptor que evitan la unión a ligando y la activación del receptor así como anticuerpos que reconocen el complejo de receptor-ligando y, preferiblemente, no reconocen específicamente el receptor no unido o el ligando no unido. De forma similar, se incluyen en la descripción anticuerpos neutralizadores que se unen al ligando y evitan la unión del ligando con el receptor, así como anticuerpos que se unen al ligando, evitando de este modo la activación del receptor, pero que no evitan que el ligando se una al receptor. Los anticuerpos pueden actuar como agonistas del receptor, es decir, potencian o activan todas o un conjunto de las actividades biológicas de la activación del receptor mediada por ligando, por ejemplo, induciendo dimerización del receptor. Los anticuerpos pueden especificarse como agonistas, antagonistas o agonistas inversos para actividades biológicas que comprenden las actividades biológicas específicas de los péptidos descritos en la presente memoria. Los agonistas de anticuerpo anteriores pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, publicación de PCT WO 96/40281; Patente de Estados Unidos Nº 5.811.097; Deng *et al.*, Blood 92(6): 1981-1988 (1998); Chen *et al.*, Cancer Res. 58(16): 3668-3678 (1998); Harrop *et al.*, J. Immunol. 161(4): 1786-1794 (1998); Zhu *et al.*, Cancer Res. 58(15): 3209-3214 (1998); Yoon *et al.*, J. Immunol. 160(7): 3170-3179 (1998); Prat *et al.*, J. Cell. Sci. 111(Pt2): 237-247 (1998); Pitard *et al.*, J. Immunol. Methods 205(2): 177-190 (1997); Liautard *et al.*, Cytokine 9(4): 233-241 (1997); Carlson *et al.*, J. Biol. Chem. 272(17): 11295-11301 (1997); Taryman *et al.*, Neuron 14(4): 755-762 (1995); Muller *et al.*, Structure 6(9): 1153-1167 (1998); Bartunek *et al.*, Cytokine 8(1): 14-20 (1996).

Los anticuerpos de la invención que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden comprender un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las cadenas pesadas expresadas por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o una cualquiera de las cadenas ligeras expresadas por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos de la presente invención que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden comprender un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios VH de una cadena pesada expresada por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o uno cualquiera de los dominios VL de una cadena ligera expresada por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y dominio VL expresado por una línea celular sencilla que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y un dominio VL expresados por dos líneas celulares diferentes que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los dominios VH y/o VL expresados por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que se unen inmuno-específicamente a un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también están abarcados por la invención, como lo están moléculas de ácido nucleico que codifican estos dominios VH y VL, moléculas y/o fragmentos.

Se describen anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un polipéptido o variante o fragmento polipeptídico de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dichos anticuerpos, o como alternativa consistiendo en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las CDR de VH contenidas en una cadena pesada expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). En particular, los anticuerpos de la presente invención que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden comprender, o como alternativa consistir en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH contenida en una cadena pesada expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VH contenida en una cadena pesada expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR de VH contenida en una cadena pesada expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). También se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos, que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o variante de los mismos, así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, moléculas, fragmentos y/o variantes.

Los anticuerpos de la presente invención que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden comprender, o como alternativa consistir en, un polipéptido que tiene una secuencia de

aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las CDR de VL contenidas en una cadena ligera expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). En particular, los anticuerpos de la presente invención que se unen inmunoespecíficamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden comprender, o como alternativa consistir en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL contenida en una cadena ligera expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos de la presente invención que se unen inmunoespecíficamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden comprender, o como alternativa consistir en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VL contenida en una cadena ligera expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden comprender, o como alternativa consistir en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR de VL contenida en una cadena ligera expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). También se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, estos anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos, que se unen inmunoespecíficamente con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o variante de los mismos, así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, moléculas, fragmentos y/o variantes.

Los anticuerpos de la presente invención (incluyendo moléculas que pueden comprender, o como alternativa consistir en, fragmentos de anticuerpo) que se unen inmunoespecíficamente con un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmento polipeptídico o variante de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dichos anticuerpos, o como alternativa consistiendo en, uno, dos, tres o más CDR de VH y una, dos, tres o más CDR de VL, como están contenidas en una cadena pesada o cadena ligera expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de la invención. En particular, los anticuerpos de la presente invención que se unen inmunoespecíficamente con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden comprender, o como alternativa consistir en, una CDR1 de VH y una CDR1 de VL, una CDR1 de VH y una CDR2 de VL, una CDR1 de VH y una CDR3 de VL, una CDR2 de VH y una CDR1 de VL, una CDR2 de VH y CDR2 de VL, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL, una CDR3 de VH y una CDR1 de VH, una CDR3 de VH una CDR2 de VL, una CDR3 de VH y una CDR3 de VL o cualquier combinación de las mismas, de las CDR de VH y CDR de VL contenidas en una cadena ligera o cadena ligera expresada por una o más líneas celulares que expresan anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Una o más de estas combinaciones son de una línea celular única que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). También se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de estos anticuerpos, que se unen inmunoespecíficamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, moléculas, fragmentos o variantes.

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico, generalmente aisladas, que codifican un anticuerpo de la invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo del mismo). En una realización específica, una molécula de ácido nucleico de la invención codifica un anticuerpo (incluyendo moléculas que comprenden o como alternativa que consisten en fragmentos de anticuerpo o variantes del mismo), que comprenden, o como alternativa que consisten en, un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios VH de una cadena pesada expresada por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de la invención y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera expresada por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de la invención. En otra realización, una molécula de ácido nucleico de la invención codifica un anticuerpo (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes del mismo), que comprende, o como alternativa que consisten en, un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios VH de una cadena pesada expresada por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de la invención o un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera expresada por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Se describen anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, variantes (incluyendo derivados) de las moléculas del anticuerpo (por ejemplo, los dominios VH y/o dominios VL) descritos en la presente memoria, uniéndose dichos anticuerpos inmunoespecíficamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmento o variante del mismo. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de la invención, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR que da como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos en relación con el dominio VH de referencia, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, dominio VL, VLCDR1, VLCDR2, o VLCDR3. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el resto aminoácido se reemplaza con un resto aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Se han definido en la técnica familias de

restos aminoacídicos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden explorarse con respecto a actividad biológica para identificar mutantes que conservan actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un Receptor de Quimiocina de proteína G).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solamente en regiones flanqueantes o solamente en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones de sentido erróneo silenciosas o neutras, es decir, que tienen poco o ningún efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Este tipo de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Como alternativa, las mutaciones de sentido erróneo no neutras pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno. La localización de la mayoría de las mutaciones de sentido erróneo silenciosas y neutras está probablemente en las regiones flanqueantes, mientras que la localización de la mayoría de las mutaciones de sentido erróneo no neutras está probablemente en CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la materia sería capaz de diseñar y ensayar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como no alteración en la actividad de unión a antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en actividad de unión a antígeno o cambio en especificidad de anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse rutinariamente y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, capacidad para unirse inmunoespecíficamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G) puede determinarse usando técnicas descritas en la presente memoria o mediante técnicas de modificación rutinarias conocidas en la materia.

Un anticuerpo (incluyendo una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo), que se une inmunoespecíficamente con polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes de los mismos, comprende, o como alternativa consiste en, una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la que codifica uno de los dominios VH o VL expresados por la línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de la invención, en condiciones rigurosas, por ejemplo, hibridación con ADN unido a filtro en citrato sódico/cloruro sódico 6X (SSC) a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en SSC 0,2x/SDS 0,1% a aproximadamente 50-65°C, en condiciones altamente rigurosas, por ejemplo, hibridación con ácido nucleico unido a filtro en SSC 6x a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en SSC 0,1x/SDS 0,2% a aproximadamente 68°C o en otras condiciones de hibridación rigurosas que se conocen para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. *et al.*, eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3). También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos.

Se conoce bien dentro de la técnica que los polipéptidos, o fragmentos o variantes de los mismos, con secuencias de aminoácidos similares con frecuencia tienen estructura similar y muchas de las mismas actividades biológicas. Un anticuerpo (incluyendo una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo), que se une inmunoespecíficamente con un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G o fragmentos o variantes de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G, comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica, a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de una cadena pesada expresada por una línea celular que expresa un anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Un anticuerpo (incluyendo una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo), que se une inmunoespecíficamente con un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un dominio VL de una cadena ligera expresada por una línea celular que expresa anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Los anticuerpos de la invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo), pueden tener una o más de las mismas características biológicas que uno o más de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Por "características biológicas" se entiende las actividades *in vitro* o *in vivo* o propiedades de los anticuerpos, tales como, por ejemplo, la capacidad de unirse a Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) expresado en una superficie celular,

Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluido en membrana y/o un fragmento o variante del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)); la capacidad de inhibir sustancialmente o suprimir la unión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con un ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, MIP1-beta, véase, por ejemplo, Ejemplo 61); la capacidad de regular de forma negativa la expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en la superficie de células; la capacidad de inhibir o suprimir la actividad biológica mediada por Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, unión de VIH con, infección (entrada/fusión), y/o replicación en células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (véase, por ejemplo, Ejemplo 60), la capacidad de inhibir o suprimir la quimiotaxis inducida por MIP1-beta de células mononucleares de sangre periférica PBMC (u otras células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)) o la capacidad de inducir un flujo de calcio intracelular en células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (véase, por ejemplo, Ejemplo 63). Opcionalmente, los anticuerpos de la invención pueden unirse al mismo epítipo como al menos uno de los anticuerpos específicamente indicados en la presente memoria. Tal unión de epítipo puede determinarse rutinariamente usando ensayos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo), pueden neutralizar el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pudiendo dichos anticuerpos comprender, o como alternativa consistir en, una parte (por ejemplo, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y/o VL CDR3) de un dominio VH o VL de un anticuerpo de la invención. Un anticuerpo que "neutraliza el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento o variante del mismo" es, por ejemplo, un anticuerpo que disminuye o suprime la capacidad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento o variante del mismo para unirse con su ligando (por ejemplo, VIH y MIP1-beta); que disminuye o suprime la quimiotaxis inducida por MIP1-beta de PBMC u otra célula que expresa CCR5; y/o que suprime o inhibe la cascada de señalización del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, flujo de calcio iniciado por un Receptor de Quimiocina de proteína G activado (CCR5), véase, por ejemplo, Ejemplo 63). En una realización, un anticuerpo que neutraliza el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención y un dominio VL de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización, un anticuerpo que neutraliza el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo sencillo (o fragmento scFv o Fab) o fragmentos del mismo de la invención. En una realización, un anticuerpo que neutraliza el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización, un anticuerpo que neutraliza el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VL de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización, un anticuerpo que neutraliza el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento del mismo comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio CDR de VH de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En una realización preferida, un anticuerpo que neutraliza el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento del mismo comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización, un anticuerpo que neutraliza el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento del mismo comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR de VL de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización preferida, un anticuerpo que neutraliza el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento del mismo comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos.

Los anticuerpos de la presente invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo), pueden reducir o suprimir la capacidad de los virus de VIH, particularmente los que utilizan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como un correceptor, para unirse a, infectar (entrar en/fusionarse con) y/o replicar en células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), según se determina por cualquier método conocido en la técnica tales como, por ejemplo, los ensayos descritos en el Ejemplo 60. Dichos anticuerpos pueden comprender, o como alternativa consistir en, una parte (por ejemplo, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, o VL CDR3) de un dominio VH o VL que tiene una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En una realización, un anticuerpo que reduce o suprime la capacidad de los virus VIH, particularmente los que utilizan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como un correceptor, para unirse, infectar (entrar en/fusionarse con) y/o replicar en células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio de VH de un anticuerpo, o un fragmento del mismo de la invención y un dominio VL de un anticuerpo, o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización, un anticuerpo que reduce o suprime la capacidad de los virus VIH, particularmente los que utilizan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como un correceptor, para unirse, infectar (entrar en/fusionarse con) y/o replicar en células que expresan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo sencillo (o fragmento scFv o Fab) o fragmentos del mismo de la invención. En una realización, un anticuerpo que reduce o suprime la capacidad de los

virus VIH, particularmente los que utilizan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como un correceptor para unirse, infectar (entrar en/fusionarse con) y/o replicar en células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización, un anticuerpo que reduce o suprime la capacidad de los virus VIH, particularmente los que utilizan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como un correceptor, para unirse, infectar (entrar en/fusionarse con) y/o replicar en células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VL de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En una realización preferida un anticuerpo que reduce o suprime la capacidad de los virus VIH, particularmente los que utilizan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como un correceptor, para unirse a, infectar (entrar en/fusionarse con) y/o replicar en células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización preferida, un anticuerpo que reduce o suprime la capacidad de los virus VIH, particularmente los que utilizan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como un correceptor, para unirse, infectar (entrar en/fusionarse con) y/o replicar en células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos también están abarcadas por la invención.

Los anticuerpos de la presente invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo del mismo), pueden inhibir o suprimir la quimiotaxis inducida por MIP1-beta de células mononucleares de sangre periférica PBMC u otras células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como se determina por cualquier método conocido en la técnica tal como, por ejemplo los ensayos descritos en el Ejemplo 62. Dichos anticuerpos pueden comprender, o como alternativa consistir en, una parte (por ejemplo, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, o VL CDR3) de un dominio VH o VL que tiene una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En una realización, un anticuerpo que inhibe o suprime quimiotaxis inducida por MIP1-beta de células mononucleares de sangre periférica PBMC u otras células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo, o un fragmento del mismo de la invención y un dominio VL de un anticuerpo, o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización, un anticuerpo que inhibe o suprime la quimiotaxis inducida por MIP1-beta de células mononucleares de sangre periférica PBMC u otras células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo sencillo (o fragmento scFv o Fab) o fragmentos del mismo de la invención. En una realización, un anticuerpo que inhibe o suprime la quimiotaxis inducida por MIP1-beta de células mononucleares de sangre periférica PBMC u otras células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización, un anticuerpo que inhibe o suprime la quimiotaxis inducida por MIP1-beta de células mononucleares de sangre periférica PBMC u otras células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VL de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En una realización preferida, un anticuerpo que inhibe o suprime quimiotaxis inducida por MIP1-beta de células mononucleares de sangre periférica PBMC u otras células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. En otra realización preferida, un anticuerpo que inhibe o suprime quimiotaxis inducida por MIP1-beta de células mononucleares de sangre periférica PBMC u otras células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL de un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos también están abarcadas por la invención.

La presente descripción también proporciona anticuerpos (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos), que regulan negativamente la expresión en superficie celular de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), según se determina por cualquier método conocido en la técnica tal como, por ejemplo, análisis de FACS/los ensayos descritos en los Ejemplos 61 ó 63. Como una hipótesis no limitante, tal regulación negativa puede ser el resultado de internalización inducida por anticuerpo del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Dichos anticuerpos pueden comprender, o como alternativa consistir en, una parte (por ejemplo, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y/o VL CDR3) de un dominio VH o VL que tiene una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En una realización, un anticuerpo que regula negativamente la expresión en superficie celular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo y un dominio VL de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En otra realización, un anticuerpo que regula negativamente la expresión de superficie celular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo sencillo (o

fragmento scFv o Fab) o fragmentos del mismo de la invención. En una realización, un anticuerpo que regula negativamente la expresión de superficie celular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En otra realización, un anticuerpo que regula negativamente la expresión en superficie celular de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VL de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En una realización preferida, un anticuerpo que regula negativamente la expresión en superficie celular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En otra realización preferida, un anticuerpo que regula negativamente la expresión en superficie celular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos.

También se describen anticuerpos (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos), que mejoran la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dichos anticuerpos, o como alternativa consistiendo en, una parte (por ejemplo, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, o VL CDR3) de un dominio VH o VL de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. Como un ejemplo no limitante, un anticuerpo que "mejora la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento o variante del mismo" es un anticuerpo que aumenta la capacidad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para estimular la quimiotaxis de PBMC (u otras células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)) y/o estimular la cascada de señalización del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, para iniciar un flujo de calcio intracelular, véase Ejemplo 63). En una realización, un anticuerpo que mejora la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo y un dominio VL de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En otra realización, un anticuerpo que potencia la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo sencillo (o fragmento scFv o Fab) o fragmentos o variantes del mismo. En una realización, un anticuerpo que potencia la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento o variante del mismo, comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En otra realización, un anticuerpo que potencia la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), o un fragmento o variante del mismo, comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio VL de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En otra realización, un anticuerpo que potencia la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento o variante del mismo, comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio CDR de VH indicado en la Tabla 2 o un fragmento o variante del mismo. En una realización preferida, un anticuerpo que potencia la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento o variante del mismo, comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En otra realización, un anticuerpo que potencia el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento o variante del mismo, comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio CDR de VL de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. En otra realización preferida, un anticuerpo que potencia la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento o variante del mismo, comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL de un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo. También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos.

Se describen proteínas de fusión que comprenden, o como alternativa que consisten en, un anticuerpo de la invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo del mismo), que se une inmunoespecíficamente con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y un polipéptido heterólogo. Preferiblemente, el polipéptido heterólogo con el que se fusiona el anticuerpo es útil para la función o es útil para dirigirse a células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), incluyendo, pero sin limitación, MIP-1-beta; un polipéptido de unión a CD4 tal como un anticuerpo anti-CD4, un polipéptido de unión a CXCR4 tal como factor derivado del estroma 1-alfa (SDF1-alfa); y/o una proteína de unión a CCR3, tal como MIP1-alfa). En una realización alternativa preferida, el polipéptido heterólogo con el que se fusiona el anticuerpo es útil para la función celular de linfocitos T, macrófagos y/o monocitos o es útil para dirigir el anticuerpo a un linfocito T, macrófago o monocito, incluyendo pero sin limitación, MIP-1-beta; un polipéptido de unión a CD4 tal como un anticuerpo anti-CD4; un polipéptido de unión a CXCR4 tal como factor derivado de estroma 1-alfa (SDF1-alfa); y/o una proteína de unión a CCR3, tal como MIP1-alfa). En una realización, una proteína de fusión comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno o más de los dominios VH de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios VL de un

- anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes del mismo y una secuencia polipeptídica heteróloga. En otra realización, una proteína de fusión comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las CDR de VH de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las CDR de VL de un anticuerpo de la invención, o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En una realización preferida, la proteína de fusión comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de un anticuerpo de la invención, o fragmento o variante del mismo, una secuencia polipeptídica heteróloga, cuya proteína de fusión se une inmuno-específicamente al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). En otra realización, una proteína de fusión comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos un dominio VH de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácidos de al menos un dominio VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes del mismo y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, los dominios VH y VL de la proteína de fusión corresponden a un anticuerpo sencillo (o fragmento scFv o Fab) de la invención. En otra realización más, una proteína de fusión de la invención comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las CDR de VH de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las CDR de VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las VHCDR o VLCDR corresponden a anticuerpo sencillo (o fragmento scFv o Fab) de la invención. También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión.
- Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, pero sin limitación, para purificar, detectar y dirigirse a los polipéptidos descritos en la presente memoria, incluyendo métodos de diagnóstico y terapéuticos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos tienen uso en inmunoensayos para medir de forma cuantitativa y cualitativa los niveles de los polipéptidos en muestras biológicas. Véase, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).
- Como otro ejemplo no limitante, los anticuerpos de la invención pueden administrarse a individuos como una forma de inmunización pasiva. Como alternativa, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para mapeo de epítopos para identificar el epítipo o los epítopos a los que se une el anticuerpo. Los epítopos identificados de esta manera pueden, a su vez, por ejemplo, usarse como candidatos a vacuna, es decir, para inmunizar un individuo para inducir anticuerpos contra las formas de origen natural del Receptor de Quimiocina de proteína G.
- Como se analiza en más detalle posteriormente, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse solos o en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos pueden fusionarse adicionalmente de forma recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo N o C terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse de forma recombinante con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptido heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véase, por ejemplo, publicaciones de PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente de Estados Unidos Nº 5.314.995; y documento EP 396.387.
- Los anticuerpos de la invención incluyen derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula con el anticuerpo. Por ejemplo, pero sin limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.
- Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos policlonales para un antígeno de interés pueden producirse por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede administrarse un polipéptido de CCR5 a diversos animales hospedadores incluyendo, sin limitación conejos, ratones, ratas, etc. para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, e incluir, pero sin limitación, adyuvante de Freund (completo o incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corinobacterium parvum*. Tales adyuvantes también se conocen bien en la técnica.
- Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en la materia incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación de fagos o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo las que se conocen en la materia y se enseñan, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere



a un anticuerpo que deriva de un clon único incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago y no el método por el que se produce.

Los métodos para producir y explorar con respecto a anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son rutinarios y se conocen bien en la técnica y se analizan en detalle en los Ejemplos. En un ejemplo no limitante, pueden inmunizarse ratones con un polipéptido descrito en la presente memoria o una célula que expresa tal péptido. Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero de ratón, el bazo de ratón se recolecta y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea celular SP20 o P3X63-AG8.653 disponibles de la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitada. Los clones de hibridoma se ensayan después por métodos conocidos en la técnica con respecto a células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido descrito en la presente memoria. Puede generarse fluido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, mediante inmunización de ratones con clones de hibridoma positivos.

En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en el que, preferiblemente, el hibridoma se genera por fusión de esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno con células de mieloma y explorando después los hibridomas resultantes de la fusión con respecto a clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido descrito en la presente memoria.

Otro método bien conocido para producir líneas celulares policlonales y monoclonales de linfocitos B humanos es la transformación usando Virus de Epstein Barr (VEB). Se conocen habitualmente en la técnica protocolos para generar líneas celulares de linfocitos B transformados con VEB, tales como, por ejemplo, el protocolo descrito en el Capítulo 7.22 de *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Eds., 1994, John Wiley y Sons, NY, que se incorpora por la presente en su totalidad por referencia en la presente memoria. La fuente de linfocitos B para transformación es habitualmente sangre periférica humana, pero también pueden derivar linfocitos B para transformación de otras fuentes incluyendo, sin limitación, ganglios linfáticos, amígdala, bazo, tejido tumoral y tejidos infectados. Los tejidos generalmente se convierten en suspensiones de células sencillas antes de transformación con VEB. Adicionalmente, pueden realizarse etapas para retirar o inactivar físicamente los linfocitos T (por ejemplo, por tratamiento con ciclosporina A) en muestras que contienen linfocitos B, debido a que los linfocitos T de individuos seropositivos para anticuerpos anti VEB pueden suprimir la inmortalización de linfocitos B mediante VEB. En general, la muestra que contiene linfocitos B humanos se inocula con VEB y se cultiva durante 3-4 semanas. Una típica fuente de VEB es el sobrenadante de cultivo de la línea celular B95-8 (ATCC N° VR-1492). Pueden verse generalmente señales físicas de transformación con VEB hacia el final del periodo de cultivo de 3-4 semanas. Por microscopía de contraste de fases, las células transformadas pueden aparecer grandes, transparentes, pilosas y tienden a agregarse en grupos estrechos de células. Inicialmente, las líneas de VEB son generalmente policlonales. Sin embargo, a lo largo de periodos prolongados de cultivo celular, las líneas de VEB pueden hacerse monoclonales, policlonales como resultado del crecimiento selectivo de clones de linfocitos B particulares. Como alternativa, las líneas transformadas con VEB policlonales pueden subclonarse (por ejemplo, limitando el cultivo de dilución) o fusionarse con un compañero de fusión adecuado y sembrarse en placas a una dilución limitante para obtener líneas de linfocitos B monoclonales. Los compañeros de fusión adecuados para líneas celulares transformadas con VEB incluyen líneas celulares de mieloma de ratón (por ejemplo, SP2/0, X63-Ag8.653), líneas celulares de heteromioma (humano x ratón; por ejemplo, SPAM-8, SBC-H20 y CB-F7) y líneas celulares humanas (por ejemplo, GM 1500, SKO-007, RPMI 8226 y KR-4). De este modo, se describe un método para generar anticuerpos humanos policlonales o monoclonales contra polipéptidos descritos en la presente memoria o fragmentos de los mismos, que comprenden transformación con VEB de linfocitos B humanos.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> de la invención por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos de Fab) o pepsina (para producir fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>). Los fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación de fagos, los dominios de anticuerpo funcionales se presentan en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En una realización particular, un fago tal puede utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos es típicamente un fago filamentoso que incluye dominios de unión fd y M134 expresados del fago con dominios de anticuerpo Fv estabilizados con disulfuro, Fab, o Fv fusionados de forma recombinante con el gen de fago III o la proteína del gen VIII. Los ejemplos de métodos de presentación de fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough *et al.*,

Eur. J. Immunol. 24: 952-958 (1994); Persic *et al.*, Gene 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, Advances in Immunology 57: 191-280 (1994); solicitud de PCT N° PCT/GB91/01134; publicaciones de PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones codificantes del anticuerpo del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado y expresarse en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle posteriormente. Por ejemplo, las técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> también pueden emplearse usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación de PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.*, BioTechniques 12(6): 864-869 (1992); y Sawai *et al.*, AJRI 34: 26-34 (1995); y Better *et al.*, Science 240: 1041-1043 (1988).

Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir anticuerpos y Fv de cadena sencilla incluyen las descritas en las Patentes de Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, Methods in Enzymology 203: 46-88 (1991); Shu *et al.*, PNAS 90: 7995-7999 (1993); y Skerra *et al.*, Science 240: 1038-1040 (1988). Para algunos usos, incluyendo uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4: 214 (1986); Gillies *et al.*, (1989) J. Immunol. Methods 125: 191-202; Patentes de Estados Unidos N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especie no humanas que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región flanqueante de una molécula de inmunoglobulina humana. Con frecuencia, los restos flanqueantes en las regiones flanqueantes humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones flanqueantes se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelización de las interacciones de la CDR y los restos flanqueantes para identificar restos flanqueantes importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencia para identificar restos flanqueantes inusuales en posiciones particulares (Véase, por ejemplo, Queen *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.585.089; Riechmann *et al.*, Nature 332: 323 (1988)). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una diversidad de técnicas conocidas en la materia incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación de PCT WO 91/09967; Patentes de Estados Unidos N° 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o resurgimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka *et al.*, Protein Engineering 7(6): 805-814 (1994); Roguska *et al.*, PNAS 91: 969-973 (1994)) y redistribución de cadena (Patente de Estados Unidos N° 5.565.332).

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación de fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también, Patentes de Estados Unidos N° 4.444.887 y 4.716.111; y publicaciones de PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina humana de cadena pesada y ligera pueden introducirse de forma aleatoria o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable, región constante y región de diversidad humanas pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanos. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden hacerse no funcionales de forma separada o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección de homocigotos de la región JH evita la producción de anticuerpo endógeno. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían después para producir descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, toda o una parte de un polipéptido descrito en la presente memoria. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse de los ratones inmunizados transgénicos usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana portados por los ratones transgénicos se redistribuyen durante la diferenciación de linfocitos B y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. De este modo, usando una técnica tal, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una revisión de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, publicaciones de PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO

96/34096; WO 96/33735; Patente Europea Nº 0 598 877; Patentes de Estados Unidos Nº 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; 5.939.598; 6.075.181; y 6.114.598. Además, puede contactarse con compañías tales como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y Genpharm (San Jose, CA) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse usando una técnica denominada "selección guiada" en este enfoque un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón se usa, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers *et al.*, Bio/technology 12: 899-903 (1988)).

Además, los anticuerpos para los polipéptidos descritos en la presente memoria, pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos anti-idiotípicos que "imitan" a los polipéptidos descritos en la presente memoria usando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia (Véase, por ejemplo, Greenspan y Bona, FASEB J. 7(5): 437-444; (1989) y Nissinoff, J. Immunol. 147(8): 2429-2438 (1991)). Por ejemplo, los anticuerpos que se unen e inhiben competitivamente la multimerización de polipéptidos y/o unión de un polipéptido de CCR5 con un ligando pueden usarse para generar anti-idiotipos que "imitan" la multimerización de polipéptidos y/o unión de dominio y, como consecuencia, se unen y neutralizan el polipéptido y/o su ligando. Dichos anti-idiotipos de neutralización o fragmentos Fab de tales anti-idiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando del polipéptido. Por ejemplo, tales anticuerpos anti-idiotípicos pueden usarse para unirse a un polipéptido descrito en la presente memoria y/o para unirse a sus ligandos/receptores y de este modo activar o bloquear su actividad biológica.

Los intracuerpos son anticuerpos, con frecuencia scFv, que se expresan de una molécula de ácido nucleico recombinante y se modifican por ingeniería genética para conservarse intracelularmente (por ejemplo, conservarse en el citoplasma, retículo endoplasmático o periplasma). Los intracuerpos pueden usarse, por ejemplo, para suprimir la función de una proteína a la que se une el intracuerpo. La expresión de intracuerpos también puede regularse a través del uso de promotores inducibles en el vector de expresión de ácido nucleico que comprende el intracuerpo. Los intracuerpos de la invención pueden producirse usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos y revisados en Chen *et al.*, Hum. Gene Ther. 5: 595-601 (1994); Marasco, W.A., Gene Ther. 4: 11-15 (1997); Rondon y Marasco, Annu. Rev. Microbiol. 51: 257-283 (1997); Proba *et al.*, J. Mol. Biol. 275: 245-253 (1998); Cohen *et al.*, Oncogene 17: 2445-2456 (1998); Ohage y Steipe, J. Mol. Biol. 291: 1119-1128 (1999); Ohage *et al.*, J. Mol. Biol. 291: 1129-1134 (1999); Wirtz y Steipe, Protein Sci. 8: 2245-2250 (1999); Zhu *et al.*, J. Immunol. Methods 231: 207-222 (1999); y referencias citadas en las mismas. En particular, se ha producido un intracuerpo de CCR5 por Steinberger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 805-810 (2000).

### **Tecnología XenoMouse**

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se preparan preferentemente mediante la utilización de un ratón transgénico que tiene una parte sustancial del genoma productor de anticuerpo humano insertado pero que se hace deficiente en la producción de anticuerpos endógenos murinos (por ejemplo, cepas de XenoMouse disponibles de Abgenix Inc., Fremont, CA). Tales ratones, por lo tanto, son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos y son deficientes en la producción de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos. Las tecnologías utilizadas para conseguir lo mismo se describen en las patentes, solicitudes y referencias descritas en la presente memoria.

La capacidad para clonar y reconstruir loci humanos de tamaños de megabases en YAC e introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un enfoque potente para elucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o mapeados de forma rudimentaria así como generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de dicha tecnología para la sustitución de loci de ratón con sus equivalentes humanos podría proporcionar información única sobre la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su implicación en inducción y progresión de la enfermedad.

Una aplicación práctica importante de una estrategia tal es la "humanización" del sistema inmune humoral de ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que los genes Ig endógenos se han inactivado ofrecen la oportunidad de estudiar los mecanismos que subyacen la expresión programada y ensamblaje de anticuerpos así como su papel en el desarrollo de linfocitos B. Además, dicha estrategia podría proporcionar una fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales (Mab) completamente humanos un hito importante para completar el objetivo de la terapia de anticuerpos en enfermedad humana.

Se espera que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas de anticuerpos monoclonales de ratón o derivatizados de ratón y aumenten de este modo la eficacia y seguridad de los anticuerpos administrados. Puede esperarse que el uso de anticuerpos completamente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades crónicas y recurrentes humanas, tales como cáncer, que requieren administraciones repetidas de anticuerpos.

Un enfoque hacia este objetivo fue modificar por ingeniería genética cepas de ratón deficientes en producción de

anticuerpo de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humanos anticipando que tales ratones producirían un gran repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los fragmentos de Ig humanos grandes preservarían la amplia diversidad génica variable así como la regulación apropiada de la producción y expresión de anticuerpos. Mediante la explotación de la maquinaria del ratón para diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica ante proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón produciría anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Usando la tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse fácilmente anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada.

Esta estrategia general se demostró en relación con la generación de las primeras cepas de XenoMouse™ como se publicó en 1994. Véase Green *et al.* Nature Genetics 7: 13-21 (1994). Las cepas de XenoMouse™ se obtuvieron por ingeniería genética con cromosomas artificiales de levadura (YACS) que contenían fragmentos de configuración de la línea germinal de un tamaño de 245 kb y 190 kb del locus de cadena pesada humano y el locus de cadena ligera kappa, respectivamente, que contenían secuencias de región variable y constante principales. Igual que en la referencia anterior. Los YAC que contienen Ig humana demostraron ser compatibles con el sistema de ratón para redistribución y expresión de anticuerpos y fueron capaces de sustituir los genes de Ig de ratón inactivados. Esto se demostró por su capacidad para inducir desarrollo de linfocitos B, producir un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y generar anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno. Estos resultados sugirieron también que la introducción de partes más grandes de los loci de Ig humanos que contenían gran variedad de genes V, elementos reguladores adicionales y regiones constantes de Ig humana podrían recapitular sustancialmente el repertorio completo que es característico de la respuesta humoral humana para infección e inmunización. El trabajo de Green *et al.* se amplió recientemente a la introducción de más de aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humano a través de la introducción de fragmentos de YAC de configuración de línea germinal de tamaño de megabases de los loci de cadena pesada humana y loci de cadena ligera kappa, respectivamente, para producir ratones XenoMouse™. Véase Mendez *et al.* Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits J Exp. Med. 188: 483-495 (1998), Green, Journal of Immunological Methods 231: 11-23 (1999) y Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996.

Tal enfoque se analiza adicionalmente y se describe en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 07/466,008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/710.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de julio de 1992, 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430.938, presentada el 27 de abril de 1995, 0-8/464.584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/471.191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de junio de 1995, 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996 y 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996. Véase también Mendez *et al.* Nature Genetics 15: 146-156 (1997) y Green y Jakobovits J Exp. Med. 188: 483-495 (1998). Véase también la Patente Europea Nº EP 0 471 151 B1, concesión publicada el 12 de junio de 1996, Solicitud de Patente Internacional Nº WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, Solicitud de Patente Internacional Nº WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996 y WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998.

Las respuestas de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) han hecho a la industria preparar anticuerpos quiméricos o humanizados de otro modo. Aunque los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murina, se espera que se observen ciertas respuestas de anticuerpo anti-quimérico humano (HACA), particularmente en utilizaciones multidosas o crónicas del anticuerpo. De este modo, sería deseable proporcionar anticuerpos completamente humanos contra polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para disipar preocupaciones y/o efectos de las respuestas de HAMA o HACA.

Se prepararon anticuerpos monoclonales específicos para polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) usando tecnología de hibridoma. (Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975); Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976); Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6: 292 (1976); Hammerling *et al.*, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N. Y., págs. 571-681 (1981)). Brevemente, se humanizaron ratones XenoMouse™ con células transfectadas con un vector de expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (para detalles, véase Ejemplo 54). Después de la inmunización, los esplenocitos de tales ratones se extrajeron y se fusionaron con una línea celular de mieloma adecuada. Cualquier línea celular de mieloma adecuada puede emplearse de acuerdo con la presente invención; sin embargo, es preferible emplear la línea celular de mieloma parental (P3X63-AG8.653), disponible de la ATCC. Después de la fusión, las células de hibridoma resultantes se mantienen de forma selectiva en medio HAT y después se clonan por dilución limitante como se describe en Wands *et al.* (Gastroenterology 80: 225-232 (1981)). Las células de hibridoma obtenidas a través de una selección tal se ensayan después para identificar clones que secretan anticuerpos capaces de unirse a los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

La presente invención se refiere a anticuerpos completamente humanos, como se define en las reivindicaciones que se unen inmunoespecíficamente a polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Esencialmente, se inmunizaron líneas de ratón XenoMouse de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) que expresaban anticuerpos humanos

con células que expresaban Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (para detalles de protocolos de inmunización, véase el Ejemplo 54); se recuperaron células de ganglios linfáticos y/o bazo (que contenían linfocitos B) del ratón que tenía alta titulación de anticuerpos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5); y dichas células recuperadas se fusionaron con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales. Las líneas células de hibridoma se exploraron para seleccionar e identificar líneas celulares de hibridoma que producían anticuerpos específicos para el inmunógeno. Los inventores utilizaron estas técnicas para la preparación de anticuerpos específicos de polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). En la presente memoria, los inventores describen la producción de líneas celulares de hibridoma múltiples que producen anticuerpos específicos para el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Además, los inventores proporcionan una caracterización de los anticuerpos producidos por tales líneas celulares.

Los anticuerpos derivados de líneas celulares de hibridoma analizados en la presente memoria se enumeran en la Tabla 2. Los anticuerpos incluyen anticuerpos expresados por las siguientes líneas celulares: XF11.1D8, XF11.4D10, XF11.4C4, XF11.5H1, XF11.1G8, XF22.3C9.6, XF22.9E6, XF27/28.7D5, XF27/28.18B5, XF27/28.25G10, XF27/28.36A12, XF27/28.36F11 y XF27/28.55G4. El anticuerpo de la invención se expresa por la línea celular XF27/28.43E2. Las cepas de de ratón XenoMouse de Abgenix, Inc. expresan cadenas ligeras kappa humanas con IgG1, IgG2 o IgG4 humana. Cada una de las cepas de XenoMouse también pueden producir anticuerpos del isotipo IgM humano. La cepa que expresa IgG2 se usó para preparar las líneas celulares y anticuerpos de la presente invención, de este modo cada uno de los anticuerpos producido por líneas celulares son cadenas pesadas de IgG2 completamente humanas con cadenas ligeras kappa humanas o cadenas pesadas de IgM con cadenas ligeras kappa humanas. Estas líneas celulares de hibridoma se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") en la fecha indicada en la Tabla 2 y recibieron los números de Depósito de ATCC enumerados en la Tabla 2. La ATCC está localizada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos. El depósito de la ATCC se hizo de acuerdo con los términos del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines de patente.

El hibridoma XF11.1D8 se depositó en la ATCC el 7 de febrero de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3030. El hibridoma XF11.4D10 se depositó en la ATCC el 7 de febrero de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3026. El hibridoma XF11.4C4 se depositó en la ATCC el 7 de febrero de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3028. El hibridoma XF11.5H1 se depositó en la ATCC el 7 de febrero de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3029. El hibridoma XF11.1G8 se depositó en la ATCC el 7 de febrero de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3027. El hibridoma XF3.5F1 se depositó en la ATCC el 2 de marzo de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3147. El hibridoma XF11.1F8 se depositó en la ATCC el 2 de marzo de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3150. El hibridoma XF3.6A2 se depositó en la ATCC el 21 de marzo de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3148. El hibridoma XF3.10B8 se depositó en la ATCC el 2 de marzo de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3151. El hibridoma XF22.3C9.6 se depositó en la ATCC el 12 de septiembre de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3702. El hibridoma XF22.9E6 se depositó en la ATCC el 14 de noviembre de 2001 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-3859. El hibridoma XF27/28.7D5 se depositó en la ATCC el 1 de febrero de 2002 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-4049. El hibridoma XF27/28.18B5 se depositó en la ATCC el 1 de febrero de 2002 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-4050. El hibridoma XF27/28.25G10 se depositó en la ATCC el 1 de febrero de 2002 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-4051. El hibridoma XF27/28.36A12 se depositó en la ATCC el 1 de febrero de 2002 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-4052. El hibridoma XF27/28.36F11 se depositó en la ATCC el 1 de febrero de 2002 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-4053. El hibridoma XF27/28.43E2 se depositó en la ATCC el 1 de febrero de 2002 y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-4054. El hibridoma XF27/28.55G4 se depositó en la ATCC y recibió el Número de Depósito de ATCC PTA-. Los Números de Depósito de ATCC y las asignaciones de hibridoma también se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2: Líneas Celulares de Hibridoma que Expresan Anticuerpos Receptores anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

Hibridoma	Número de Depósito de ATCC	Fecha de Depósito en ATCC
XF11.1D8	PTA-3030	7 de febrero de 2001
XF11.4D10	PTA-3026	7 de febrero de 2001
XF11.4C4	PTA-3028	7 de febrero de 2001
XF11.5H1	PTA-3029	7 de febrero de 2001
XF11.1G8	PTA-3027	7 de febrero de 2001
XF3.5F1	PTA-3147	2 de marzo de 2001

Hibridoma		Número de Depósito de ATCC	Fecha de Depósito en ATCC
XF11.1F8		PTA-3150	2 de marzo de 2001
XF3.6A2		PTA-3148	2 de marzo de 2001
XF3.10B8		PTA-3151	2 de marzo de 2001
XF22.3C9.6		PTA-3702	12 de septiembre de 2001
XF22.9E6		PTA-3859	14 de noviembre de 2001
XF27/28.7D5		PTA-4049	1 de febrero de 2002
XF27/28.18B5		PTA-4050	1 de febrero de 2002
XF27/28.25G10		PTA-4051	1 de febrero de 2002
XF27/28.36A12		PTA-4052	1 de febrero de 2002
XF27/28.36F11		PTA-4053	1 de febrero de 2002
XF27/28.43E2		PTA-4054	1 de febrero de 2002
XF27/28.55G4			

En una realización, la presente invención proporciona líneas celulares de hibridoma que expresan el anticuerpo de la invención tales como XF27/28.43E2. Otras líneas celulares de hibridomas son XF11.1D8, XF11.4D10, XF11.4C4, XF11.5H1, XF11.1G8, XF3.5F1, XF11.1F8, XF3.6A2, XF3.10B8, XF22.3C9.6, XF22.9E6, XF27/28.7D5, XF27/28.18B5, XF27/28.25G10, XF27/28.36A12 y XF27/28.36F11. La línea celular de hibridoma de la invención es XF27/28.43E2. Otra línea celular de hibridoma es XF27/28.55G4.

La presente invención abarca anticuerpos (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluye, pero sin limitación, el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de SEC ID N°: 2 o el polipéptido codificado por el ADN en el clon HDGMR10 contenido en el Depósito de ATCC 97183 depositado el 1 de junio de 1995; el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede producirse a través de expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de SEC ID N°: 2 o el ADN de HDGMR10 en el Número de Depósito de ATCC 97183).

En una realización de la presente invención, los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprenden un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas expresadas por la línea celular XF 27/28.43E2 indicada en la Tabla 2 y las cadenas ligeras expresadas por la línea celular XF 27/28.43E2 indicada en la Tabla 2. En otra realización de la presente invención, los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) comprenden un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los dominios VH de una cadena pesada expresada por la línea celular XF 27/28.43E2 indicada en la Tabla 2 y de los dominios VL de una cadena ligera expresada por la línea celular XF 27/28.43E2 indicada en la Tabla 2. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y dominio VL expresados por la línea celular XF 27/28.43E2 indicada en la Tabla 2. En realizaciones alternativas, los anticuerpos comprenden la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y un dominio VL de diferentes líneas celulares indicadas en la Tabla 2. También se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes de los dominios VH y/o VL expresados por al menos una de las líneas celulares indicadas en la Tabla 2 que se unen inmuno-específicamente a un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos dominios VH y VL, moléculas, fragmentos y/o variantes.

Se describen anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un polipéptido o fragmento polipeptídico o variante de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dichos anticuerpos, o como alternativa consistiendo en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las CDR de VH contenidas en una cadena pesada expresada por una o más líneas celulares indicadas en la Tabla 2. En particular, se describen anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), que comprende, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH contenida en una cadena pesada expresada por una o más líneas celulares indicadas en la Tabla 2. Los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tienen la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VH contenida en una cadena pesada expresada por una o más líneas

celulares indicadas en la Tabla 2. Los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprenden, o como alternativa consisten en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH contenida en una cadena pesada expresada por una o más líneas celulares indicadas en la Tabla 2. También se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos, que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o variante del mismo, así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, moléculas, fragmentos y/o variantes.

También se describen anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un polipéptido, o fragmento polipeptídico o variante de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dichos anticuerpos, o como alternativa consistiendo en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las CDR de VL contenidas en una cadena ligera expresada por una o más líneas celulares indicada en la Tabla 2. En particular, se describen anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL contenida en una cadena ligera expresada por una o más líneas celulares indicada en la Tabla 2. Los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tienen la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VL contenida en una cadena ligera expresada por una o más líneas celulares indicada en la Tabla 2. Los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL contenida en una cadena ligera expresada por una o más líneas celulares indicada en la Tabla 2. También se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, estos anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos, que se unen inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un fragmento del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o variante del mismo, así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, moléculas, fragmentos y/o variantes.

Los anticuerpos de la invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos) que se unen inmuno-específicamente con un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden comprender, o como alternativa consistir en, una, dos, tres o más CDR de VH y una, dos, tres o más CDR de VL, como están contenidas en una cadena pesada o cadena ligera expresada por la línea celular XF 27/28.43E2 indicada en la Tabla 2. En particular, se describen anticuerpos que se unen inmuno-específicamente con un polipéptido o fragmento polipeptídico o variante de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dichos anticuerpos, o como alternativa consistiendo en, una CDR 1 de VH y una CDR1 de VL, una CDR1 de VH y una CDR2 de VL, una CDR1 de VH y una CDR3 de VL, una CDR2 de VH y una CDR1 de VL, CDR2 de VH y CDR2 de VL, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL, una CDR3 de VH y una CDR1 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL, una CDR3 de VH y una CDR3 de VL, o cualquier combinación de las mismas, de las CDR de VH y CDR de VL contenidas en una cadena pesada o cadena ligera expresada por una o más líneas celulares indicadas en la Tabla 2. En una realización preferida, una o más de estas combinaciones son del mismo scFv como se describe en la Tabla 2. También se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de estos anticuerpos, que se unen inmuno-específicamente con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, moléculas, fragmentos o variantes.

#### **Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican Anticuerpos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que Corresponden a Anticuerpos Derivados de Cepas de Xenomouse.**

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico, generalmente aisladas, que codifican un anticuerpo de la invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo del mismo). En una realización específica, una molécula de ácido nucleico de la invención codifica un anticuerpo (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes del mismo), que comprende, o como alternativa que consiste en, un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios VH de una cadena pesada expresada por la línea celular de la invención, XF 27/28.43E2 indicada en la Tabla 2 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera expresada por la línea celular de la invención indicada en la Tabla 2. En otra realización, una molécula de ácido nucleico de la invención codifica un anticuerpo (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes del mismo), que comprende, o como alternativa que consiste en, un dominio VH que contiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios VH de una cadena pesada expresada por la línea celular de la invención indicada en la Tabla 2 o un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera expresada por la línea celular de la invención indicada en la Tabla 2.

Se describen anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, variantes (incluyendo derivados) de las moléculas de anticuerpo (por ejemplo, los dominios VH y/o dominios VL) descritos en la presente memoria, uniéndose dichos anticuerpos inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmento o variante del mismo. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia

para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de la invención, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR que da como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos en relación con el dominio VH de referencia, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, dominio VL, VLCDR1, VLCDR2, o VLCDR3. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el resto aminoacídico se reemplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral con una carga similar. Se han definido en la técnica familias de restos aminoacídicos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación y los mutantes resultantes pueden explorarse con respecto a actividad biológica para identificar mutantes que conservan actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un Receptor de Quimiocina de proteína G).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solamente en regiones flanqueantes o solamente en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones de sentido erróneo silenciosas o neutras, es decir, que tienen poco o ningún efecto en la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codón o mejorar la producción de anticuerpo de un hibridoma. Como alternativa, las mutaciones de sentido erróneo no neutras pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse a antígeno. La localización de la mayoría de las mutaciones de sentido erróneo silenciosas y neutras probablemente está en las regiones flanqueantes, mientras que la localización de la mayoría de las mutaciones de sentido erróneo no neutras están probablemente en CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la materia sería capaz de diseñar y ensayar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como no alteración en la actividad de unión a antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión a antígeno o cambios en especificidad de anticuerpos). Después de la mutagénesis, la proteína modificada puede expresarse rutinariamente y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, capacidad para unirse inmuno-específicamente con un Receptor de Quimiocina de proteína G) puede determinarse usando técnicas descritas en la presente memoria o por técnicas de modificación rutinarias conocidas en la materia.

En una realización específica, un anticuerpo (incluyendo una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo), que se une inmuno-específicamente con polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes de los mismos, comprende, o como alternativa consiste en, una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos que es complementaria con la que codifica uno de los dominios VH o VL expresados por una o más líneas celulares indicadas en la Tabla 2, en condiciones rigurosas, por ejemplo, hibridación con ADN unido a filtro en cloruro sódico 6X/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en SSC 0,2x/SDS 0,1% a aproximadamente 50-65°C, en condiciones altamente rigurosas, por ejemplo, hibridación con ácido nucleico unido a filtro en SSC 6x a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en SSC 0,1x/SDS 0,2% a aproximadamente 68°C o en otras condiciones de hibridación rigurosas que se conocen por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. *et al.*, eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3). También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos. Se conoce bien dentro de la técnica que los polipéptidos, o fragmentos o variantes de los mismos, con secuencias de aminoácidos similares con frecuencia tienen estructura similar y muchas de las mismas actividades biológicas. De este modo, un anticuerpo (incluyendo una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo), que se une inmuno-específicamente con un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de una cadena pesada expresada por al menos una de las líneas celulares indicadas en la Tabla 2.

Un anticuerpo (incluyendo una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo), que se une inmuno-específicamente con un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica a la



secuencia de aminoácidos de un dominio VL de una cadena ligera expresada por al menos una de las líneas celulares indicada en la Tabla 2.

### ***Polinucleótidos que Codifican Anticuerpos***

Los anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos de anticuerpo) pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se apreciará que los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden expresarse en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridoma. Pueden usarse secuencias que codifican los ADNc o clones genómicos para los anticuerpos particulares para transformación de células hospedadoras de mamífero o no de mamífero adecuadas o para generar bibliotecas de presentación de fagos, por ejemplo. Adicionalmente, pueden sintetizarse químicamente o producirse a través del uso de sistemas de expresión recombinante polipéptidos de anticuerpos de la invención.

Una forma de producir en los anticuerpos de la invención sería clonar los dominios VH y/o VL expresados por la línea celular de hibridoma de la invención indicada en la Tabla 2. Para aislar los dominios VH y VL de la línea celular de hibridoma, pueden usarse cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos VH o VL (véase el ejemplo 55) para amplificar las secuencias VH y VL expresadas contenidas en ARN total aislado de la línea celular de hibridoma. Los productos de PCR pueden clonarse después usando vectores, por ejemplo, que tienen un sitio de clonación de producto de PCR que consiste en un saliente de nucleótido T sencillo 5' y 3', que es complementario al nucleótido de adenina sencillo saliente añadido en el extremo 5' y 3' de productos de PCR por muchas ADN polimerasas usadas para reacciones de PCR. Los dominios VH y VL pueden secuenciarse después usando métodos convencionales conocidos en la técnica.

Los genes de VH y VL clonados pueden situarse en uno o más vectores de expresión adecuados. Como ejemplo no limitante, pueden usarse cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos de VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción, para amplificar las secuencias VH o VL. Utilizando técnicas de clonación conocidas para los expertos en la materia, los dominios VH amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan la región constante de inmunoglobulina apropiada, por ejemplo, la región constante IgG1 o IgG4 humana para dominios VH y las regiones constantes kappa o lambda humanas para dominios VL kappa y lambda, respectivamente. Preferiblemente, los vectores para la expresión de dominios VH o VL comprenden un promotor adecuado para dirigir la expresión de las cadenas pesada y ligera en el sistema de expresión seleccionado, una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable de inmunoglobulina, dominios constantes de inmunoglobulina y un marcador de selección tal como neomicina. Los dominios VH y VL también pueden clonarse en un vector sencillo que expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de cadena pesada y vectores de conversión de cadena ligera se cotransfectan después en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, usando técnicas conocidas para los expertos en la materia (Véase, por ejemplo, Guo *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 925-31 (1997), y Ames *et al.*, J. Immunol. Methods 184: 177-86 (1995)).

La invención proporciona adicionalmente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo y fragmentos del mismo de la invención. También se describen polinucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o de menor rigurosidad, por ejemplo, como se ha definido anteriormente, con polinucleótidos que codifican un anticuerpo, preferiblemente, que se une específicamente con un polipéptido descrito en la presente memoria, preferiblemente, un anticuerpo que se une con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o un polipéptido codificado por el clon depositado.

Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo se conoce, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier *et al.*, BioTechniques 17: 242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, que hibrida y se liga con esos oligonucleótidos, y después amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpo o una biblioteca de ADNc generada de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A+, aislado de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención) mediante amplificación de PCR usando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia (Véase Ejemplo 55) o mediante clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse después en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse usando métodos bien conocidos en la

técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una

secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera pueden inspeccionarse para identificar las secuencias de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) por métodos que se conocen bien en la técnica, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas de ADN recombinante rutinarias, pueden insertarse una o más de las CDR dentro de regiones flanqueantes, por ejemplo, en regiones flanqueantes humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se ha descrito anteriormente. Las regiones flanqueantes pueden ser de origen natural o regiones flanqueantes consenso, y preferiblemente regiones flanqueantes humanas (véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998) para una enumeración de regiones flanqueantes humanas).

Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones flanqueantes y CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido de CCR5. Preferiblemente, como se ha analizado anteriormente, una o más sustituciones de aminoácidos pueden realizarse dentro de las regiones flanqueantes y preferiblemente las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo con su antígeno. Adicionalmente, tales métodos pueden usarse para realizar sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más restos de cisteína de región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Se describen otras alteraciones del polinucleótido y están dentro de la experiencia de la técnica.

Para algunos usos, tales como para maduración de afinidad *in vitro* de un anticuerpo de la invención, puede ser útil expresar los dominios VH y VL de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de la invención como anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos Fab en una biblioteca de presentación de fagos. Por ejemplo, los ADNc que codifican los dominios VH y VL del anticuerpo de la invención pueden expresarse en todas las posibles combinaciones usando una biblioteca de presentación de fagos, permitiendo la selección de combinaciones VH/VL que se unen con polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con características de unión preferidas tales como afinidad mejorada o velocidades de disociación mejoradas. Adicionalmente, pueden mutarse segmentos VH y VL-las regiones CDR de los dominios VH y VL del anticuerpo de la invención, en particular, *in vitro*. La expresión de dominios VH y VL con CDR "mutantes" en una biblioteca de presentación de fagos permite la selección de combinaciones de VH/VL que se unen con un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con características de unión preferidas tales como afinidad mejorada o velocidades de disociación mejoradas.

En métodos de presentación de fagos, se presentan dominios de anticuerpo funcional en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican dominios VH y VL se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc animal (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humano o murino de tejidos linfoides) o bibliotecas de ADNc sintético. El ADN que codifica los dominios VH y VL se une mediante un enlazador scFv por PCR y se clona en un vector fagémido (por ejemplo, pCANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector se electropora en *E. coli* y la *E. coli* se infecta con fago auxiliar. Los fagos usados en estos métodos típicamente son fagos filamentosos que incluyen fd y M13 y los dominios VL y VH habitualmente se fusionan de forma recombinante con el gen III o gen VIII del fago. El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une con un antígeno de interés (es decir, un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G o un fragmento del mismo) puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. Los ejemplos de métodos de presentación de fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, los descritos en Brinkman *et al.*, J. Immunol. Methods 182: 41-50 (1995); Ames *et al.*, J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, Eur. J. Immunol. 24: 952-958 (1994); Persic *et al.*, Gene 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, Advances in Immunology 57: 191-280(1994); solicitud de PCT N° PCT/GB91/O1 134; publicaciones de PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18719; WO 93/1 1236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO97/13844; y Patentes de Estados Unidos N° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.717; 5.780.225; 5.648.727; 5.735.743 y 5.969.108.

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas por la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855 (1984); Neuberger *et al.*, Nature 312: 604-608 (1984); Takeda *et al.*, Nature 314: 452-454 (1985)) mediante corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada. Como se ha descrito anteriormente, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes derivan de diferentes especies animales, tal como los que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Como alternativa, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778; Bird, Science 242: 423-42 (1988); Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 85: 5879-5883 (1988); y Ward *et al.*, Nature 334: 544-54 (1989)) para producir anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman mediante la unión de fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla. También pueden usarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra *et al.*, Science 242: 1038-1041 (1988)).

### **Métodos para Producir Anticuerpos**

Los anticuerpos de la invención pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química, por inmunización intracelular (es decir, tecnología de intracuerpos) o preferiblemente, mediante técnicas de expresión recombinante. Los métodos para producir anticuerpos incluyen, sin limitación, tecnología de hibridoma, transformación de VEB y otros métodos analizados en la presente memoria así como a través del uso de tecnología de ADN recombinante, como se analiza posteriormente.

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado, variante o análogo del mismo, (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o un anticuerpo de cadena sencilla de la invención), requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o parte del mismo (preferiblemente que contiene el dominio variable de cadena pesada o ligera), de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia. De este modo, se describen en la presente memoria métodos para preparar una proteína mediante expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo. Pueden usarse métodos que se conocen bien por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La invención, de este modo, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la invención. También se describen vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada o ligera de los mismos, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unida operativamente con un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, Publicación de PCR WO 86/05807; Publicación de PCT WO 89/01036; y Patente de Estados Unidos Nº 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en un vector tal para la expresión de la cadena pesada o ligera completa.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan después por técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. De este modo, la invención incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o se describen células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica una cadena pesada o ligera del mismo, o un anticuerpo de cadena sencilla de la invención, unido operativamente con un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, pueden co-expresarse vectores que codifican las cadenas pesada y ligera en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla posteriormente.

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de vector de expresión-hospedador para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Tales sistemas de expresión-hospedador representan vehículos mediante los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen sin limitación microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas celulares de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NSO) que portan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus vaccinia). Preferiblemente, se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli* y, más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster Chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor de gen temprano intermedio principal de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, Gene 45: 101 (1986); Cockett *et al.*, Bio/Technology 8: 2 (1990)).

En sistemas bacterianos, varios vectores de expresión pueden seleccionarse ventajosamente dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando debe producirse una gran cantidad de una proteína tal, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos proteicos de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO J. 2: 1791 (1983)), en el que la secuencia codificante de anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en fase con la región codificante de lac Z de modo que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509 (1989)); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos ajenos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de células lisadas mediante adsorción y unión con perlas de matriz de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores de pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de proteasa de factor Xa o trombina de modo que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto de GST.

En un sistema de insecto, se usa virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes ajenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina).

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpos de interés puede ligarse con un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse después en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359 (1984)). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para una traducción eficaz de secuencias codificantes de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación de ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación puede estar en fase con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control traduccional exógenas y codones de iniciación puede ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de transcripción, etc. (véase Bittner *et al.*, Methods in Enzymol. 153: 51-544 (1987)).

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique o procese el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y modificación post-traduccional de proteínas y productos génicos. Pueden seleccionarse sistemas de hospedador o líneas celulares apropiadas para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína ajena expresada. Con este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Tales células hospedadoras de mamífero incluyen pero sin limitación CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 y, en particular, líneas celulares de cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y línea celular de glándula mamaria normal tal como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

Para producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, pueden obtenerse por ingeniería genética líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, pueden transformarse células hospedadoras con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN ajeno, se puede permitir a las células modificadas por ingeniería genética crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse de forma ventajosa para modificar por ingeniería genética líneas celulares que expresan la molécula del anticuerpo. Tales líneas celulares modificadas por ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en la exploración y evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo sin limitación los genes de timidina quinasa de virus del herpes simple (Wigler *et al.*, Cell 11: 223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202 (1992)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22: 817 (1980)) que pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia antimetabolito como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072 (1981)); neo,

que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu y Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); May, 1993, TIB TECH 11(5): 155-215); e higo, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30: 147 (1984)). Pueden aplicarse rutinariamente métodos habitualmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150: 1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, un aumento en el nivel del inhibidor presente en cultivo de célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3: 257 (1983)).

Los vectores que usan glutamina sintasa (GS) o DHFR como los marcadores seleccionables pueden amplificarse en presencia de los fármacos metionina sulfoximina o metotrexato, respectivamente. Una ventaja de los vectores basados en glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (por ejemplo, la línea celular de mieloma murino, NS0) que son negativas para glutamina sintasa. Los sistemas de expresión de glutamina sintasa también pueden funcionar en células que expresan glutamina sintasa (por ejemplo Células de Ovario de Hámster Chino (CHO)) proporcionando inhibidor adicional para evitar el funcionamiento del gen endógeno.

Los vectores que usan glutamina sintasa como marcador seleccionable incluyen, sin limitación, el vector de expresión pEE6 descrito en Stephens y Cockett, Nucl. Acids. Res 17: 7110 (1989). Un sistema de expresión de glutamina sintasa y componentes del mismo se detallan en las publicaciones de PCT: WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; y WO91/06657. Adicionalmente, los vectores de expresión de glutamina sintasa que pueden usarse de acuerdo con la presente invención están disponibles en el mercado de proveedores, incluyendo, por ejemplo Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH). La expresión y producción de anticuerpos monoclonales usando un sistema de expresión de GS en células de mieloma murino se describen en Bebbington *et al.*, Bio/technology 10: 169(1992) y en Biblia y Robinson Biotechnol. Prog. 11: 1 (1995).

La célula hospedadora puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un vector sencillo que codifica y es capaz de expresar polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debería colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322: 52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha producido por un animal, se ha sintetizado químicamente o se ha expresado de forma recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la Proteína A, y de columna de selección por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica, para facilitar la purificación.

### Conjugados de Anticuerpos

Los anticuerpos de la invención pueden fusionarse de forma recombinante o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con un polipéptido de CCR5 (o parte del mismo, preferiblemente al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. La fusión no necesita necesariamente ser directa, sino que puede producirse a través de secuencias enlazadoras. Los anticuerpos pueden ser específicos para antígenos distintos de polipéptidos (o parte de los mismos, preferiblemente al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 aminoácidos del polipéptido) descritos en la presente memoria. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos para dirigirse a los polipéptidos descritos en la presente memoria para tipos celulares particulares, *in vitro* o *in vivo*, mediante fusión o conjugación de los polipéptidos con anticuerpos específicos para receptores de superficie celular particulares. Pueden fusionarse polipéptidos y/o anticuerpos de la presente invención (incluyendo fragmentos de los mismos) con el extremo N o C terminal de la proteína heteróloga (por ejemplo, polipéptido Fc de inmunoglobulina o polipéptido de albúmina de suero humano). Los anticuerpos de la invención también pueden fusionarse con albúmina (incluyendo pero sin limitación albúmina de suero humano recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.876.969, presentada el 2 de marzo de 1999,

Patente de EP 0 413 622 y Patente de Estados Unidos N° 5.766.883, presentada el 16 de junio de 1998)), dando como resultado polipéptidos quiméricos. En una realización preferida, se fusionan polipéptidos y/o anticuerpos de la presente invención (incluyendo fragmentos o variantes de los mismos) con la forma madura de albúmina de suero humano (es decir, aminoácidos 1-585 de la albúmina de suero humano como se muestra en las Figuras 1 y 2 de la Patente de EP 0 322 094). En otra realización preferida, se fusionan polipéptidos y/o anticuerpos de la presente invención (incluyendo fragmentos o variantes de los mismos) con fragmentos polipeptídicos que comprenden, o como alternativa que consisten en, los restos aminoácídicos 1-z de albúmina de suero humano, siendo z un número entero de 369 a 419, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.766.883. La invención también abarca polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de la invención. Tales proteínas de fusión pueden, por ejemplo facilitar la purificación y aumentar la semi-vida *in vivo*. Los anticuerpos fusionados o conjugados con los polipéptidos de CCR5 también pueden usarse en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harbor *et al.*, mencionado anteriormente, y publicación de PCT WO 93/21232; documento EP 439.095; Naramura *et al.*, Immunol. Lett. 39: 91-99 (1994); Patente de Estados Unidos 5.474.981; Gillies *et al.*, PNAS 89: 1428-1432 (1992); Fell *et al.*, J. Immunol. 146: 2446-2452(1991).

La presente descripción incluye adicionalmente composiciones que comprenden los polipéptidos de CCR5 fusionados o conjugados con dominios de anticuerpo distintos de las regiones variables. Por ejemplo, los polipéptidos pueden fusionarse o conjugarse con una región Fc de anticuerpo, o parte de la misma. La parte de anticuerpo fusionada con un polipéptido descrito en la presente memoria puede comprender la región constante, región bisagra, dominio CH1, dominio CH2 y dominio CH3 o cualquier combinación de dominios completos o partes de los mismos. Los polipéptidos también pueden fusionarse o conjugarse con las partes de anticuerpo anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las partes Fc fusionadas con los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden formar dímeros a través de enlaces disulfuro entre las partes Fc. Pueden prepararse formas multiméricas mayores mediante la fusión de los polipéptidos con partes de IgA e IgM. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o conjugar los polipéptidos con partes de anticuerpo. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.336.603; 5.622.929; 5.359.046; 5.349.053; 5.447.851; 5.112.946; documento EP 307.434; documento EP 367.166; publicaciones de PCT WO 96/04388; WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539 (1991); Zheng *et al.*, J. Immunol. 154: 5590-5600 (1995); y Vil *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11337-11341(1992).

Como se ha analizado, anteriormente, los polipéptidos correspondientes a un polipéptido, fragmento polipeptídico o una variante de SEC ID N° 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado pueden fusionarse o conjugarse con las partes de anticuerpo anteriores para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Además, los polipéptidos correspondientes a SEC ID N°:2 o al polipéptido codificado por el clon depositado pueden fusionarse o conjugarse con las partes de anticuerpo anteriores para facilitar la purificación. Un ejemplo indicado describe proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de mamífero. (Documento EP 394.827; Traunecker *et al.*, Nature 331: 84-86 (1988). Los polipéptidos fusionados o conjugados con un anticuerpo que tiene estructuras diméricas enlazadas por disulfuro (debido a la IgG) también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas, que la proteína secretada monomérica o fragmento proteico por sí solos (Fountoulakis *et al.*, J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995)). En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es beneficiosa en terapia y diagnóstico y por lo tanto puede dar como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (documento EP A 232.262). Como alternativa, suprimir la parte Fc después de que la proteína de fusión se haya expresado, detectado y purificado, sería deseable. Por ejemplo, la parte Fc puede obstaculizar la terapia y el diagnóstico si la proteína de fusión se usa como un antígeno para inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, proteínas humanas, tales como hIL-5, se han fusionado con partes Fc con el fin de realizar ensayos de exploración de alto rendimiento para identificar antagonistas de hIL-5 (Véase, Bennett *et al.*, J. Molecular Recognition 8: 52-58 (1995); Johanson *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 9459-9471 (1995).

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina posibilita la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador "HA", que se corresponde con un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, Cell 37: 767 (1984)) y el marcador "flag".

La presente invención abarca adicionalmente anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos pueden usarse de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o progresión de un tumor como parte de un procedimiento de ensayos clínicos para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento del anticuerpo con una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente con el

anticuerpo (o fragmento del mismo) o indirectamente a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacilamin fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen yodo ( $^{121}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), indio ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{115\text{m}}\text{In}$ ), tecnecio ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), talio ( $^{201}\text{Tl}$ ), galio ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), paladio ( $^{103}\text{Pd}$ ), molibdeno ( $^{99}\text{Mo}$ ), xenón ( $^{133}\text{Xe}$ ), flúor ( $^{18}\text{F}$ ),  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ , y  $^{97}\text{Ru}$ .

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se unen a quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, incluyendo pero sin limitación,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , y  $^{153}\text{Sm}$ , con polipéptidos. El ión radiometálico asociado con los quelantes macrocíclicos unidos a polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) es  $^{111}\text{In}$ . El ión radiometálico asociado con el quelante macrocíclico unido con polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) es  $^{90}\text{Y}$ . El quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA). El DOTA se une con el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mediante una molécula enlazadora. Se conocen habitualmente en la técnica ejemplos de moléculas enlazadoras útiles para conjugar DOTA con un polipéptido - véase, por ejemplo, DeNardo *et al.*, Clin Cancer Res. 4(10): 2483-90, 1998; Peterson *et al.*, Bioconjug. Chem. 10(4): 553-7, 1999; y Zimmerman *et al.*, Nucl. Med. Biol. 26(8): 943-50, 1999. Además, las Patentes de Estados Unidos 5.652.361 y 5.756.065, que describen agentes quelantes que pueden conjugarse con anticuerpos y métodos para su preparación y uso. Aunque las Patentes de Estados Unidos 5.652.361 y 5.756.065 se centran en conjugar agentes quelantes con anticuerpos, un experto en la materia podría adaptar fácilmente los métodos descritos en dichas memorias para conjugar agentes quelantes con otros polipéptidos.

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis- diclorodiamina de platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Los conjugados de anticuerpos de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , factor de crecimiento neuronal, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador plasminógeno de tejido, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF-alfa, TNF-beta, AIM I (Véase, Publicación Internacional N° WO 97/33899), AIM II (Véase, Publicación Internacional N° WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi *et al.*, Int. Immunol., 6: 1567-1574 (1994)), VEGI (Véase, Publicación Internacional N° WO 99/23105), un agente trombotico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo, angioestatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

También pueden unirse anticuerpos a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliácridamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Las técnicas para conjugar dicho resto terapéutico con anticuerpos se conocen bien, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pág. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pág. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62: 119-58 (1982).

Como alternativa, un anticuerpo, puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos como se describe por Segal en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

Un anticuerpo, con o sin un resto terapéutico conjugado con él, administrado solo o en combinación con un factor o factores citotóxicos y/o una citocina o citocinas puede usarse como un agente terapéutico.

## 5 **Immunofenotipación**

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para inmunofenotipación de líneas celulares y muestras biológicas. El producto de traducción del gen descrito en la presente memoria puede ser útil como un marcador específico celular o más específicamente como un marcador celular que se expresa de forma diferencial en diversas etapas de diferenciación y/o maduración de tipos celulares particulares. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo específico, o combinación de epítopos, permitirán la exploración de poblaciones celulares que expresan el marcador. Pueden utilizarse diversas técnicas que usan anticuerpos monoclonales para explorar con respecto a poblaciones celulares que expresan el marcador o los marcadores e incluyen separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo, "selección" con anticuerpo unido a una matriz sólida (es decir, placa) y citometría de flujo (Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.985.660; y Morrison *et al.*, Cell, 96: 737-49 (1999)).

Estas técnicas permiten la exploración de poblaciones particulares de células, tales como las que podrían encontrarse con tumores malignos hematológicos (es decir enfermedad residual mínima (MRD) en pacientes con leucemia aguda) y células "no propias" en trasplantes para evitar enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Como alternativa, estas técnicas permiten la exploración de células madre y progenitoras hematopoyéticas capaces de experimentar proliferación y/o diferenciación, como podrían encontrarse en sangre del cordón umbilical humano.

## **Ensayos Para Unión de Anticuerpos**

Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse con respecto a unión inmuno-específica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen pero sin limitación sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como análisis de BIAcore (véase, por ejemplo, Ejemplo 59), análisis FACS (separación de células activada por Fluorescencia) (véase, por ejemplo, Ejemplo 54), inmunofluorescencia (véase, por ejemplo, Ejemplo 56), inmunocitoquímica, transferencias de western (véase Ejemplos 64 y 65), radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción unida a enzima) (Véase, por ejemplo, Ejemplo 54), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos de fluorescencia, inmunoensayos de proteína A, por nombrar sólo unos pocos. Tales ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Se describen inmunoensayos ejemplares brevemente a continuación (pero no se pretende que sean limitantes).

Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente comprenden lisar una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (NP-40 o Triton X-100, desoxicolato sódico 1%, SDS 0,1%, NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,01 M a pH 7,2, Trasylol 1%) complementado con inhibidores de proteasa y/o fosfatasa proteica (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato sódico), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 4°C, añadir perlas de sefarosa de proteína G y/o proteína A al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 4°C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en tampón de muestra/SDS. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular puede evaluarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de western. Un experto en la materia conocerá los parámetros que pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo con un antígeno y disminuir el fondo (por ejemplo, preacclarando el lisado celular con perlas de sefarosa). Para un análisis adicional con respecto a protocolos de inmunoprecipitación véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1.

El análisis de referencia de western generalmente comprende preparar muestras proteicas, electroforesis de las muestras proteicas en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS-PAGE 8%-20% dependiendo del peso molecular del antígeno, transferir la muestra proteica del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nylon, bloquear la membrana en solución de bloqueo (por ejemplo, PBS con BSA 3% o leche sin grasa), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano o fosfatasa alcalina) o molécula radiactiva (por ejemplo 32P o 125I) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la materia conocerá los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada y reducir el ruido de fondo. Para un análisis adicional con respecto a protocolos de transferencia de western véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.8.1.



Los ELISA comprenden preparar antígeno, recubrir los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo peroxidasa de rábano rústico o fosfatasa alcalina) con el pocillo e incubar durante un periodo de tiempo y detectar la presencia del antígeno. En los ELISA el anticuerpo de interés no tiene que estar conjugado con un compuesto detectable; en su lugar, un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable puede añadirse al pocillo. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo puede recubrir el pocillo. En este caso, un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable puede añadirse después de la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Un experto en la materia conocerá los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISA conocidas en la técnica. Para análisis adicional con respecto a los ELISA véase, por ejemplo, Ausubel *et al*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

La afinidad de unión de un anticuerpo con un antígeno y la velocidad de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo puede determinarse por ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo,  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$ ), o fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés por un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y las velocidades de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos por análisis de representación de scatchard. También puede determinarse competición con un segundo anticuerpo usando radioinmunoensayos. En este caso, el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se incubaba con anticuerpo de interés conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, compuesto marcado con  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$ ) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado. Este tipo de ensayo competitivo entre dos anticuerpos también puede usarse para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo o diferentes epítomos.

En una realización preferida, se usa análisis cinético BIAcore para determinar las velocidades de asociación y disociación de unión de anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos) con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). El análisis cinético de BIAcore comprende analizar la unión y disociación de anticuerpos de microplacas con Receptores de Quimiocina de proteína G inmovilizados (CCR5) en su superficie como se describe en el Ejemplo 59.

### Usos Terapéuticos

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para administración a un paciente animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano, para el tratamiento de una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritas. Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos de los mismos como se describe en la presente memoria) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos anti-idiotípicos como se describe en la presente memoria). Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con actividad y/o expresión aberrante de un polipéptido de CCR5, incluyendo, pero sin limitación, una o más cualesquiera de las enfermedades, trastornos o afecciones descritas en la presente memoria. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con actividad y/o expresión aberrante de un polipéptido de CCR5 incluye, pero sin limitación, aliviar síntomas asociados con esas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica o como se describen en la presente memoria.

Un sumario de los modos en los que los anticuerpos de la presente invención pueden usarse terapéuticamente incluye unión de polinucleótidos o polipéptidos de CCR5 por vía local o vía sistémica en el cuerpo o por citotoxicidad directa del anticuerpo, por ejemplo según se media por complemento (CDC) o por células efectoras (ADCC). Algunos de estos enfoques se describen en más detalle posteriormente. Teniendo las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, un experto en la materia sabrá cómo usar los anticuerpos de la presente invención para fines de diagnóstico, control o terapéuticos sin experimentación excesiva.

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse de forma ventajosa en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos o con linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), por ejemplo, que sirven para aumentar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con los anticuerpos.

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos de tratamientos (por ejemplo, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia, agentes antitumorales y agentes anti-retrovirales) (véase Ejemplo 28, posteriormente). En una realización altamente preferida, los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con agentes anti-retrovirales (véase Ejemplo 28, posteriormente). Generalmente, se prefiere la administración de productos de un origen de especie o reactividad de especie (en el caso de anticuerpos) que es la misma especie que la del paciente. De este modo, en una realización preferida, se administran anticuerpos, fragmentos derivados, análogos o ácidos nucleicos humanos a un paciente humano para terapia o profilaxis.

Se prefiere usar anticuerpos neutralizadores y/o inhibidores *in vivo* potentes y/o de alta afinidad contra polipéptidos o polinucleótidos descritos en la presente memoria, fragmentos o regiones de los mismos, para ambos inmunoensayos dirigidos a y terapia de trastornos relacionados con polinucleótidos o polipéptidos, incluyendo fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria. Tales anticuerpos, fragmentos o regiones preferiblemente tendrán una afinidad con respecto a polinucleótidos o polipéptidos descritos en la presente memoria, incluyendo fragmentos de los mismos. Las afinidades de unión preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación o  $K_d$  menor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M. Afinidades de unión más preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación o  $K_d$  menor de  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M o  $10^{-8}$  M. Las afinidades de unión incluso más preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación o  $K_d$  menor de  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M, o  $10^{-15}$  M.

### **Composición y Administración Terapéutica/Profiláctica**

La invención proporciona anticuerpos humanos o humanizados o fragmentos de los mismos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento o prevención que son para administración a un sujeto. En un aspecto preferido, el compuesto está sustancialmente purificado (por ejemplo, sustancialmente sin sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). El sujeto es preferiblemente un animal, incluyendo sin limitación animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano.

Las formulaciones y métodos de administración que pueden emplearse cuando el compuesto comprende un ácido nucleico o una inmunoglobulina se han descrito anteriormente; pueden seleccionarse formulaciones y vías de administración apropiadas adicionales de entre las descritas a continuación en la presente memoria.

Se conocen y pueden usarse diversos sistemas de suministro para administrar un anticuerpo o composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos o composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de embolada, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración pueden ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y formulación con agente de formación de aerosol.

Puede ser deseable administrar los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención localmente al área que necesita tratamiento; esto puede conseguirse mediante, por ejemplo, y sin limitación, infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito después de cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante de material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como fibras o membranas sialásticas. Preferiblemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención debe tenerse cuidado de usar materiales en los que no se absorba la proteína.

El compuesto o composición puede suministrarse en un vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pág. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, igual que en la referencia anterior, pág. 317-327; véase generalmente igual que en la referencia anterior).

El compuesto o composición puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. Puede usarse una bomba (véase Langer, mencionado anteriormente; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald *et al.*, Surgery 88: 507 (1980); Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321.574 (1989)). Pueden usarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61 (1983); véase también Levy *et al.*, Science 228: 190 (1985); During *et al.*, Ann. Neurol. 25: 351 (1989); Howard *et al.*, J. Neurosurg. 71: 105 (1989)). Puede colocarse un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, mencionado anteriormente, vol. 2, pág. 115-138(1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (Science 249: 1527-1533 (1990)).

Cuando el compuesto es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo*

para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándola de modo que se convierte en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase Patente de Estados Unidos N° 4.980.286), por inyección directa, mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), recubriendo con lípidos, receptores de superficie celular o agentes de transfección, o mediante su administración en enlace con un péptido de tipo homeobox que se sabe que entra en el núcleo (véase por ejemplo, Joliot *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868 (1991)), etc. Como alternativa, puede introducirse un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para su expresión, por recombinación homóloga.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, es decir un anticuerpo de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o un gobierno estatal o enumerada en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o transportador con el que se administra el agente terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como los de uso farmacéutico de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán unas cantidades terapéuticamente eficaces del compuesto, preferiblemente de forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para administración adecuada al paciente. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para suavizar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proporcionan de forma separada o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un envase sellado herméticamente tal como una ampolla u oblea que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición debe administrarse por infusión, puede distribuirse con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de uso farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

Los compuestos de la invención pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

La cantidad del compuesto de la invención que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado con actividad y/o expresión aberrante de un polipéptido descrito en la presente memoria puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y debería decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo de modelo animal o *in vitro*.

Para anticuerpos, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación a administrar a un paciente es de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferiblemente 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una semi-vida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune a los polipéptidos ajenos. De este modo, con frecuencia son posibles dosificaciones menores de anticuerpos humanos y administración menos frecuente. Además, la dosificación y frecuencia de administración de anticuerpos de la invención puede reducirse potenciando la captación y penetración de tejido (por ejemplo, en el cerebro) de los anticuerpos por modificaciones tales como, por ejemplo

lipidación.

La invención también proporciona un kit que comprende el anticuerpo de la invención. Opcionalmente puede haber un aviso asociado con tal envase o envases en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos biológicos o farmacéuticos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana.

### **Diagnóstico y formación de Imágenes**

Pueden usarse anticuerpos marcados, y derivados y análogos de los mismos, que se unen específicamente a un polipéptido de interés para fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar, pronosticar o controlar enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con la actividad y/o expresión aberrante de un polipéptido de CCR5. Se describe la detección de expresión aberrante de un polipéptido de interés, que comprende (a) ensayar la expresión del polipéptido de interés en células o fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos específicos para el polipéptido de interés y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica convencional, por el cual un aumento o disminución en el nivel de expresión génica del polipéptido ensayado en comparación con el nivel de expresión convencional es indicativo de una expresión aberrante.

La invención proporciona un ensayo de diagnóstico para diagnosticar un trastorno, que comprende (a) ensayar la expresión del polipéptido de interés en células o fluido corporal de un individuo usando anticuerpos de la invención específicos para el polipéptido de interés y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica convencional, mediante lo cual un aumento o disminución en el nivel de expresión génica del polipéptido ensayado en comparación con el nivel de expresión convencional es indicativo de un trastorno particular. Con respecto al cáncer, la presencia de una cantidad relativamente alta de transcrito en tejido de biopsia de un individuo puede indicar una predisposición para el desarrollo de la enfermedad o puede proporcionar un medio para detectar la enfermedad antes de la aparición de síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir a los profesionales de la salud emplear medidas preventivas o tratamiento agresivo más temprano previniendo de este modo el desarrollo o progresión adicional del cáncer.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para ensayar niveles de proteína en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos para los expertos en la materia (por ejemplo, véase Jalkanen, *et al.*, J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, *et al.*, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión de genes de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Se conocen en la técnica marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, oxidasa de glucosa; radioisótopos, tales como yodo (125I, 121I), carbono (14C), azufre (35S), tritio (3H), indio (112In), y tecnecio (99Tc); marcadores luminiscentes tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Un aspecto de la descripción en la detección y diagnóstico de una enfermedad o trastornos asociados con expresión aberrante de un polipéptido de interés en un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano. El diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) a un sujeto una cantidad eficaz de una molécula marcada que se une específicamente al polipéptido de interés; b) esperar durante un intervalo temporal después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios en el sujeto en los que se expresa el polipéptido (y para que la molécula marcada no unida se elimine a nivel de fondo); c) determinar el nivel de fondo; y d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de modo que la detección de molécula marcada sobre el nivel de fondo indica que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno particular asociados con expresión aberrante del polipéptido de interés. El nivel de fondo puede determinarse por diversos métodos, incluyendo comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor convencional previamente determinado para un sistema particular.

Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes usado determinará la cantidad de resto de imágenes necesario para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada normalmente variará de aproximadamente 5 a 20 milicurios de 99 mTc. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado preferentemente se acumulará después en la localización de células que contienen la proteína específica. La formación de imágenes de tumores *in vivo* se describe en S. W. Burchiel *et al.*, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

Dependiendo de varias variables, incluyendo el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo temporal después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios en el sujeto y para que la molécula marcada no unida se elimine al nivel de fondo es de 6 a 48 horas, de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. El intervalo temporal después de la administración puede ser de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

El control de la enfermedad o trastorno se lleva a cabo repitiendo el método para diagnóstico de la enfermedad o

enfermedad, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

Puede detectarse la presencia de la molécula marcada en el paciente usando métodos conocidos en la técnica para exploración *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marcador usado. Los expertos en la materia serán capaces de determinar el método apropiado para detectar un marcador particular. Los métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, pero sin limitación, tomografía computerizada (CT), barrido corporal completo tal como tomografía de emisión de positrones (PET), imágenes de resonancia magnética (MRI) y ecografía.

En una realización específica, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico sensible a radiación (Thurston *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.441.050). En otra realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de barrido sensible a fluorescencia. En otra realización, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otra realización más, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando formación de imágenes de resonancia magnética (MRI).

### **Kits**

La presente invención proporciona kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende un anticuerpo de la invención, preferiblemente un anticuerpo purificado, en uno o más envases. En una realización específica, los kits de la presente invención pueden contener adicionalmente un polipéptido sustancialmente aislado que comprende un epítipo que es específicamente inmunorreactivo con un anticuerpo incluido en el kit. Preferiblemente, los kits de la presente invención comprenden adicionalmente un anticuerpo control que no reacciona con el polipéptido de interés. En otra realización específica, los kits de la presente invención contienen un medio para detectar la unión de un anticuerpo con un polipéptido de interés (por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente o un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable).

En otra realización específica de la presente invención, el kit es un kit de diagnóstico para su uso en la exploración de suero que contiene anticuerpos específicos contra polinucleótidos y polipéptidos cancerosos y/o proliferativos. Tal kit puede incluir un anticuerpo control que no reacciona con el polipéptido de interés. Tal kit puede incluir un antígeno polipeptídico sustancialmente aislado que comprende un epítipo que es específicamente inmunorreactivo con al menos un anticuerpo anti-antígeno polipeptídico. Además, dicho kit incluye medios para detectar la unión de dicho anticuerpo con el antígeno (por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un compuesto fluorescente tal como fluoresceína o rodamina que puede detectarse por citometría de flujo). El kit puede incluir un antígeno polipeptídico sintetizado químicamente o producido de forma recombinante. El antígeno polipeptídico del kit puede también unirse a un soporte sólido.

En una realización más específica el medio de detección del kit anteriormente descrito incluye un soporte sólido al que se une dicho antígeno polipeptídico. Tal kit puede también incluir un anticuerpo anti-humano marcado con un informador no unido. En esta realización, la unión del anticuerpo con el antígeno polipeptídico puede detectarse mediante la unión de dicho anticuerpo marcado con informador.

En una realización adicional, la invención incluye un kit de diagnóstico para su uso en exploración de suero que contiene antígenos del polipéptido de CCR5. El kit de diagnóstico incluye un anticuerpo sustancialmente aislado específicamente inmunorreactivo con antígenos polipeptídicos o polinucleotídicos y medios para detectar la unión del antígeno polinucleotídico o polipeptídico con el anticuerpo. El anticuerpo puede unirse a un soporte sólido. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. El medio de detección del kit puede incluir un segundo anticuerpo monoclonal marcado. Como alternativa, o además, el medio de detección puede incluir un antígeno competidor marcado.

En una configuración de diagnóstico, el suero de ensayo se hace reaccionar con un reactivo de fase sólida que tiene un antígeno unido a superficie obtenido por los métodos de la presente descripción. Después de la unión con anticuerpo específico de antígeno con el reactivo y retirar los componentes de suero no unidos por lavado, el reactivo se hace reaccionar con anticuerpo anti-humano marcado con informador para unir el informador con el reactivo en proporción a la cantidad de anticuerpo anti-antígeno unido en el soporte sólido. El reactivo se lava de nuevo para retirar el anticuerpo marcado no unido y se determina la cantidad de informador asociada con el reactivo. Típicamente, el informador es una enzima que se detecta mediante incubación de la fase sólida en presencia de un sustrato fluorométrico, luminiscente o colorimétrico adecuado (Sigma, St. Louis, MO).

El reactivo de superficie sólida en el ensayo anterior se prepara por técnicas conocidas para la unión de material proteico con material de soporte sólido, tal como perlas poliméricas, varillas, placas de 96 pocillos o material de filtro. Estos métodos de unión generalmente incluyen absorción no específica de la proteína con el soporte o unión covalente de la proteína, típicamente a través de un grupo amina libre, con un grupo químicamente reactivo en el

soporte sólido, tal como un grupo carboxilo, hidroxilo o aldehído activado. Como alternativa, pueden usarse placas recubiertas con estreptavidina junto con un antígeno o antígenos biotinilados.

De este modo, se describe un sistema de ensayo o kit para llevar a cabo este método de diagnóstico. El kit generalmente incluye un soporte con antígenos recombinantes unidos a superficie y un anticuerpo anti-humano marcado con informador para detectar anticuerpo anti-antígeno unido a superficie.

### **Proteínas de Fusión**

Puede usarse cualquier polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para generar proteínas de fusión. Por ejemplo, el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), cuando se fusiona con una segunda proteína, puede usarse como un marcador antigénico. Los anticuerpos inducidos contra el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para detectar de forma indirecta la segunda proteína mediante unión con el Receptor de Quimiocina de proteína G. Además, debido a que las proteínas secretadas se dirigen a localizaciones celulares basándose en señales de tráfico, los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse como moléculas de dirección una vez fusionados con otras proteínas.

Los ejemplos de dominios que pueden fusionarse con polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluyen no solamente secuencias señal heterólogas, sino también otras regiones funcionales heterólogas. La fusión no necesita ser necesariamente directa, sino que puede producirse a través de secuencias enlazadoras.

Las proteínas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden comprender proteínas de fusión en las que los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) son los descritos anteriormente como m-n. La solicitud describe moléculas de ácido nucleico al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de las delecciones N y C terminales específicas indicadas en la presente memoria. También se describen polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Además, también pueden obtenerse por ingeniería genética proteínas de fusión para mejorar las características del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N terminal del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para mejorar la estabilidad y persistencia durante la purificación de la célula hospedadora o posterior manipulación y almacenamiento. Además, pueden añadirse restos peptídicos al polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para facilitar la purificación. Tales regiones pueden retirarse antes de la preparación final del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). La adición de restos peptídicos para facilitar la manipulación de polipéptidos son técnicas familiares y rutinarias en la materia.

Como apreciará un experto en la materia, los polipéptidos y los fragmentos portadores de epítomos de los mismos descritos anteriormente, pueden combinarse con secuencias polipeptídicas heterólogas. Por ejemplo, los polipéptidos (incluyendo fragmentos o variantes de los mismos), pueden fusionarse con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o partes de las mismas (CH1, CH2, CH3, o cualquier combinación de los mismos y partes de los mismos), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Como otro ejemplo no limitante, los polipéptidos y/o anticuerpos de la presente invención (incluyendo fragmentos o variantes de los mismos) pueden fusionarse con albúmina (incluyendo sin limitación albúmina de suero humano recombinante o fragmentos o variantes de la misma (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.876.969, expedida el 2 de marzo de 1999, Patente de EP 0 413 622 y Patente de Estados Unidos N° 5.766.883, expedida el 16 de junio de 1998)). En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención, (incluyendo fragmentos de los mismos) se fusionan con la forma madura de albúmina de suero humano (es decir, aminoácidos 1 – 585 de albúmina de suero humano como se muestra en las Figuras 1 y 2 de la Patente de EP 0 322 094). En otra realización preferida, los anticuerpos de la presente invención, (incluyendo fragmentos de los mismos) se fusionan con fragmentos polipeptídicos que comprenden, o como alternativa que consisten en, restos aminoacídicos 1-z de albúmina de suero humano, siendo z un número entero de 369 a 419, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.766.883. Los anticuerpos de la presente invención (incluyendo fragmentos de los mismos) pueden fusionarse con el extremo N o C terminal de la proteína heteróloga (por ejemplo, polipéptido de Fc de inmunoglobulina o polipéptido de albúmina de suero humano). Polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de la invención también están abarcados por la invención.

Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran una semivida *in vivo* aumentada. Un ejemplo indicado describe proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas del mamífero (documento EP A 394.827; Traunecker *et al.*, Nature 331: 84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen estructuras dimericas enlazadas por disulfuro (debido a la IgG) también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas, que la proteína monomérica secretada o fragmento proteico por sí solo. (Fountoulakis *et al.*, J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995).)

De forma similar, el documento EP-A-O 464 533 (homólogo Canadiense 2045869) describe proteínas de fusión que comprenden diversas partes de región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o

parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es beneficiosa en terapia y diagnóstico y de este modo puede dar como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (documento EP-A 0232 262). Como alternativa, sería deseable eliminar la parte Fc después de que la proteína de fusión se haya expresado, detectado y purificado. Por ejemplo, la parte Fc puede obstaculizar la terapia y diagnóstico si la proteína de fusión se usa como un antígeno para inmunizaciones. En descubrimiento de fármacos, por ejemplo, proteínas humanas, tales como hIL-5, se han fusionado con partes Fc con el fin de realizar ensayos de exploración de alto rendimiento para identificar antagonistas de hIL-5. (Véase, D. Bennett *et al.*, J. Molecular Recognition 8: 52-58 (1995); K. Johanson *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 9459-9471 (1995)).

Además, pueden fusionarse polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con secuencias marcadoras, tales como un péptido que facilita la purificación del Receptor de Quimiocina de proteína G. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), por ejemplo, hexahistidina posibilita una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otro marcador peptídico útil para la purificación, el marcador "HA", se corresponde con un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, Cell 37: 767 (1984)).

De este modo, cualquiera de estas fusiones anteriores pueden obtenerse por ingeniería genética usando los polinucleótidos o los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

### **Producción de Proteínas, Vectores y Células Hospedadoras**

También se describen vectores que contienen el polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), células hospedadoras y la producción de polipéptidos por técnicas recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes en replicación o defectivos en replicación. En el segundo caso, la propagación viral generalmente se producirá solamente en células hospedadoras complementarias.

Los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden unirse a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un hospedador. Generalmente, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato cálcico o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, este puede empaquetarse *in vitro* usando una línea celular de empaquetamiento apropiada y después transducirse en células hospedadoras.

El inserto de polinucleótido Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) debería unirse operativamente con un promotor apropiado, tal como el promotor PL de fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de LTR retrovirales, por nombrar algunos. Otros promotores adecuados se conocerán por los expertos en la materia. Las construcciones de expresión contendrán adicionalmente sitios para inicio, terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión de ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos expresados por las construcciones preferiblemente incluirán un codón de inicio de la traducción al comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) situado de forma apropiada al final del polipéptido a traducir.

Como se indica, los vectores de expresión preferiblemente incluirán al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, G418, glutamina sintasa o resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (Nº de Acceso de ATCC 201178)); células de insecto tal como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como células CHO, NSO, COS, 293 y de melanoma de Bowes; y células vegetales. Se conocen en la técnica medios y condiciones de cultivo apropiados para las células hospedadoras anteriormente descritas.

Los vectores que usan glutamina sintasa (GS) o DHFR como los marcadores seleccionables pueden amplificarse en presencia de los fármacos metionina sulfoximiina o metotrexato, respectivamente. La disponibilidad de los fármacos que inhiben la función de las enzimas codificadas por estos marcadores seleccionables permite la selección de líneas celulares en las que las secuencias de los vectores se han amplificado después de la integración en el ADN de la célula hospedadora. Una ventaja de los vectores basados en glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (por ejemplo, la línea celular de mieloma murino, NS0) que son negativas para glutamina sintasa. Los sistemas de expresión de glutamina sintasa también pueden actuar en células que expresan glutamina sintasa (por ejemplo células de Ovario de Hámster Chino (CHO)) proporcionando un inhibidor adicional para evitar la actuación del gen endógeno. Los vectores que usan glutamina sintasa como el marcador seleccionable incluyen el vector de expresión pEE6 descrito en Stephens y Cockett, Nucl. Acids. Res 17: 7110 (1989). Un sistema de expresión de glutamina sintasa y componentes del mismo se detallan en las publicaciones de PCT: WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; y WO91/06657. Adicionalmente, los vectores de expresión de glutamina sintasa que pueden usarse de acuerdo con la presente invención están disponibles en el mercado de proveedores que incluyen,

por ejemplo, Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH). La expresión y producción de anticuerpos monoclonales usando un sistema de expresión de GS en células de mieloma murino se describen en Bebbington *et al.*, Bio/technology 10: 169(1992) y en Biblia y Robinson Biotechnol. Prog. 11: 1 (1995).

Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias se incluyen pQE70; pQE60 y pQE-9, disponibles de QIAGEN, Inc.; vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Los vectores de expresión preferidos para su uso en sistemas de levadura incluyen, pero sin limitación pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K; pPIC9K, y PA0815 (todos disponibles de Invitrogen, Carlsbad, CA). Otros vectores adecuados resultarán evidentes para el experto en la materia.

La introducción de la construcción en la célula hospedadora puede efectuarse por transfección de fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *et al.*, Basic Methods In Molecular Biology (1986). Se contempla específicamente que los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden de hecho expresarse por una célula hospedadora que carece de un vector recombinante.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes por métodos bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina. Más preferiblemente, se emplea cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para purificación.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), y preferiblemente la forma secretada, también puede recuperarse de: productos purificados de fuentes naturales, incluyendo células, tejidos y fluidos corporales, aislados directamente o cultivados; productos de procedimientos sintéticos químicos; y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden estar glucosilados o no glucosilados. Además los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también pueden incluir un resto metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de procedimientos mediados por hospedador. De este modo, se conoce bien en la materia que la metionina N terminal codificada por el codón de inicio de traducción generalmente se retira con alta eficacia de cualquier proteína después de la traducción en todas las células eucariotas. Aunque la metionina N terminal en la mayoría de las proteínas también se retira de forma eficaz en la mayoría de los procariotas, para algunas proteínas, este proceso de retirada procariota es ineficaz, dependiendo de la naturaleza del aminoácido al que está unida de forma covalente la metionina N terminal.

La levadura *Pichia pastoris* puede usarse para expresar proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un sistema eucariota. *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica que puede metabolizar metanol como su única fuente de carbono. Una etapa principal en las rutas de metabolización del metanol es la oxidación de metanol a formaldehído usando O<sub>2</sub>. Esta reacción se cataliza por la enzima alcohol oxidasa. Para metabolizar metanol como su única fuente de carbono, *Pichia pastoris* debe generar altos niveles de alcohol oxidasa debido, en parte, a la afinidad relativamente baja de alcohol oxidasa por O<sub>2</sub>. En consecuencia, en un medio de crecimiento dependiente de metanol como una fuente de carbono principal, la región promotora de uno de los dos genes de alcohol oxidasa (AOX1) es altamente activa. En presencia de metanol, la alcohol oxidasa producida del gen AOX1 comprende hasta aproximadamente 30% de la proteína soluble total en *Pichia pastoris*. Véase, Ellis, S. B., *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5: 1111-21 (1985); Koutz, P. J., *et al.*, Yeast 5: 167-77 (1989); Tschopp, J. F., *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 3859-76 (1987). De este modo, una secuencia codificante heteróloga, tal como, por ejemplo, un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en la regulación transcripcional de toda o parte de la secuencia reguladora de AOX1 se expresa a niveles excepcionalmente altos en levadura *Pichia* cultivada en presencia de metanol.

En un ejemplo, el vector plasmídico pPIC9K se usa para expresar ADN que codifica un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como se expone en la presente memoria, en un sistema de levadura *Pichia* esencialmente como se ha descrito en "Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology," D. R. Higgins y J. Cregg, eds. The Humana Press, Totowa, NJ, 1998. Este vector de expresión permite la expresión y secreción de una proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) basándose en el promotor fuerte de AOX1 unido con el péptido señal (es decir, líder) secretor de alcalina fosfatasa (PHO) de *Pichia pastoris* localizado cadena arriba de un sitio de clonación múltiple.

Podrían usarse muchos otros vectores de levadura en lugar de pPIC9K, tales como, pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ; pGAP2alfa, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, y PA0815, como apreciaría fácilmente un experto en la materia, siempre que la construcción de expresión propuesta proporcione señales localizadas de forma apropiada para la transcripción, traducción, secreción (si se desea) y similares, incluyendo un



AUG en fase según se requiera.

La expresión de alto nivel de una secuencia codificante heteróloga, tal como, por ejemplo, un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede conseguirse mediante clonación del polinucleótido heterólogo en un vector de expresión tal como, por ejemplo, pGAPZ o pGAPZalfa y dejando crecer el cultivo de levadura en ausencia de metanol.

Además de abarcar las células hospedadoras que contienen las construcciones de vector analizadas en la presente memoria, también se describen células hospedadoras primarias, secundarias e inmortalizadas de origen vertebrado, particularmente de origen de mamífero, que se han modificado por ingeniería genética para suprimir o reemplazar material genético endógeno (por ejemplo, secuencia codificante del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)) y/o para incluir material genético (por ejemplo, secuencias polinucleotídicas heterólogas) que está asociado de forma operativa con polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y que activa, altera y/o amplifica polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) endógenos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas conocidas en la materia para asociar de forma operativa regiones de control heterólogas (por ejemplo, promotor y/o potenciador) y secuencias del polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) endógenas mediante recombinación homóloga, dando como resultado la formación de una nueva unidad de transcripción (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.641.670, expedida el 24 de junio de 1997; Patente de Estados Unidos Nº 5.733.761, expedida el 31 de marzo de 1998; Publicación Internacional Nº WO 96/29411, publicada el 26 de septiembre de 1996; Publicación Internacional Nº WO 94/12650, publicada el 4 de agosto de 1994; Koller *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); y Zijlstra *et al.*, Nature 342: 435-438 (1989).

Además, pueden sintetizarse químicamente polipéptidos usando técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, véase Creighton, 1983, Proteins: Structures y Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N. Y., y Hunkapiller *et al.*, Nature, 310: 105-111 (1984)). Por ejemplo, un polipéptido que corresponde a un fragmento de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede sintetizarse mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en la secuencia del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin limitación, los D-isómeros de los aminoácidos habituales, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, b-alanina, fluoro aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como aminoácidos de b-metilo, aminoácidos de Ca-metilo, aminoácidos de Na-metilo y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser D (dextrógiro) o L (levógiro).

Se describen polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que se modifican de forma diferencial durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueos conocidos, escisión proteolítica, unión con una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas pueden llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimiotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH<sub>4</sub>; acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina; etc.

Las modificaciones post-traduccionales adicionales abarcadas incluyen, por ejemplo, cadenas de carbohidratos enlazadas en N o enlazadas en O, procesamiento de extremos N terminal o C terminal, unión de restos químicos con la cadena principal de aminoácidos, modificaciones químicas de cadenas de carbohidratos enlazadas en N o enlazadas en O y adición o delección de un resto de metionina N terminal como resultado de expresión en células hospedadoras procariontas. Los polipéptidos también pueden modificarse con un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad para permitir la detección y aislamiento de la proteína.

También se describen derivados modificados químicamente de los polipéptidos que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como aumento de la solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación del polipéptido o disminución de la inmunogenicidad (véase Patente de Estados Unidos Nº 4.179.337). Los restos químicos para derivatización pueden seleccionarse de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol de polivinilo y similares. Los polipéptidos pueden modificarse en posiciones aleatorias dentro de la molécula o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos.

El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. Para polietilenglicol, el peso molecular preferido está entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término "aproximadamente" que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular indicado) para facilitar la manipulación y la fabricación. Pueden usarse otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración de la liberación prolongada deseada, los efectos, si los hubiera, sobre la actividad biológica, la facilidad de manipulación, el grado o falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol con una proteína terapéutica o análogo).

Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) deberían unirse con la proteína considerando los efectos sobre los dominios funcional o antigénico de la proteína. Existen varios métodos de unión disponibles para los expertos en la materia, por ejemplo, documento EP 0 401 384, (acoplamiento de PEG con G-CSF), véase también Malik *et al.*, Exp. Hematol. 20: 1028-1035 (1992) (que indica pegilación de GM-CSF usando cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede unirse covalentemente a través de restos aminoacídicos mediante un grupo reactivo, tal como, un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son los que pueden unirse con una molécula de polietilenglicol activada. Los restos aminoacídicos que tienen un grupo amino libre pueden incluir restos de lisina y los restos aminoacídicos N terminales; los que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir restos de ácido aspártico, restos de ácido glutámico y el resto aminoacídico C terminales. También pueden usarse grupos sulfhidrido como un grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol. Para fines terapéuticos se prefiere unión en un grupo amino, tal como unión en el extremo N terminal o grupo de lisina.

Pueden desearse específicamente proteínas modificadas químicamente en el extremo N terminal. Usando polietilenglicol como una ilustración de la presente composición, pueden seleccionarse de entre una diversidad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol con moléculas proteicas (polipéptidos) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación a realizar y el método para obtener la proteína pegilada en N terminal seleccionada. El método para obtener la preparación pegilada en N terminal (es decir, separar este resto de otros restos monopegilados si es necesario) puede ser mediante purificación del material pegilado en N terminal de una población de moléculas proteicas pegiladas. Las proteínas selectivas modificadas químicamente en la modificación del extremo N terminal pueden conseguirse por alquilación reductora que aprovecha la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al N terminal) disponibles para derivatización en una proteína particular. En las condiciones de reacción apropiadas, se consigue derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N terminal con un polímero que contiene grupo carbonilo.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden estar en monómeros o multímeros (es decir, dímeros, trímeros, tetrámeros y multímeros mayores). En consecuencia, se describen monómeros y multímeros de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), su preparación y composiciones (preferiblemente, Terapéuticas) que los contienen. Los polipéptidos pueden ser monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros. Los multímeros pueden ser al menos dímeros, al menos trímeros o al menos tetrámeros.

Los multímeros abarcados pueden ser homómeros o heterómeros. Como se usa en la presente memoria, el término homómero, se refiere a un multímero que contiene solamente polipéptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o codificados por el ADN de HDG NR10 contenido en el clon depositado (incluyendo fragmentos, variantes, variantes de corte y empalme y proteínas de fusión, correspondientes a estos como se describen en la presente memoria). Estos homómeros pueden contener polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes. Un homómero puede ser un multímero que contiene solamente polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica. Un homómero puede ser un multímero que contiene polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que tienen secuencias de aminoácidos diferentes. El multímero puede ser un homodímero (por ejemplo, que contiene polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes) o un homotrímero (por ejemplo, que contienen polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que tienen secuencias de aminoácidos idénticas y/o diferentes). El multímero homomérico puede ser al menos un homodímero, al menos un homotrímero o al menos un homotetrámero.

Como se usa en la presente memoria, el término heterómero se refiere a un multímero que contiene uno o más polipéptidos heterólogos (es decir, polipéptidos de diferentes proteínas) además de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). El multímero puede ser un heterodímero un heterotrímero o un heterotetrámero. El multímero heteromérico puede ser al menos un heterodímero, al menos un heterotrímero o al menos un heterotetrámero.

Los multímeros pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o pueden estar unidos indirectamente mediante, por ejemplo, formación de liposomas. De este modo, pueden formarse multímeros, tales como, por ejemplo, homodímeros u homotrímeros, cuando los polipéptidos entran en contacto entre sí en solución. Pueden formarse heteromultímeros, tales como, por ejemplo, heterotrímeros o heterotetrámeros, cuando los polipéptidos entran en contacto con anticuerpos de los polipéptidos (incluyendo anticuerpos para la secuencia polipeptídica heteróloga en una proteína de fusión) en solución. Pueden formarse multímeros por asociaciones covalentes con y/o entre los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Tal asociación covalente puede implicar uno o más restos aminoacídicos contenidos en la secuencia polipeptídica (por ejemplo, la indicada en SEC ID N°: 2 o contenida en el polipéptido codificado por el clon HDG NR10). En un caso, las asociaciones covalentes forman entrecruzamiento entre restos de cisteína localizados dentro de las secuencias polipeptídicas que interactúan en el polipéptido nativo (es decir, de origen natural). En otro caso, las asociaciones covalentes son la consecuencia de manipulación química o recombinante. Como alternativa, tales asociaciones covalentes pueden implicar uno o más restos aminoacídicos contenidos en la secuencia polipeptídica heteróloga en una proteína de fusión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). En un ejemplo, las asociaciones covalentes son entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión (véase,

por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). Las asociaciones covalentes pueden estar entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión de Fc-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (como se describe en la presente memoria). Las asociaciones covalentes de proteínas de fusión pueden ser entre secuencia polipeptídica heteróloga de otra proteína que es capaz de formar multímeros asociados covalentemente, tal como por ejemplo, osteoprotegerina (véase, por ejemplo, Publicación Internacional N° WO 98/49305). Pueden unirse dos o más polipéptidos a través de enlazadores peptídicos. Los ejemplos incluyen los enlazadores peptídicos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.073.627. Pueden producirse proteínas que comprenden múltiples polipéptidos de la invención separados por enlazadores peptídicos usando tecnología de ADN recombinante convencional.

Otro método para preparar polipéptidos multiméricos implica el uso de polipéptidos fusionados con una secuencia polipeptídica de cremallera de leucina o cremallera de isoleucina. Los dominios de cremallera de leucina y cremallera de isoleucina son polipéptidos que promueven la multimerización de las proteínas en las que se hallan. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz *et al.*, Science 240: 1759, (1988)) y se han descubierto desde entonces en una diversidad de diferentes proteínas. Entre las cremalleras de leucina conocidas están los péptidos de origen natural y derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. Son ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas multiméricas solubles de la invención los descritos en la solicitud de PCT WO 94/10308. Se expresan proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido descrito en la presente memoria fusionado con una secuencia polipeptídica que dimeriza o trimeriza en solución en células hospedadoras adecuadas y la proteína de fusión multimérica soluble resultante se recupera del sobrenadante del cultivo usando técnicas conocidas en la materia.

Los polipéptidos triméricos pueden ofrecer la ventaja de mejorar la actividad biológica. Los restos de cremallera de leucina y restos de isoleucina preferidos son los que preferentemente forman trímeros. Un ejemplo es una cremallera de leucina derivada de proteína tensioactiva del pulmón D (SPD), como se describe en Hoppe *et al.* (FEBS Letters 344: 191, (1994)) y en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 08/446.922. Otros péptidos derivados de proteínas triméricas de origen natural pueden emplearse en la preparación de polipéptidos triméricos.

En otro ejemplo, las proteínas se asocian mediante interacciones entre secuencia polipeptídica Flag® contenida en proteínas de fusión que contienen secuencia polipeptídica Flag®. Las proteínas de asociación pueden asociarse por interacciones entre secuencias polipeptídicas heterólogas contenidas en las proteínas de fusión Flag® y anticuerpo anti-Flag®.

Los multímeros pueden generarse usando técnicas químicas conocidas en la materia. Por ejemplo, los polipéptidos que se desea que estén contenidos en los multímeros pueden entrecruzarse químicamente usando moléculas enlazadoras y técnicas de optimización de longitud de moléculas enlazadoras conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). Adicionalmente, pueden generarse multímeros usando técnicas conocidas en la materia para formar uno o más entrecruzamientos intermoleculares entre los restos de cisteína localizados dentro de la secuencia de los polipéptidos que se desea que estén contenidos en el multímero (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). Adicionalmente, los polipéptidos se pueden modificar de forma rutinaria mediante la adición de cisteína o biotina en el extremo C terminal o N terminal del polipéptido y pueden aplicarse técnicas conocidas en la materia para generar multímeros que contienen uno o más de estos polipéptidos modificados (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). Adicionalmente, pueden aplicarse técnicas conocidas en la materia para generar liposomas que contienen los componentes que contienen los componentes polipeptídicos que se desea que estén contenidos en el multímero de la invención (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925).

Como alternativa, pueden generarse multímeros usando técnicas de ingeniería genética conocidas en la materia. Pueden producirse polipéptidos contenidos en multímeros usando de forma recombinante tecnología de proteína de fusión descrita en la presente memoria o conocida de otro modo en la materia (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.478.925). Pueden generarse polinucleótidos que codifican un homodímero ligando una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido con una secuencia que codifica un polipéptido enlazador y después adicionalmente con un polinucleótido sintético que codifica el producto traducido del polipéptido en la orientación inversa desde el extremo C terminal original al N terminal (sin la secuencia líder) (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Número 5.478.925). Pueden aplicarse técnicas recombinantes descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la materia para generar polipéptidos recombinantes que contienen un dominio transmembrana (o péptido señal o hidrófobo) y que pueden incorporarse por técnicas de reconstitución de membrana en liposomas (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.478.925).

#### **Usos de los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

Los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) identificados en la presente memoria pueden usarse de numerosas maneras como reactivos. La siguiente descripción debería considerarse ejemplar y utiliza técnicas conocidas.

Existe una necesidad constante para identificar nuevos marcadores cromosómicos, puesto que en la actualidad están disponibles pocos reactivos marcadores cromosómicos, basándose en datos de secuencia reales

(polimorfismos de repetición).

Brevemente, pueden mapearse secuencias en cromosomas mediante la preparación de cebadores de PCR (preferiblemente 15-25 pb) de las secuencias mostradas en SEC ID N°: o del clon depositado. Los cebadores pueden seleccionarse usando análisis informático de modo que los cebadores no abarquen más de un exón predicho en el ADN genómico. Estos cebadores pueden usarse después para exploración por PCR de híbridos celulares somáticos que contienen cromosomas humanos individuales. Solamente los híbridos que contienen el gen del Receptor de Quimiocina de proteína G humano (CCR5) que correspondiente a la SEC ID N°: 1 o al clon depositado producirán un fragmento amplificado.

De forma similar, los híbridos somáticos proporcionan un método rápido de mapeo de PCR de los polinucleótidos en cromosomas particulares. Pueden asignarse tres o más clones por día usando un termociclador sencillo. Además, puede conseguirse sublocalización de los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con paneles de fragmentos cromosómicos específicos. Otras estrategias de mapeo génico que pueden usarse incluyen hibridación *in situ*, preexploración con cromosomas seleccionados por flujo marcados y preselección por hibridación para construir bibliotecas de ADNc específico de cromosomas.

La localización cromosómica precisa de los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también puede conseguirse usando hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) de una extensión de cromosomas en metafase. Esta técnica usa polinucleótidos tan cortos como 500 ó 600 bases; sin embargo, se prefieren polinucleótidos de 2.000-4.000 pb. Para una revisión de esta técnica, véase Verma *et al.*, "Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques," Pergamon Press, Nueva York (1988).

Para mapeo de cromosomas, los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse individualmente (para marcar un cromosoma único o un sitio único en ese cromosoma) o en paneles (para marcar múltiples sitios y/o múltiples cromosomas). Los polinucleótidos preferidos corresponden a las regiones no codificantes de los ADNc o clon genómico por que las secuencias codificantes probablemente están más conservadas dentro de familias génicas, aumentando de este modo la posibilidad de hibridación cruzada durante mapeo cromosómico.

Una vez que se ha mapeado un polinucleótido en una localización cromosómica precisa, la posición física del polinucleótido puede usarse en análisis de enlace. El análisis de enlace establece herencia conjunta entre una localización cromosómica y la presentación de una enfermedad particular. (Se encuentran datos de mapeo de enfermedad, por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en línea a través de Johns Hopkins University Welch Medical Library)). Asumiendo una resolución de mapeo de una megabase y un gen por cada 20 kb, un ADNc localizado de forma precisa en una región cromosómica asociada con la enfermedad podría ser uno de 50-500 genes causantes potenciales.

De este modo, una vez que se establece la herencia conjunta, pueden examinarse las diferencias en el polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y el gen correspondiente entre individuos afectados y no afectados. Primero, se examinan alteraciones estructurales visibles en los cromosomas, tales como deleciones o traslocaciones en extensiones de cromosomas o mediante PCR. Si no existen alteraciones estructurales, se determina la presencia de mutaciones puntuales. Las mutaciones observadas en algunos o todos los individuos afectados, pero no en individuos normales, indican que la mutación puede causar la enfermedad. Sin embargo, se requiere la secuenciación completa del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y el gen correspondiente de varios individuos normales para distinguir la mutación de un polimorfismo. Si se identifica un nuevo polimorfismo, este polipéptido polimórfico puede usarse para análisis de enlace adicional.

Además, la expresión aumentada o disminuida del gen en individuos afectados en comparación con individuos no afectados puede evaluarse usando polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Cualquiera de estas alteraciones (expresión alterada, reordenamiento cromosómico o mutación) pueden usarse como un marcador de diagnóstico o pronóstico.

Se describe un método de diagnóstico útil durante el diagnóstico de un trastorno, que implica medir el nivel de expresión de polinucleótidos que codifican CCR5 en células o fluido corporal de un individuo y comparar el nivel de expresión del gen medido con un nivel convencional de nivel de expresión de polinucleótido, por lo cual un aumento o disminución en el nivel de expresión génica en comparación con el convencional es indicativo de un trastorno.

Se describe un kit para analizar muestras con respecto a la presencia de polinucleótidos cancerosos y/o proliferativos derivados de un sujeto de ensayo. El kit puede incluir al menos una sonda polinucleotídica que contiene una secuencia de nucleótidos que hibridará específicamente con un polinucleótido de CCR5 y un recipiente adecuado. El kit puede incluir dos sondas polinucleotídicas que definen una región interna del polinucleótido, teniendo cada sonda una cadena que contiene un extremo 31' mer interno a la región. Las sondas puede ser útiles como cebadores para amplificación de reacción en cadena de la polimerasa.

Cuando ya se ha realizado un diagnóstico de un trastorno de acuerdo con métodos convencionales, la presente descripción es útil como un indicador de pronóstico, por lo que los pacientes que muestran una expresión de polinucleótidos potenciada o reducida experimentarán un resultado clínico peor en relación con pacientes que

expresan el gen a un nivel más cercano al nivel convencional.

Por "medir el nivel de expresión de polinucleótido de CCR5" se pretende medir cualitativa o cuantitativamente o estimar el nivel del polipéptido de CCR5 o el nivel del ARNm que codifica el polipéptido en una primera muestra biológica directamente (por ejemplo, mediante la determinación o estimación del nivel de proteína absoluto o nivel de ARNm) o relativamente (por ejemplo, por comparación del nivel de polipéptidos o nivel de ARNm en una segunda muestra biológica). Preferiblemente, el nivel de polipéptidos o nivel de ARNm en la primera muestra biológica se mide o estima y se compara con un nivel de polipéptidos convencional o nivel de ARNm, tomándose el convencional de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o determinándose por niveles medios de una población de individuos que no tienen un trastorno. Como se entenderá en la técnica, una vez que se conoce un nivel de polipéptidos o nivel de ARNm convencional, puede usarse repetidamente como un patrón para comparación.

Por "muestra biológica" se pretende cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, fluido corporal, línea celular, cultivo tisular o cualquier otra fuente que contenga el ARNm o polipéptido de CCR5. Como se indica, las muestras biológicas incluyen fluidos corporales (tales como semen, linfa, suero, plasma, orina, fluido sinovial y fluido espinal) que contienen el polipéptido de CCR5 y cualquier otra fuente tisular que se ha descubierto que expresa el polipéptido de CCR5. Los métodos para obtener biopsias tisulares y fluidos corporales de mamíferos se conocen bien en la técnica. Cuando la muestra biológica debe incluir ARNm, la fuente preferida es una biopsia tisular.

El método o métodos proporcionados anteriormente pueden aplicarse preferiblemente en un método de diagnóstico y/o kits en los que los polinucleótidos y/o polipéptidos están unidos a un soporte sólido. En un método ejemplar, el soporte puede ser una "microplaca génica" o una "microplaca biológica" como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.837.832, 5.874.219 y 5.856.174. Además, una microplaca génica tal con polinucleótidos de CCR5 unidos puede usarse para identificar polimorfismos entre las secuencias de polinucleótidos, con polinucleótidos aislados de un sujeto de ensayo. El conocimiento de tales polimorfismos (es decir su localización, así como su existencia) sería beneficioso para identificar loci de enfermedad para muchos trastornos, incluyendo enfermedades y afecciones cancerosas. Un método tal se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.858.659 y 5.856.104.

Se describen polinucleótidos de CCR5 que se sintetizan químicamente o se reproducen como ácidos péptido nucleicos (PNA) o de acuerdo con otros métodos conocidos en la técnica. El uso de PNA serviría como la forma preferida si los polinucleótidos se incorporan en un soporte sólido o una microplaca génica. Para los fines de la presente invención un ácido péptido nucleico (PNA) es un tipo poliamida de análogo de ADN y las unidades monoméricas para adenina, guanina, timina y citosina están disponibles en el mercado (Perceptive Biosystems). Ciertos componentes de ADN, tal como fósforo, óxidos de fósforo o derivados de desoxirribosa no están presentes en los PNA. Como se describe en P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg y O. Buchardt, *Science* 254, 1497 (1991); y M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, y P. E. Nielsen, *Nature* 365, 666 (1993), los PNA se unen específicamente y de forma estrecha a hebras de ADN complementarias y no se degradan por nucleasas. De hecho, PNA se une de forma más fuerte al ADN que el ADN en sí mismo. Esto probablemente se debe a que no hay repulsión electrostática entre las dos hebras y además la cadena principal de poliamida es más flexible. Debido a esto las dobles cadenas de PNA/ADN se unen en un intervalo más amplio de condiciones rigurosas que las dobles cadenas de ADN/ADN, haciendo más fácil realizar hibridación múltiple. Pueden usarse sondas más pequeñas que con ADN debido a la fuerte unión. Además, es más probable que puedan determinarse emparejamientos erróneos de base única con hibridación de PNA/ADN debido a que un emparejamiento erróneo único en un 15-mer de PNA/ADN disminuye el punto de fusión ( $T_m$ ) en 8°-20° C frente a 4°-16° C para la doble cadena 15-mer de ADN/ADN. Además, la ausencia de grupos con carga en PNA significa que puede realizarse hibridación a fuerzas iónicas bajas y reducir las posibles interferencias por sales durante el análisis.

La presente descripción es útil para detectar cáncer en mamíferos. En particular la descripción es útil durante el diagnóstico de neoplasias proliferativas celulares patológicas que incluyen, pero sin limitación: leucemias mielógenas agudas incluyendo leucemia monocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia megacariocítica aguda y leucemia indiferenciada aguda, etc.; y leucemias mielógenas crónicas incluyendo leucemia mielomonocítica crónica, leucemia granulocítica crónica, etc. Los mamíferos preferidos incluyen monos, simios, gatos, perros, vacas, cerdos, caballos, conejos y seres humanos. Particularmente se prefieren seres humanos.

Los trastornos proliferativos celulares patológicos con frecuencia se asocian con activación inapropiada de protooncogenes. (Germann, E. P. *et al.*, "The Etiology of Acute Leukemia: Molecular Genetics and Viral Oncology," en *Neoplastic Diseases of the Blood*, Vol 1., Wiemik, P. H. *et al.* eds., 161-182 (1985)). Ahora se cree que las neoplasias resultan de la alteración cualitativa de un producto génico celular normal o de la modificación cuantitativa de expresión génica por inserción en el cromosoma de una secuencia viral, por traslocación cromosómica de un gen a una región transcrita más activamente o por algún otro mecanismo (Germann *et al.*, mencionado anteriormente). Es probable que la expresión mutada o alterada de genes específicos esté implicada en la patogénesis de algunas leucemias, entre otros tipos tisulares y celulares. (Germann *et al.*, mencionado anteriormente) de hecho, los homólogos humanos de los oncogenes implicados en algunas neoplasias animales se han amplificado o traslocado en algunos casos de leucemia y carcinoma humanos (Germann *et al.*, mencionado anteriormente)

Por ejemplo, la expresión de c-myc está altamente amplificada en la línea celular de leucemia no linfocítica HL-60. Cuando se inducen químicamente las células HL-60 para detener la proliferación, se descubre que el nivel de c-myc está regulado de forma negativa (Publicación Internacional Número WO 91/15580). Sin embargo, se ha mostrado que la exposición de células HL-60 a una construcción de ADN que es complementaria al extremo 5' de c-myc o c-myb bloquea la traducción de los ARNm correspondientes que regulan negativamente la expresión de las proteínas c-myc o c-myb y causa detención de la proliferación celular y diferenciación de las células tratadas (Publicación Internacional Número WO 91/15580; Wickstrom *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 1028 (1988); Anfossi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3379 (1989)). Sin embargo, el experto en la materia apreciará que la utilidad de la presente descripción no se limitaría al tratamiento de enfermedades, trastornos y/o afecciones proliferativas de células y tejidos hematopoyéticos a la luz de las numerosas células y tipos celulares de diversos orígenes que se sabe que muestran fenotipos proliferativos.

Además de lo anterior, un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede usarse para controlar la expresión génica a través de formación de triple hélice o ADN o ARN antisentido. Las técnicas antisentido se analizan, por ejemplo, en Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). La formación de triple hélice se analiza en, por ejemplo, Lee *et al.*, Nucleic Acids Research 6: 3073 (1979); Cooney *et al.*, Science 241: 456 (1988); y Dervan *et al.*, Science 251: 1360 (1991). Ambos métodos se basan en la unión del polinucleótido con un ADN o ARN complementario. Para estas técnicas, los polinucleótidos preferidos habitualmente son oligonucleótidos de 20 a 40 bases de longitud y complementarios a la región del gen implicado en transcripción (triple hélice véase Lee *et al.*, Nucl. Acids Res. 6: 3073 (1979); Cooney *et al.*, Science 241: 456 (1988); y Dervan *et al.*, Science 251: 1360 (1991)) o al ARNm en sí mismo (antisentido - Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); Oligodeoxy-nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). La formación de triple hélice da como resultado de forma óptima una detención de la transcripción de ARN a partir de ADN, mientras que la hibridación de ARN antisentido bloquea la traducción de una molécula de ARNm en polipéptido. Ambas técnicas son eficaces en sistemas modelo y la información descrita en la presente memoria puede usarse para diseñar polinucleótidos antisentido o de triple hélice en un intento de tratar o prevenir la enfermedad.

Los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también son útiles en terapia génica. Un objetivo de la terapia génica es insertar un gen normal en un organismo que tiene un gen defectuoso, en un intento de corregir el defecto genético. El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) ofrece un medio de dirigir dichos defectos genéticos de una manera altamente precisa. Otro objetivo es insertar un gen nuevo que no estaba presente en el genoma del hospedador, produciendo de este modo un nuevo rasgo en la célula hospedadora.

Los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también son útiles para identificar individuos a partir de muestras biológicas mínimas. El ejército de Estados Unidos, por ejemplo, está considerando el uso del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para la identificación de su personal. En esta técnica, el ADN genómico de un individuo se digiere con una o más enzimas de restricción y se ensaya en una transferencia de Southern para producir bandas únicas para identificar al personal. Este método no padece las limitaciones actuales de "Chapas de Identificación" que pueden perderse, cambiarse o robarse, haciendo difícil la identificación concluyente. Los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse como marcadores de ADN adicionales para RFLP.

Los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también pueden usarse como una alternativa a RFLP, determinando la secuencia de ADN real base por base de partes seleccionadas del genoma de un individuo. Estas secuencias pueden usarse para preparar cebadores de PCR para amplificar y aislar dicho ADN seleccionado, que puede después secuenciarse. Usando esta técnica puede identificarse a los individuos debido a que cada individuo tendrá un conjunto único de secuencias de ADN. Una vez que se ha establecido una base de datos de ID única para un individuo, la identificación concluyente de ese individuo, vivo o muerto, puede realizarse a partir de muestras de tejido extremadamente pequeñas.

La biología forense también se beneficia del uso de técnicas de identificación basada en ADN como se describe en la presente memoria. Las secuencias de ADN tomadas de muestras biológicas muy pequeñas tales como tejidos, por ejemplo, pelo o piel, o fluidos corporales, por ejemplo, sangre, saliva, semen, fluido sinovial, fluido amniótico, leche materna, linfa, esputo pulmonar o tensioactivo, orina, materia fecal, etc., pueden amplificarse usando PCR. En una técnica de la materia anterior, las secuencias génicas amplificadas a partir de loci polimórficos, tales como gen de DQa del HLA de clase II, se usan en biología forense para identificar individuos (Erlich, H., PCR Technology, Freeman y Co. (1992). Una vez que se han amplificado estos loci polimórficos específicos, se digieren con una o más enzimas de restricción, produciendo un conjunto identificador de bandas en una transferencia de Southern ensayada con ADN que corresponde al gen de DQa del HLA de clase II. De forma similar, los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse como marcadores polimórficos para fines forenses.

También existe la necesidad de reactivos capaces de identificar la fuente de un tejido particular. Tal necesidad surge, por ejemplo, en ciencia forense cuando se tiene un tejido de origen desconocido. Los reactivos apropiados pueden comprender, por ejemplo, sondas de ADN o cebadores específicos para tejido particular preparados de secuencias del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los paneles de dichos reactivos pueden identificar tejido por especies y/o por tipo de órgano. De una manera similar, estos reactivos pueden usarse para explorar

cultivos titulares con respecto a contaminación.

Debido a que el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se expresa en macrófagos y linfocitos T de memoria, los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) son útiles como sondas de hibridación para identificación diferencial del tejido o los tejidos o el tipo o tipos celulares presentes en una muestra biológica. De forma similar, los polipéptidos y anticuerpos dirigidos a polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) son útiles para proporcionar sondas inmunológicas para identificación diferencial del tejido o los tejidos o el tipo o los tipos celulares. Además, para varias enfermedades, trastornos y/o afecciones de los anteriores tejidos o células, o en los que estas células desempeñan un papel, pueden detectarse niveles significativamente mayores o menores de expresión del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en ciertos tejidos (por ejemplo, tejidos cancerosos y lesionados) o fluidos corporales (por ejemplo, suero, plasma, orina, fluido sinovial o fluido espinal) tomados de un individuo que tiene dicho trastorno, en relación con un nivel de expresión del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) "convencional", es decir, el nivel de expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en tejido sano de un individuo que no tiene el trastorno relacionado con el sistema inmune.

De este modo, la invención proporciona un método de diagnóstico de un trastorno, que implica: (a) ensayar el nivel de expresión del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en células o fluidos corporales de un individuo; (b) comparar el nivel de expresión del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con un nivel de expresión del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), por lo que un aumento o disminución en el nivel de expresión del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) ensayado en comparación con el nivel de expresión convencional es indicativo de un trastorno en el sistema inmune o relacionado con el sistema inmune.

También se describe un método para usar los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes de los mismos como una vacuna para inducir una respuesta inmune a Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). También se describe un método para usar polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes de los mismos como una vacuna de ADN para inducir una respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpos) ante Receptor de Quimiocina de proteína G. Se describe un método para usar polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de nucleótidos de uno o más bucles extracelulares del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 89-102, 167-195 y/o 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna de ADN para inducir respuesta inmune al Receptor de Quimiocina de proteína G. Se describe un método para usar polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de nucleótidos del primer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, aminoácidos 89-102 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna de ADN para inducir una respuesta inmune a Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Se describe un método para usar los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de nucleótidos del segundo bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 167-195 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna de ADN para inducir una respuesta inmune al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). También se describe un método para usar polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprenden la secuencia de nucleótidos del tercer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna de ADN para inducir una respuesta inmune al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Se describe un método para usar polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprenden la secuencia de nucleótidos de uno o más bucles extracelulares del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 89-102, 167-195 y/o 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna de ADN para inducir una respuesta inmune humoral al Receptor de Quimiocina de proteína G. Se describe un método para usar polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprenden la secuencia de nucleótidos del primer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, aminoácidos 89-102 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna de ADN para inducir una respuesta inmune humoral al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Se describe un método para usar polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de nucleótidos del segundo bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 167-195 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna de ADN para inducir una respuesta inmune humoral al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Además, se describe un método para usar polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprenden la secuencia de nucleótidos del tercer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna de ADN para inducir una respuesta inmune humoral al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

También se describe una vacuna de ADN que comprende, o como alternativa que consiste en, un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmento o variante del mismo. Se describe una vacuna de ADN que comprende, o como alternativa que consiste en, un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que codifica la secuencia de nucleótidos de uno o más bucles extracelulares del Receptor de Quimiocina de

proteína G (CCR5) (es decir, aminoácidos 89-102, 167-195 y/o 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)). Se describe una vacuna de ADN que comprende, o como alternativa que consiste en, un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que codifica la secuencia de nucleótidos del primer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 89-102 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)). Se describe una vacuna de ADN que comprende, o como alternativa que consiste en, un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que codifica la secuencia de nucleótidos del segundo bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 167-195 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)). Se describe una vacuna de ADN que comprende, o como alternativa que consiste en, un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que codifica la secuencia de nucleótidos del tercer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)).

Las vacunas descritas anteriormente pueden administrarse a un animal, incluyendo seres humanos, para prevenir infección viral. Las vacunas descritas anteriormente pueden administrarse a un animal, incluyendo seres humanos, para prevenir infección por VIH. Las vacunas descritas anteriormente pueden administrarse a un animal, incluyendo seres humanos, para prevenir infección por poxvirus. Las vacunas descritas anteriormente pueden administrarse a un animal, incluyendo seres humanos, para prevenir la infección por citomegalovirus.

Al menos, los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse como marcadores de peso molecular en geles de Southern, como sondas de diagnóstico para la presencia de un ARNm específico en un tipo celular particular, como una sonda para "sustraer" secuencias conocidas en el procedimiento de descubrimiento de nuevos polinucleótidos, para seleccionar y preparar oligómeros para unión a una "microplaca génica" u otro soporte, para inducir anticuerpos anti-ADN usando técnicas de inmunización de ADN y como un antígeno para inducir una respuesta inmune.

#### **Usos de Polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse de numerosas formas. La siguiente descripción debería considerarse ejemplar y utiliza técnicas conocidas.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para ensayar niveles de proteínas en una muestra biológica usando técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, la expresión de proteínas en tejidos puede estudiarse con métodos inmunohistoquímicos clásicos (Jalkanen, M., *et al.*, J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M., *et al.*, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para la detección de expresión de genes de proteínas incluyen inmunoensayos tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Se conocen en la técnica marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados e incluyen marcadores enzimáticos, tales como glucosa oxidasa y radioisótopos, tales como yodo (125I, 121I), carbono (14C), azufre (35S), tritio (3H), indio (112In) y tecnecio (99mTc) y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Además de ensayar los niveles de proteína G en una muestra biológica, las proteínas también pueden detectarse *in vivo* mediante formación de imágenes. Los marcadores o etiquetas de anticuerpos para formación de imágenes *in vivo* de proteínas incluyen los detectables por radiografía, NMR o ESR. Para radiografías, los marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero no son excesivamente perjudiciales para el sujeto. Los marcadores adecuados para NMR y ESR incluyen los que tienen un espín característico detectable, tal como deuterio, que pueden incorporarse en el anticuerpo mediante el marcaje de nutrientes para el hibridoma relevante.

Un anticuerpo específico de proteína o fragmento de anticuerpo que se ha marcado con un resto de formación de imágenes detectable apropiado, tal como un radioisótopo (por ejemplo 131I, 112In, 99mTc), una sustancia radiopaca o un material detectable por resonancia magnética nuclear, se introduce (por ejemplo, por vía parenteral, vía subcutánea o vía intraperitoneal) en el mamífero. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes usado determinará la cantidad de restos de formación de imágenes necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En caso de un resto radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada normalmente variará de aproximadamente 5 a 20 milicurios de 99 mTc. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado se acumulará entonces preferentemente en la localización de células que contienen la proteína específica. La formación de imágenes de tumor *in vivo* se describe en S. W. Burchiel *et al.*, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

De este modo, se describe un método de diagnóstico de un trastorno, que implica (a) ensayar la expresión del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en células o fluido corporal de un individuo; (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión del gen convencional, por lo que un aumento o disminución en el nivel de expresión del gen del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) ensayado en comparación con el nivel de expresión convencional es indicativo de un trastorno. Con respecto al cáncer, la presencia de una cantidad relativamente alta de transcrito en tejido de biopsia de un individuo puede



indicar una predisposición para el desarrollo de la enfermedad o puede proporcionar un medio para detectar la enfermedad antes de la aparición de los propios síntomas clínicos. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir a los profesionales de la salud emplear medidas preventivas o tratamiento agresivo más temprano previniendo de este modo el desarrollo o progresión adicional del cáncer.

- 5 Además, los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar enfermedad. Por ejemplo, se puede administrar a los pacientes polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un intento de reemplazar niveles ausentes o reducidos del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, insulina), para complementar niveles ausentes o reducidos de un polipéptido diferente (por ejemplo, hemoglobina S para hemoglobina B, SOD, catalasa, proteínas de reparación de ADN), para inhibir la actividad de un polipéptido (por ejemplo, un oncogén o supresor de tumores), para activar la actividad de un polipéptido (por ejemplo, mediante unión a un receptor), para reducir la actividad de un receptor unido a membrana mediante competición con él por ligando libre (por ejemplo, receptores de TNF solubles usados en la reducción de inflamación), o para proporcionar una respuesta deseada (por ejemplo, inhibición del crecimiento de vasos sanguíneos, potenciación de la respuesta inmune a células o tejidos proliferativos).
- 10
- 15 De forma similar, los anticuerpos dirigidos a polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar enfermedad. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo dirigido a un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede unir y reducir la sobreproducción del polipéptido. De forma similar, la administración de un anticuerpo puede activar el polipéptido, tal como mediante unión con un polipéptido unido a membrana (receptor).
- 20 Se describe un método para usar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes como una vacuna para inducir una respuesta inmune a Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). También se describe un método para usar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos o variantes del mismo como una vacuna para inducir una respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpos) a Receptor de Quimiocina de proteína G. Se describe un método para usar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de aminoácidos de uno o más bucles extracelulares del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 89-102, 167-195 y/o 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna para inducir una respuesta inmune al Receptor de Quimiocina de proteína G. Se describe un método para usar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de aminoácidos del primer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, aminoácidos 89-102 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna para inducir una respuesta inmune al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Se describe un método para usar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de aminoácidos del segundo bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 167-195 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna para inducir una respuesta inmune al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). También se describe un método para usar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de aminoácidos del tercer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna para inducir una respuesta inmune al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).
- 25
- 30
- 35
- 40 Se describe un método para usar polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de aminoácidos de uno o más bucles extracelulares del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, aminoácidos 89-102, 167-195 y/o 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna para inducir una respuesta inmune humoral al Receptor de Quimiocina de proteína G. También se describe un método para usar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de aminoácidos del primer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 89-102 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna para inducir una respuesta inmune humoral para el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Se describe un método para usar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de aminoácidos del segundo bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, aminoácidos 167-195 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna para inducir una respuesta inmune humoral al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Se describe un método para usar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende la secuencia de aminoácidos del tercer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)) como una vacuna para inducir una respuesta inmune humoral al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).
- 45
- 50
- 55

- 60 Además, se describe una vacuna que comprende, o como alternativa que consiste en, un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmento o variante del mismo. Se describe una vacuna que comprende, o como alternativa que consiste en, un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que codifica la secuencia de aminoácidos de uno o más bucles extracelulares del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, aminoácidos 89-102, 167-195 y/o 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon

depositado (SEC ID N°: 22)). Se describe una vacuna que comprende, o como alternativa que consiste en, un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que codifica la secuencia de aminoácidos del primer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, aminoácidos 89-102 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)). También se describe una vacuna que comprende, o como alternativa que consiste en, un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que codifica la secuencia de aminoácidos del segundo bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, aminoácidos 167-195 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)). Se describe una vacuna que comprende, o como alternativa que consiste en, un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que codifica la secuencia de aminoácidos del tercer bucle extracelular del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (es decir, los aminoácidos 261-274 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado (SEC ID N°: 22)).

Las vacunas descritas anteriormente pueden administrarse a un animal, incluyendo seres humanos, para prevenir infección viral. Las vacunas descritas anteriormente pueden administrarse a un animal, incluyendo seres humanos, para prevenir infección por VIH. Las vacunas descritas anteriormente pueden administrarse a un animal, incluyendo seres humanos, para prevenir infección por poxvirus. Las vacunas descritas anteriormente pueden administrarse a un animal, incluyendo seres humanos, para prevenir infección por citomegalovirus.

Al menos, los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse como marcadores de peso molecular en geles de SDS-PAGE o en columnas de filtración de gel de tamiz molecular usando métodos bien conocidos para los expertos en la materia. Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también pueden usarse para inducir anticuerpos, que a su vez se usan para medir la expresión proteica de una célula recombinante, como un modo de evaluar la transformación de la célula hospedadora. Además, los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para ensayar las siguientes actividades biológicas.

#### **Actividades Biológicas del Receptor de Quimiocina de proteína G**

Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden usarse en pruebas para ensayar con respecto a una o más actividades biológicas. Si los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) muestran actividad en un ensayo particular, es probable que el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueda estar implicado en las enfermedades asociadas con actividad biológica. Por lo tanto, el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) podría usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar la enfermedad asociada.

Los ligandos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluyen MIP-1alfa, MIP-1beta, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, RANTES, y Eotaxina. El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también es un correceptor principal para VIH y puede reconocerse por otros agentes infecciosos, tales como otros virus, para permitir la entrada en la célula. De este modo, los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), polipéptidos, agonistas y antagonistas de los mismos son útiles para el tratamiento, prevención y diagnóstico de enfermedades asociadas con cualquiera de los ligandos anteriores, tales como las enfermedades descritas en la presente memoria. En realizaciones altamente preferidas, los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), polipéptidos, agonistas y antagonistas de los mismos son útiles para el tratamiento, prevención y diagnóstico de infección por VIH y/o afecciones asociadas con infección por VIH como se describe en la sección titulada "Tratamiento y prevención de infección por VIH".

El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se expresa predominantemente en monocitos y linfocitos T. La expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se encuentra en células de microglía, dendríticas y algunas células madre hematopoyéticas. La activación del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en macrófagos y linfocitos por ligandos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (especialmente, RANTES, MIP-1beta y MIP-1alfa) principalmente da como resultado quimioatracción de estos tipos celulares a sitios de inflamación, con frecuencia sitios de infección. El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también puede estar implicado en la inducción de quimiotaxis en células NK, eosinófilos y basófilos. La activación del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en macrófagos y linfocitos por ligandos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (especialmente, RANTES, MIP-1beta y MIP-1alfa) puede promover las interacciones entre linfocitos T y células de presentación de antígenos (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos y linfocitos B). El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también puede estar implicado en adhesión y migración de células a través de vasos sanguíneos mediante moléculas de adhesión en tránsito al sitio de inflamación. En consecuencia, pueden usarse composiciones (incluyendo polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la invención y fragmentos y variantes de los mismos) en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos asociados con defectos en las actividades biológicas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) tales como las descritas anteriormente.

Las composiciones (incluyendo polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la invención y fragmentos y variantes de los mismos) pueden usarse en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos relacionados con función inmune (por ejemplo, infección viral (especialmente infección por VIH, infección

por poxvirus y/o infección por citomegalovirus); enfermedades autoinmunes (tales como Artritis Reumatoide, enfermedad de Grave y Esclerosis Múltiple); quimiotaxis de células inmunes; afecciones inflamatorias; y/o como se describe en “Actividad Inmune”) y trastornos neoplásicos tales como los descritos bajo “Trastornos Hiperproliferativos” posteriormente.

- 5 Los polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (incluyendo anticuerpos) son útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos asociados con actividades que incluyen, pero sin limitación, quimioatracción de células inmunes, activación de células inmunes, presentación de antígenos, inflamación e infección viral.

- 10 De forma más general, los polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (incluyendo anticuerpos) pueden ser útiles para el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos descritos posteriormente.

- 15 **Tratamiento y Prevención de Infección por VIH.** Como CCR5 es correceptor de VIH para VIH trópico para macrófagos tiene un impacto importante en la infección por VIH y progresión de la enfermedad, especialmente de forma temprana en la infección por VIH cuando el VIH es predominantemente de las cepas tropicales para macrófago R5. Por lo tanto, los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas (incluyendo anticuerpos) o antagonistas (incluyendo anticuerpos) del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden usarse para diagnosticar, tratar, prevenir y/o aliviar la infección por VIH.

- 20 En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención pueden usarse para diagnosticar, tratar, prevenir y/o aliviar las enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con infección por VIH. Las afecciones asociadas con infección por VIH incluyen, pero sin limitación, neumonía por *Pneumocystis carinii*, caquexia, sarcoma de Kaposi, candidiasis Esofágica y Candidiasis pulmonar, complejo de *Mycobacterium avium-intracelular*, extrapulmonar o diseminado, *Mycobacterium kansasii* extrapulmonar o diseminado, enfermedad de Citomegalovirus, retinitis por Citomegalovirus, encefalopatía por VIH, enfermedad de Herpes simple, Cryptococcosis extrapulmonar, Toxoplasmosis del cerebro, Criptosporidiosis crónica, Criptosporidiosis intestinal crónica, linfoma inmunoblástico, *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar, *Mycobacterium tuberculosis* pulmonar, enfermedad *Micobacteriana*, enfermedad *micobacteriana* extrapulmonar, linfoma de Burkitt, leucoencefalopatía multifocal progresiva, linfoma cerebral primario, isosporiasis crónica, Isosporiasis intestinal crónica, Coccidioidomicosis extrapulmonar o diseminada, septicemia por Salmonella, infecciones bacterianas recurrentes o múltiples, carcinoma cervical invasivo, histoplasmosis extrapulmonar o diseminada, neumonía intersticial linfoide, hiperplasia linfoide pulmonar, neumonía recurrente, demencia severa, de inmunosupresión y/o de SIDA.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención pueden usarse para diagnosticar, tratar, prevenir y/o aliviar infecciones oportunistas (por ejemplo, infección por el virus del Herpes, infección por *Mycobacterium tuberculosis* o infección por citomegalovirus) asociadas con infección por VIH.

- 35 En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención pueden usarse para diagnosticar, tratar, prevenir y/o aliviar infección oportunista por *Pneumocystis carinii* asociada con infección por VIH.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención pueden usarse para diagnosticar, tratar, prevenir y/o aliviar sarcoma de Kaposi asociado con infección por VIH.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención pueden usarse para diagnosticar, tratar, prevenir y/o aliviar las etapas tempranas de infección por VIH.

- 40 En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención pueden usarse para diagnosticar, tratar, prevenir y/o aliviar las etapas tempranas de infección por VIH.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención pueden usarse para diagnosticar, tratar, prevenir y/o aliviar las etapas tardías de infección por VIH.

- 45 En otras realizaciones más, los anticuerpos de la invención pueden usarse como un método profiláctico para prevenir la infección por VIH en personas que tienen una pareja sexual infectada por VIH o personas con razones para creer que se han expuesto a VIH (por ejemplo, personas que se han aplicado una aguja que había estado previamente en contacto con el fluido biológico de otro individuo (o animal) o víctimas de violación).

En realizaciones más, los anticuerpos de la invención pueden usarse como un método profiláctico para evitar transmisión materno fetal del VIH.

- 50 **Actividad Inmune.** Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades, trastornos y/o afecciones del sistema inmune, mediante la activación o inhibición de la proliferación, diferenciación o movilización (quimiotaxis) de células inmunes. Las células inmunes se desarrollan a través de un proceso denominado hematopoyesis, que produce células mieloides (plaquetas, glóbulos rojos, neutrófilos y macrófagos) y linfoides (linfocitos B y T) a partir de células madre pluripotenciales. La etiología de estas
- 55

enfermedades, trastornos y/o afecciones inmunes puede ser genética, somática, tal como cáncer o algunas enfermedades autoinmunes, trastornos y/o afecciones, adquiridos (por ejemplo por quimioterapia o toxinas) o infecciosos. Además, los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse como un marcador o detector de una enfermedad o trastorno particular del sistema inmune.

Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse para modular la actividad hematopoyética (la formación de células sanguíneas). Por ejemplo, los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse para aumentar la cantidad de todas o subconjuntos de las células sanguíneas, tales como por ejemplo, eritrocitos, linfocitos (linfocitos B o T), células mieloides (por ejemplo, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, macrófagos) y plaquetas. La capacidad de reducir la cantidad de células sanguíneas o subconjuntos de células sanguíneas puede ser útil en la prevención, detección, diagnóstico y/o tratamiento de anemias y leucopenias descritas posteriormente. Como alternativa, los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas antagonistas de los mismos pueden usarse para reducir la cantidad de todas o subconjuntos de las células sanguíneas tales como, por ejemplo, eritrocitos, linfocitos (linfocitos B o T), células mieloides (por ejemplo, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, macrófagos) y plaquetas. La capacidad de disminuir la cantidad de células sanguíneas o subconjuntos de células sanguíneas puede ser útil en la prevención, detección, diagnóstico y/o tratamiento de leucocitosis, tales como, por ejemplo, eosinofilia.

Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden ser útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de enfermedades, trastornos y/o afecciones de células hematopoyéticas. Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), podrían usarse para aumentar la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas, incluyendo las células madre pluripotenciales, en un intento de tratar o prevenir esas enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con una disminución en ciertos (o muchos) tipos de células hematopoyéticas. Los ejemplos de síndromes de deficiencia inmunológica incluyen, pero sin limitación, enfermedades, trastornos y/o afecciones de proteínas sanguíneas (por ejemplo agammaglobulinemia, disgammaglobulinemia), ataxia telangiectasia, inmunodeficiencia variable común, Síndrome de DiGeorge, infección por VIH, infección por HTLV-BLV, síndrome de deficiencia de adhesión de leucocitos, linfopenia, disfunción bactericida de fagocitos, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), Trastorno de Wiskott-Aldrich, anemia, trombocitopenia, leucopenia, neutropenia, anemia o hemoglobinuria. Como alternativa, los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos podrían usarse para aumentar la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas, incluyendo las células madre pluripotenciales, en un intento de tratar o prevenir las enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con un aumento en ciertos (o muchos) tipos de células hematopoyéticas, incluyendo sin limitación, histiocitosis.

Un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o polinucleótidos, anticuerpos, agonistas o antagonistas que corresponden a ese polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden usarse para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmune y/o inhibir o potenciar una respuesta inmune generada por células asociadas con el tejido o los tejidos en los que se expresa el polipéptido.

Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles en el tratamiento, prevención, diagnóstico y/o pronóstico de inmunodeficiencias, incluyendo inmunodeficiencias congénitas y adquiridas. Los ejemplos de inmunodeficiencias de linfocitos B en los que los niveles de inmunoglobulina, función de linfocitos B y/o números de linfocitos B disminuyen incluyen: agammaglobulinemia ligada a X (enfermedad de Bruton), agammaglobulinemia infantil ligada a X, inmunodeficiencia ligada a X con hiper IgM, inmunodeficiencia no ligada a X con hiper IgM, síndrome linfoproliferativo ligado a X (XLP), agammaglobulinemia que incluye agammaglobulinemia congénita y adquirida, agammaglobulinemia de aparición adulta, agammaglobulinemia de aparición tardía, disgammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia no especificada, agammaglobulinemia autosómica, deficiencia de IgM Selectiva, deficiencia de IgA selectiva, deficiencias de la subclase IgG selectivas, deficiencia de subclase IgG (con o sin deficiencia de IgA), deficiencia de Ig con IgM aumentado, deficiencia de IgG e IgA con IgM aumentado, deficiencia de anticuerpos con Ig normales o elevadas, delecciones de cadena pesada de Ig, deficiencia de cadena kappa, trastornos linfoproliferativo de linfocitos B (BLPD), inmunodeficiencia variable común (CVID), inmunodeficiencia variable común (CVI) (adquirida) e hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia.

La ataxia-telangiectasia o afecciones asociadas con ataxia-telangiectasia pueden tratarse, prevenirse, diagnosticarse y/o pronosticarse usando los polipéptidos o polinucleótidos y/o antagonistas o agonistas de los mismos.

Los ejemplos de inmunodeficiencias congénitas en las que la función de linfocitos T y/o linfocitos B y/o su número disminuye incluyen, sin limitación: anomalía de DiGeorge, inmunodeficiencias combinadas graves (SCID) (incluyendo, pero sin limitación SCID ligada a X, SCID recesiva autosómica, deficiencia de adenosina desaminasa, deficiencia de fosforilasa de nucleósido de purina (PNP), deficiencia de MHC de Clase II (síndrome de linfocito desnudo), síndrome de Wiskott-Aldrich y ataxia telangiectasia), hipoplasia tímica, síndrome del tercer y cuarto

divertículo faríngeo, deleción de 22 a 11.2, candidiasis mucocutánea crónica, deficiencia en células citolíticas (NK), linfocitopenia T CD4+ idiopática, inmunodeficiencia con defecto de linfocitos T predominante (no especificado) e inmunodeficiencia no especificada de inmunidad mediada por células.

- 5 La anomalía de DiGeorge o afecciones asociadas con la anomalía de DiGeorge pueden tratarse, prevenirse, diagnosticarse y/o pronosticarse usando polipéptidos o polinucleótidos o antagonistas o agonistas de los mismos.

- 10 Otras inmunodeficiencias que pueden tratarse, prevenirse, diagnosticarse y/o pronosticarse usando polipéptidos o polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen, pero sin limitación, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de Chédiak-Higashi, deficiencia de mieloperoxidasa, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de leucocitos, síndrome linfoproliferativo ligado a X (XLP), deficiencia de adhesión de leucocitos, deficiencias de componente del complemento (incluyendo deficiencias de C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 y/o C9), disgenesia reticular, aplasia-alinfoplasia tímica, inmunodeficiencia con timoma, leucopenia congénita grave, displasia con inmunodeficiencia, neutropenia neonatal, enanismo de extremidades cortas e inmunodeficiencia combinada con síndrome de Nezelof con Ig.

- 15 Las inmunodeficiencias y/o afecciones asociadas con las inmunodeficiencias indicadas anteriormente pueden tratarse, prevenirse, diagnosticarse y/o pronosticarse usando polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos.

- 20 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o antagonistas o agonistas de los mismos podrían usarse como un agente para potenciar la inmunorrespuesta entre individuos inmunodeficientes. Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos podrían usarse como un agente para potenciar la inmunorrespuesta entre individuos inmunodeficientes para linfocitos B y/o linfocitos T.

- 25 Además, los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también se pueden usar para modular actividad hemostática (la detención del sangrado) o trombolítica (formación de coágulo). Por ejemplo, aumentando la actividad hemostática o trombolítica, los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) podrían usarse para tratar o prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones de la coagulación de la sangre (por ejemplo, afibrinogenemia, deficiencias de factor), enfermedades, trastornos y/o afecciones de plaquetas sanguíneas (por ejemplo trombocitopenia) o heridas resultantes de traumatismo, cirugía u otras causas. Como alternativa, los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que pueden disminuir la actividad hemostática o trombolítica podrían usarse para inhibir o disolver coágulos. Estas moléculas podrían ser importantes en el tratamiento o prevención de ataques al corazón (infarto), apoplejías o cicatrización.

- 35 Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), también pueden ser útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de enfermedades, trastornos y/o afecciones autoinmunes. Muchas enfermedades, trastornos y/o afecciones autoinmunes resultan del reconocimiento inapropiado de material propio como ajeno por células inmunes. Este reconocimiento inapropiado da como resultado una respuesta inmune que conduce a la destrucción del tejido hospedador.

- 40 Por lo tanto, la administración de polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que pueden inhibir una respuesta inmune, particularmente la proliferación, diferenciación o quimiotaxis de linfocitos T, puede ser una terapia eficaz en la prevención de enfermedades, trastornos y/o afecciones autoinmunes.

- 45 Los ejemplos de enfermedades, trastornos y/o afecciones autoinmunes que pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse o detectarse mediante Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluyen, pero sin limitación: Enfermedad de Addison, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípido, artritis reumatoide, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, glomerulonefritis, Síndrome de Goodpasture, Enfermedad de Graves, Esclerosis Múltiple, Miastenia Grave, Neuritis, Oftalmia, Penfigoide Ampollar, Pénfigo, Poliendocrinopatías, Púrpura, Enfermedad de Reiter, Síndrome de la Persona Rígida, Tiroiditis Autoinmune, Lupus Eritematoso Sistémico, Inflamación Pulmonar Autoinmune, Síndrome de Guillain-Barre, diabetes melitus insulín dependiente y enfermedad ocular inflamatoria autoinmune. La presente invención se refiere al uso de los anticuerpos como se define en las reivindicaciones para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de artritis reumatoide.

- 55 De forma similar, las reacciones alérgicas y afecciones, tales como asma (particularmente asma alérgico) u otros problemas respiratorios, también pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse por polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G. Además estas moléculas pueden usarse para tratar anafilaxis, hipersensibilidad a una molécula antigénica o incompatibilidad de grupos sanguíneos.

Adicionalmente, los polipéptidos o polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o

antagonistas de los mismos, pueden usarse para tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar reacciones alérgicas mediadas por IgE. Tales reacciones alérgicas incluyen, pero sin limitación, asma, rinitis y eczema. Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse para modular concentraciones de IgE *in vitro* o *in vivo*.

- 5 Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden usarse también para tratar, prevenir y/o diagnosticar rechazo de órganos o enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). El rechazo de órganos se produce por destrucción de células inmunes del hospedador del tejido transplantado a través de una respuesta inmune. De forma similar, una respuesta inmune también está implicada en GVHD, pero, en este caso, las células inmunes trasplantadas ajenas destruyen los tejidos hospedadores. La administración de polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), que inhibe una respuesta inmune, particularmente la proliferación, diferenciación o quimiotaxis de linfocitos T, puede ser una terapia eficaz en la prevención del rechazo de órganos o GVHD. Los polipéptidos, anticuerpos o polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas de los mismos, que inhiben una respuesta inmune, particularmente la activación, proliferación, diferenciación o quimiotaxis de linfocitos T, puede ser una terapia eficaz en la prevención de rechazo de xenotrasplante hiperagudo y alérgico experimental.

- De forma similar, también pueden usarse los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para modular la inflamación. Por ejemplo, puesto que los polipéptidos, anticuerpos o polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas pueden inhibir la activación, proliferación y/o diferenciación de células implicadas en una respuesta inflamatoria, estas moléculas pueden usarse para prevenir y/o tratar afecciones inflamatorias crónicas y agudas. Tales afecciones inflamatorias incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, inflamación asociada con infección (por ejemplo, choque séptico, sepsis o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), lesión de reperusión por isquemia, mortalidad por endotoxina, rechazo hiperagudo mediado por complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citocina o quimiocina, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, sobreproducción de citocinas (por ejemplo, TNF o IL-1), trastornos respiratorios (por ejemplo, asma y alergia); trastornos gastrointestinales (por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino); cánceres (por ejemplo, gástrico, de ovario, de pulmón, de vejiga, de hígado y de mama); trastornos del SNC (por ejemplo, esclerosis múltiple; lesión cerebral isquémica y/o apoplejía, lesión cerebral traumática, trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer); demencia relacionada con SIDA y enfermedad por priones); trastornos cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis, miocarditis, enfermedad cardiovascular y complicaciones de derivación cardiopulmonar); así como muchas enfermedades, afecciones y trastornos adicionales que se caracterizan por inflamación (por ejemplo, hepatitis, artritis reumatoide, gota, traumatismo, pancreatitis, sarcoidosis, dermatitis, lesión por reperusión de isquemia renal, enfermedad de Grave, lupus eritematoso sistémico, diabetes melitus y rechazo de trasplante alogénico).

- Debido a que la inflamación es un mecanismo de defensa fundamental, los trastornos inflamatorios pueden afectar prácticamente a cualquier tejido del cuerpo. En consecuencia, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la invención, así como agonistas o antagonistas de los mismos, tienen usos en el tratamiento de trastornos inflamatorios específicos de tejido, incluyendo, pero sin limitación, adenitis, alveolitis, angiolecistitis, apendicitis, balanitis, blefaritis, bronquitis, bursitis, carditis, celulitis, cervicitis, colecistitis, corditis, coclitis, colitis, conjuntivitis, cistitis, dermatitis, diverticulitis, encefalitis, endocarditis, esofagitis, eustaquitis, fibrositis, foliculitis, gastritis, gastroenteritis, gingivitis, glositis, hepatoesplenitis, queratitis, labirintitis, laringitis, linfangitis, mastitis, otitis media, meningitis, metritis, mucitis, miocarditis, miositis, miringitis, nefritis, neuritis, orquitis, osteocondritis, otitis, pericarditis, peritendonitis, peritonitis, faringitis, flebitis, poliomieltitis, prostatitis, pulpitis, retinitis, rinitis, salpingitis, escleritis, esclerocoroiditis, escrotitis, sinusitis, espondilitis, esteatitis, estomatitis, sinovitis, siringitis, tendonitis, tonsilitis, uretritis y vaginitis.

Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles como un agente para mejorar la migración, fagocitosis, producción de superóxidos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos.

- 50 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por o asociados con números aumentados o reducidos de glóbulos blancos. Se produce leucopenia cuando el número de glóbulos blancos disminuye por debajo de lo normal. Las leucopenias incluyen, pero sin limitación, neutropenia y linfocitopenia. Un aumento en el número de linfocitos blancos en comparación con lo normal se conoce como leucocitosis. El cuerpo genera números mayores de glóbulos blancos durante una infección. De este modo, la leucocitosis puede simplemente ser un parámetro fisiológico normal que refleja una infección. Como alternativa, la leucocitosis puede ser un indicador de lesión u otra enfermedad tal como cáncer. La leucocitosis incluye, pero sin limitación, eosinofilia y acumulaciones de macrófagos. Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de leucopenia. Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de leucocitosis.

- La leucopenia puede ser una disminución generalizada en todos los tipos de glóbulos blancos o puede ser un agotamiento específico de tipos particulares de glóbulos blancos. De este modo, los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de la disminución del número de neutrófilos, conocida como neutropenia. Las neutropenias que pueden diagnosticarse, pronosticarse, prevenirse y/o tratarse mediante los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos incluyen, pero sin limitación, agranulocitosis genética infantil, neutropenia familiar, neutropenia cíclica, neutropenias que resultan de o están asociadas con deficiencias dietéticas (por ejemplo, deficiencia de vitamina B12 o deficiencia de ácido fólico), neutropenias que resultan de o están asociadas con tratamientos farmacológicos (por ejemplo, regímenes de antibióticos tales como tratamiento con penicilina, tratamiento con sulfonamida, tratamiento anticoagulante, fármacos anticonvulsivos, fármacos antitiroideos y quimioterapia de cáncer) y neutropenias resultantes de destrucción de neutrófilos aumentada que puede producirse en asociación con algunas infecciones bacterianas o virales, trastornos alérgicos, enfermedades autoinmunes, afecciones en las que un individuo tiene una bazo agrandado (por ejemplo síndrome de Felty, malaria y sarcoidosis) y algunos regímenes de tratamiento farmacológico.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de linfocitopenias (disminución de los números de linfocitos B y/o T), incluyendo, sin limitación, linfocitopenias que resultan de o están asociadas con estrés, tratamientos farmacológicos (por ejemplo, tratamiento farmacológico con corticosteroides, quimioterapias de cáncer y/o radioterapias), SIDA y/u otras enfermedades tales como, por ejemplo, cáncer, artritis reumatoide, lupus eritematosos sistémico, infecciones crónicas, algunas infecciones virales y/o trastornos hereditarios (por ejemplo, síndrome de DiGeorge, Síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia grave combinada, ataxia telangiectasia).
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con el número de macrófagos y/o la función de macrófagos incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Letterer-Siwe y enfermedad de Hand-Schuller-Christian.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o antagonistas o agonistas de los mismos pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con el número de eosinófilos y/o la función de eosinófilos incluyendo, pero sin limitación, síndrome hipereosinofílico idiopático, síndrome de eosinofilia-mialgia y enfermedad de Hand-Schuller-Christian.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de leucemias y linfomas incluyendo, pero sin limitación, leucemia linfocítica aguda (linfoblástica) (ALL), leucemia mieloide aguda (mielocítica, mielógena, mieloblástica o mielomonocítica), leucemia linfocítica crónica (por ejemplo, leucemias de linfocitos B, leucemias de linfocitos T, leucemia de Sezary y tricoleucemia), leucemia mielocítica crónica (mieloide, mielógena o granulocítica), linfoma de Hodgkin, linfoma no de hodgkin, linfoma de Burkitt y micosis fungoide.
- Los polipéptidos, anticuerpos de la invención o polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas de los mismos, pueden ser útiles para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar enfermedades inmunes complejas, incluyendo, pero sin limitación, enfermedad del suero, glomerulonefritis postestreptocócica, poliarteritis nodosa y vasculitis inducida por complejo inmune.
- Los polipéptidos, anticuerpos de la invención, polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas pueden usarse para tratar, detectar y/o prevenir agentes infecciosos. Por ejemplo, aumentando la respuesta inmune, aumentando particularmente la activación de la proliferación y/o diferenciación de linfocitos B y/o T, pueden tratarse, detectarse y/o prevenirse enfermedades infecciosas. La respuesta inmune puede aumentarse potenciando una respuesta inmune existente o iniciando una nueva respuesta inmune. Como alternativa, los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos también pueden inhibir directamente el agente infeccioso (refiérase a la sección de la solicitud que enumera los agentes infecciosos, etc.) sin inducir necesariamente una respuesta inmune.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un adyuvante de vacuna que potencia la respuesta inmune a un antígeno. Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un adyuvante para potenciar las respuestas inmunes específicas de tumores.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un adyuvante para potenciar las respuestas inmunes antivirales. Las respuestas inmunes antivirales que pueden potenciarse usando las composiciones descritas en la presente memoria como un adyuvante, incluyen virus y enfermedades asociadas a virus o síntomas descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica. Las composiciones de la invención pueden usarse como un adyuvante para

- mejorar una respuesta inmune a un virus, enfermedad o síntoma seleccionado del grupo que consiste en SIDA, meningitis, Dengue, VEB y hepatitis (por ejemplo, hepatitis B). Las composiciones de la invención pueden usarse como un adyuvante para potenciar una respuesta inmune ante un virus, enfermedad o síntoma seleccionado del grupo que consiste en VIH-SIDA, virus sincitial respiratorio, Dengue, rotavirus, encefalitis Japonesa B, gripe A y B, paragripe, sarampión, citomegalovirus, rabia, Junin, Chikungunya, Fiebre del Valle del Rift, herpes simple y fiebre amarilla.
- 5 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un adyuvante para potenciar las respuestas inmunes antibacterianas o antifúngicas. Las respuestas inmunes antifúngicas o antibacterianas que pueden potenciarse usando las composiciones de la invención como un adyuvante, incluyen bacterias u hongos y enfermedades asociadas con bacterias u hongos o síntomas descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica. Las composiciones de la invención pueden usarse como un adyuvante para potenciar una respuesta inmune ante una bacteria u hongo, enfermedad o síntoma seleccionado del grupo que consiste en: tétanos, difteria, botulismo y meningitis tipo B.
- 10 Las composiciones de la invención pueden usarse como un adyuvante para potenciar una respuesta inmune ante una bacteria u hongo, enfermedad o síntoma seleccionados del grupo que consiste en: *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium leprae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Meisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, estreptococo del Grupo B, *Shigella spp.*, *Escherichia coli* Enterotoxigénica, *E. coli* Enterohemorrágica, y *Borrelia burgdorferi*.
- 15 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un adyuvante para potenciar respuestas inmunes antiparasitarias. Las respuestas inmunes antiparasitarias que pueden potenciarse usando las composiciones de la invención como un adyuvante, incluyen parásitos y enfermedades asociadas con parásitos o síntomas descritos en la presente memoria o conocidos de otra forma en la técnica. Las composiciones de la invención pueden usarse como un adyuvante para potenciar una respuesta inmune a un parásito. Las composiciones de la invención pueden usarse como un adyuvante para potenciar una respuesta inmune a Plasmodium (malaria) o Leishmania.
- 20 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos también pueden emplearse para tratar enfermedades infecciosas incluyendo silicosis, sarcoidosis y fibrosis pulmonar idiopática, por ejemplo, previniendo el reclutamiento y activación de fagocitos mononucleares.
- 25 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un antígeno para la generación de anticuerpos para inhibir o potenciar las respuestas inmunes mediadas contra estos polipéptidos.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden administrarse a un animal (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, cobaya, cerdos, cerdos miniaturizados, pollo, camello, cabra, caballo, vaca, oveja, perro, gato, primate no humano y ser humano, más preferiblemente ser humano) para potenciar el sistema inmune para producir cantidades mayores de uno o más anticuerpos (por ejemplo, IgG, IgA, IgM e IgE), para inducir producción de anticuerpos de mayor afinidad y cambio de clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgA, IgM e IgE) y/o para aumentar una respuesta inmune.
- 30 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un estimulador de sensibilidad a linfocitos B ante patógenos.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un activador de linfocitos T.
- 35 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un agente que eleva el estado inmune de un individuo antes de su recepción de terapias inmunosupresoras.
- 40 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un agente para inducir anticuerpos de mayor afinidad.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un agente para aumentar concentraciones de inmunoglobulina en suero.
- 45 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un agente para acelerar la recuperación de individuos inmunocomprometidos.
- 50 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un agente para potenciar la inmunorespuesta entre poblaciones mayores y/o neonatos.



- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un potenciador del sistema inmune antes de, durante o después del trasplante de médula ósea y/u otros trasplantes (por ejemplo, trasplante de órganos alogénico o xenogénico). Con respecto a trasplantes, las composiciones de la invención pueden administrarse antes de, junto con y/o después del trasplante.
- 5 Las composiciones de la invención pueden administrarse después del trasplante, antes del comienzo de la recuperación de las poblaciones de linfocitos T. Las composiciones de la invención pueden administrarse primero después del trasplante, después del comienzo de la recuperación de poblaciones de linfocitos T, pero antes de la completa recuperación de las poblaciones de linfocitos B.
- 10 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un agente para potenciar la inmunorespuesta entre individuos que tienen una pérdida adquirida de función de linfocitos B. Las afecciones que dan como resultado una pérdida adquirida de función de los linfocitos B que pueden mejorarse o tratarse por la administración de los polipéptidos y/o anticuerpos, polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen, pero sin limitación, infección por VIH, SIDA, trasplante de médula ósea y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (CLL).
- 15 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un agente para potenciar la inmunorrespuesta entre individuos que tienen una deficiencia inmune temporal. Las afecciones que dan como resultado una deficiencia inmune temporal que puede aliviarse o tratarse mediante la administración de los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen, pero sin limitación, recuperación de infecciones virales (por ejemplo, gripe),
- 20 afecciones asociadas con desnutrición, recuperación de mononucleosis infecciosa o afecciones asociadas con estrés, recuperación de sarampión, recuperación de transfusión sanguínea y recuperación de cirugía.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un regulador de presentación de antígenos por monocitos, células dendríticas y/o linfocitos B. Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden potenciar la presentación de antígeno o antagoniza la presentación de antígeno *in vitro* o *in vivo*. Además, dicha potenciación o antagonismo de presentación de antígenos puede ser útil como un tratamiento antitumoral o para modular el sistema inmune.
- 25 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un agente para dirigir el sistema inmune de un individuo hacia el desarrollo de una respuesta humoral (es decir TH2) en oposición a una respuesta celular TH1.
- 30 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un medio para inducir proliferación de tumor y hacerlo de este modo más susceptible a agentes antineoplásicos. Por ejemplo, el mieloma múltiple es una enfermedad de división lenta y de este modo es resistente prácticamente a todos los regímenes antineoplásicos. Si se obligaran a estas células a proliferar más rápidamente su perfil de susceptibilidad probablemente cambiaría.
- 35 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un estimulador de producción de linfocitos B en patologías tales como SIDA, trastorno linfocítico crónico y/o inmunodeficiencia variable común.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como una terapia para generación y/o regeneración de tejidos linfoides después de cirugía, traumatismo o defecto genético. Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse en el pretratamiento de muestras de médula ósea antes del trasplante.
- 40 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como una terapia basada en genes para trastornos genéticamente heredados dando como resultado inmun incompetencia/inmunodeficiencia tal como la observada entre pacientes con SCID.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un medio para activar monocitos/macrófagos para defenderse contra enfermedades parasitarias que afectan a los monocitos tales como Leishmania.
- 45 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un medio para regular citocinas secretadas que se inducen por los polipéptidos.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse en una o más de las aplicaciones descritas en la presente memoria, así como pueden aplicarse a medicina veterinaria.
- 50 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un medio para bloquear diversos aspectos de las respuestas inmunes a agentes
- 55 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un medio para bloquear diversos aspectos de las respuestas inmunes a agentes

ajenos o propios. Los ejemplos de enfermedades o afecciones en las que el bloqueo de ciertos aspectos de respuestas inmunes puede desearse incluyen enfermedades autoinmunes tales como lupus y artritis así como inmunorespuesta a alergias cutáneas, inflamación, enfermedad del intestino, lesiones y enfermedades/trastornos asociados con patógenos.

- 5 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como una terapia para prevenir la proliferación de linfocitos B y la secreción de Ig asociadas con enfermedades autoinmunes tales como púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple.
- 10 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un inhibidor de migración de linfocitos B y/o T en células endoteliales. Esta actividad altera la arquitectura tisular o las respuestas afines y es útil, por ejemplo para alterar la respuesta inmune y bloquear la sepsis.
- 15 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como una terapia para hipergammaglobulinemia crónica evidente en tales enfermedades como gammopatía monoclonal de significación no determinada (MGUS), enfermedad de Waldenstrom, gammopatías monoclonales idiopáticas relacionadas y plasmacitomas.
- 20 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden emplearse por ejemplo para inhibir quimiotaxis de polipéptidos y activación de macrófagos y sus precursores y de neutrófilos, basófilos, linfocitos B y algunos subconjuntos de linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T activados y citotóxicos CD8 y células citolíticas, en ciertas enfermedades autoinmunes e inflamatorias e infectivas crónicas. Se describen en la presente memoria ejemplos de enfermedades autoinmunes e incluyen esclerosis múltiple y diabetes insulino dependiente.
- 25 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden emplearse también para tratar síndrome hipereosinofílico idiopático mediante, por ejemplo prevención de la producción y migración de eosinófilos.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse para potenciar o inhibir la lisis celular mediada por complemento.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse para potenciar o inhibir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.
- 30 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos también pueden emplearse para tratar aterosclerosis, por ejemplo, mediante la prevención de infiltración de monocitos en la pared arterial.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden emplearse para tratar el síndrome de distrés respiratorio adulto (ARDS).
- 35 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden ser útiles para estimular reparación de tejido y heridas, estimular angiogénesis y/o estimular la reparación de enfermedades o trastornos linfáticos o vasculares. Adicionalmente, pueden usarse agonistas y antagonistas para estimular la regeneración de superficies mucosas.
- 40 Los polinucleótidos o polipéptidos y/o agonistas de los mismos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar, tratar y/o prevenir un trastorno caracterizado por inmunodeficiencia primaria o adquirida, producción de inmunoglobulinas en suero deficiente, infecciones recurrentes y/o disfunción del sistema inmune. Además, pueden usarse polinucleótidos o polipéptidos y/o agonistas de los mismos para tratar o prevenir infecciones de las articulaciones, huesos, piel y/o glándulas parótidas, infecciones transportadas en la sangre (por ejemplo, sepsis, meningitis, artritis séptica y/u osteomielitis), enfermedades autoinmunes (por ejemplo, las descritas en la presente memoria), trastornos inflamatorios y tumores malignos y/o cualquier enfermedad o trastorno o afección asociada con estas infecciones, enfermedades, trastornos y/o tumores malignos) incluyendo, pero sin limitación, CVID, otras deficiencias inmunes primarias, enfermedad de VIH, CLL, bronquitis recurrente, sinusitis, otitis media, conjuntivitis, neumonía, hepatitis, meningitis, herpes zoster (por ejemplo, herpes zoster grave) y/o neomocistis canina. Otras enfermedades y trastornos que pueden prevenirse, diagnosticarse, pronosticarse y/o tratarse con polinucleótidos o polipéptidos y/o agonistas
- 50 incluyen, pero sin limitación, infección por VIH, infección por HTLV-BLV, linfopenia, anemia de disfunción bactericida de fagocitos, trombocitopenia y hemoglobinuria.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse para tratar y/o diagnosticar a un individuo que tiene enfermedad de inmunodeficiencia variable común ("CVID"; también conocida como "agammaglobulinemia adquirida" y "hipogammaglobulinemia adquirida") o un subconjunto de esta enfermedad.
- 55

- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar cánceres o neoplasias que incluyen cánceres o neoplasias de células inmunes o relacionados con tejido inmune. Los ejemplos de cánceres o neoplasias que pueden prevenirse, diagnosticarse o tratarse por polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos incluyen, pero sin limitación, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, anemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica, plasmacitomas, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, enfermedades transformadas por VEB y/o enfermedades y trastornos descritos en la sección titulada "Trastornos Hiperproliferativos" en otro sitio de la presente memoria.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como una terapia para disminuir la proliferación celular de linfomas de linfocitos B grandes.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden usarse como un medio para disminuir la implicación de linfocitos B e Ig asociados con Leucemia Mielógena Crónica.
- Las composiciones de la invención pueden usarse como un agente para potenciar la inmunorrespuesta entre individuos inmunodeficientes para linfocitos B, tales como, por ejemplo, un individuo que se ha sometido a una esplenectomía parcial o completa.
- Los antagonistas incluyen, por ejemplo, anticuerpos de unión y/o inhibidores, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas o formas solubles de los polipéptidos descritos en la presente memoria (por ejemplo, proteína de fusión de Fc). Los agonistas incluyen, por ejemplo, anticuerpos de unión o estimuladores y formas solubles de los polipéptidos (por ejemplo, proteínas de fusión de Fc). Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden emplearse en una composición con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, como se describe en la presente memoria.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos pueden administrarse a un animal (incluyendo, pero sin limitación, los enumerados anteriormente e incluyendo también animales transgénicos) incapaz de producir moléculas de anticuerpo endógenas funcionales o tener un sistema inmune endógeno comprometido de otro modo, pero que es capaz de producir moléculas de inmunoglobulina humana por medio de un sistema inmune reconstituido o parcialmente reconstituido de otro animal (véase, por ejemplo, Solicitudes de PCT publicadas N° WO98/24893, WO/9634096, WO/9633735, y WO/9110741). La administración de polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos a dichos animales puede ser útil para la generación de anticuerpos monoclonales contra los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos.
- Quimiotaxis.** Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden tener actividad quimiotáctica. Una molécula quimiotáctica atrae o moviliza células (por ejemplo, monocitos, fibroblastos, neutrófilos, linfocitos T, mastocitos, eosinófilos, células epiteliales y/o células endoteliales) a un sitio particular del cuerpo, tal como inflamación, infección o sitio de hiperproliferación. Las células movilizadas pueden de este modo luchar contra y/o curar el traumatismo o la anomalía particular.
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden aumentar la actividad quimiotáctica de células particulares. Estas moléculas quimiotácticas pueden usarse después para tratar, prevenir y/o diagnosticar inflamación, infección, enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas o cualquier otro trastorno del sistema inmune aumentando el número de células dirigidas a una localización particular en el cuerpo. Por ejemplo, las moléculas quimiotácticas pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar heridas y otros traumatismos a tejidos atrayendo células inmunes a la localización de la lesión. Las moléculas quimiotácticas pueden atraer también fibroblastos, que pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar heridas.
- También se contempla que los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), pueden inhibir la actividad quimiotáctica. Estas moléculas también podrían usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar enfermedades, trastornos y/o afecciones. De este modo, los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) podrían usarse como un inhibidor de quimiotaxis.
- Enfermedad infecciosa.** Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar agentes infecciosos. Por ejemplo, aumentando la respuesta inmune, aumentando particularmente la proliferación y diferenciación de linfocitos B y/o T, pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse enfermedades

infecciosas. La respuesta inmune puede aumentarse potenciando una respuesta inmune existente o iniciando una nueva respuesta inmune. Como alternativa, los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), también pueden inhibir directamente el agente infeccioso, sin inducir necesariamente una respuesta inmune.

- 5 Los virus son un ejemplo de un agente infeccioso que puede causar enfermedad o síntomas que pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse por un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista.

Los ejemplos de virus incluyen, pero sin limitación los siguientes virus de ADN y ARN y familias virales: Arbovirus, Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Birnaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Dengue, VEB, VIH, Flaviviridae, Hepadnaviridae (Hepatitis), Herpesviridae (tales como, Citomegalovirus, Herpes Simple, Herpes Zoster), Mononegavirus (por ejemplo, Paramyxoviridae, Morbillivirus, Rhabdoviridae), Orthomyxoviridae (por ejemplo, Gripe A, Gripe B y paragripal), Papiloma virus, Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae (tales como Viruela o Vaccinia), Reoviridae (por ejemplo, Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I, HTLV-II, Lentivirus), y Togaviridae (por ejemplo, Rubivirus). Los virus que quedan dentro de estas familias pueden causar una diversidad de enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitación: artritis, bronquiolitis, virus sincitial respiratorio, encefalitis, infecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis, queratitis), síndrome de fatiga crónica, hepatitis (A, B, C, E, Activa Crónica, Delta), encefalitis Japonesa B, Junin, Chikungunya, Fiebre del Valle del Rift, fiebre amarilla, meningitis, infecciones oportunistas (por ejemplo SIDA), neumonía, Linfoma de Burkitt, varicela, fiebre hemorrágica, sarampión, paperas, paragripe, Rabia, resfriado común, Polio, leucemia, Rubéola, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades cutáneas (por ejemplo, Kaposi, verrugas) y viremia. Los polinucleótidos o polipéptidos, o agonistas o antagonistas de la invención, pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. Los polinucleótidos, polipéptidos, o agonistas o antagonistas de la invención, se usan para tratar: meningitis, Dengue, VEB y/o hepatitis (por ejemplo, hepatitis B). Los polinucleótidos, polipéptidos, o agonistas o antagonistas, pueden usarse para tratar pacientes que no responden a una o más vacunas de la hepatitis disponibles en el mercado adicionales. Los polinucleótidos, polipéptidos, o agonistas o antagonistas, pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar SIDA.

Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, puede usarse para diagnosticar, tratar, prevenir o mejorar infección por VIH.

Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, puede usarse para diagnosticar, tratar, prevenir o aliviar infecciones por Citomegalovirus.

- 30 Los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, puede usarse para diagnosticar, tratar, prevenir o aliviar infecciones por Poxviridae.

De forma similar, los agentes bacterianos o fúngicos que pueden causar enfermedades o síntomas y que pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse mediante un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista incluyen, pero sin imitación, las siguientes bacterias Gram-Negativas y Gram-positivas y familias bacterianas y hongos: Actinomycetales (por ejemplo, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia), *Cryptococcus neoformans*, Aspergillosis, Bacillaceae (por ejemplo, Anthrax, Clostridium), Bacteroidaceae, Blastomycosis, Bordetella, Borrelia (por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*), Brucellosis, Candidiasis, Campylobacter, Coccidioidomycosis, Cryptococcosis, Dermatococcoses, *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* Enterotoxigénica y *E. coli* Enterohemorrágica), Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella (por ejemplo, *Salmonella typhi*, y *Salmonella para-typhi*), Serratia, Yersinia), Erysipelothrix, Helicobacter, Legionellosis, Leptospirosis, Listeria, Mycoplasmatales, *Mycobacterium leprae*, *Vibrio cholerae*, Neisseriaceae (por ejemplo, Acinetobacter, Gonorrhea, Meningococcal), *Neisseria meningitidis*, Infecciones por Pasteurellaceae (por ejemplo, Actinobacillus, Heamophilus (por ejemplo, gripe por Heamophilus de tipo B), Pasteurella), Pseudomonas, Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, Syphilis, Shigella spp., estafilocócicas, meningocócicas, pneumocócicas y estreptocócicas (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* de Grupo B). Estas familias bacterianas o fúngicas pueden causar la siguientes enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitación: bacteremia, endocarditis, infecciones oculares (conjuntivitis, tuberculosis, uveítis), gingivitis, infecciones oportunistas (por ejemplo; infecciones relacionadas con SIDA), paroniquia, infecciones relacionadas con prótesis, Enfermedad de Reiter, infecciones del tracto respiratorio, tales como Tos ferina o Empiema, sepsis, Enfermedad de Lyme, Enfermedad por Arañazo de Gato, Disentería, Fiebre Paratifoidea, intoxicación alimenticia, Tifus, neumonía, Gonorrea, meningitis (por ejemplo, meningitis tipo A y B), Clamidia, Sífilis, Difteria, Lepra, Paratuberculosis, Tuberculosis, Lupus, Botulismo, gangrena, tétanos, impétigo, Fiebre Reumática, Escarlatina, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades cutáneas (por ejemplo, celulitis, dermatocicosis), toxemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas. Pueden usarse polinucleótidos o polipéptidos, agonistas o antagonistas para tratar, prevenir y/o diagnosticar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. Pueden usarse polinucleótidos, polipéptidos, agonistas o antagonistas para tratar: tétanos, Difteria, botulismo y/o meningitis tipo B.

Además, los agentes parasitarios que causan enfermedades o síntomas que pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse por un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista incluyen, pero sin limitación, las siguientes familias o clases: Amebiasis, Babesiosis, Coccidiosis, Cryptosporidiosis, Dientamoebiasis, durina, Ectoparasitaria, Giardiasis, Helminthiasis, Leishmaniasis, Teileriasis, Toxoplasmosis, Trypanosomiasis y Tricomonas y Esporozoides (por ejemplo, *Plasmodium virax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*).

Estos parásitos pueden causar una diversidad de enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitación: Escabiosis, Trombiculiasis, infecciones oculares, enfermedad intestinal (por ejemplo, disentería, giardiasis), enfermedad del hígado, enfermedad del pulmón, infecciones oportunistas (por ejemplo, relacionadas con SIDA), malaria, complicaciones del embarazo y toxoplasmosis. Pueden usarse polinucleótidos o polipéptidos, o agonistas o antagonistas para tratar, prevenir y/o diagnosticar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. Pueden usarse polinucleótidos, polipéptidos o agonistas o antagonistas para tratar, prevenir y/o diagnosticar malaria.

Preferiblemente, el tratamiento o prevención usando un polipéptido o polinucleótidos y/o agonista o antagonista podría ser por administración de una cantidad eficaz de un polipéptido al paciente o retirando las células del paciente, proporcionando a las células un polinucleótido y devolviendo las células modificadas por ingeniería genética al paciente (terapia *ex vivo*). Además, puede usarse el polipéptido o polinucleótido como un antígeno en una vacuna para inducir una respuesta inmune contra enfermedad infecciosa.

**Enfermedades Neurológicas.** Las enfermedades, trastornos y/o afecciones del sistema nervioso que pueden tratarse con composiciones del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)), incluyen, pero sin limitación, lesiones del sistema nervioso y enfermedades, trastornos y/o afecciones que dan como resultado una desconexión de axones, una disminución o degeneración de neuronas o desmielinización. Las lesiones del sistema nervioso que pueden tratarse en un paciente (incluyendo pacientes mamíferos humanos y no humanos) incluyen, pero sin limitación, las siguientes lesiones del sistema nervioso central (incluyendo médula espinal, cerebro) o periférico: (1) lesiones isquémicas, en las que una falta de oxígeno en una parte del sistema nervioso da como resultado lesión neuronal o muerte, incluyendo isquemia o infarto cerebral o isquemia o infarto de médula espinal; (2) lesiones traumáticas, incluyendo lesiones causadas por lesión física o asociadas con cirugía, por ejemplo, lesiones que seccionan una parte del sistema nervioso o lesiones por compresión; (3) lesiones malignas, en las que una parte del sistema nervioso se destruye o lesiona por tejido maligno que es un tumor maligno asociado al sistema nervioso o un tumor maligno derivado de tejido no del sistema nervioso; (4) lesiones infecciosas, en las que una parte del sistema nervioso se destruye o lesiona como resultado de infección, por ejemplo, por un absceso o asociada con infección por virus de inmunodeficiencia humana, herpes zoster o virus del herpes simple o con enfermedad de Lyme, tuberculosis, sífilis; (5) lesiones degenerativas, en las que una parte del sistema nervioso se destruye o lesiona como resultado de un proceso degenerativo que incluye pero sin limitación degeneración asociada con enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington o esclerosis lateral amiotrófica (ALS); (6) lesiones asociadas con enfermedades, trastornos y/o afecciones nutricionales, en los que una parte del sistema nervioso se destruye o lesiona por un trastorno nutricional o trastorno del metabolismo que incluye pero sin limitación, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de ácido fólico, enfermedad de Wernicke, ambliopia de tabaco-alcohol, enfermedad de Marchiafava-Bignami (degeneración primaria del cuerpo calloso) y degeneración cerebelar alcohólica; (7) lesiones neurológicas asociadas con enfermedades sistémicas que incluyen, pero sin limitación, diabetes (neuropatía diabética, parálisis de Bell), lupus sistémico eritematoso, carcinoma o sarcoidosis; (8) lesiones causadas por sustancias tóxicas que incluyen alcohol, plomo o neurotoxinas particulares; y (9) lesiones desmielinizadas en las que una parte del sistema nervioso se destruye o lesiona por una enfermedad desmielinizante que incluye, pero sin limitación, esclerosis múltiple, mielopatía asociada a virus de la inmunodeficiencia humana, mielopatía transversa o diversas etiologías, leucoencefalopatía multifocal progresiva y mielolisis central del puente.

Los polipéptidos, polinucleótidos o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para proteger las células neurales de los efectos perjudiciales de la hipoxia cerebral. Las composiciones del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar lesión de células neurales asociada con hipoxia cerebral. Los polipéptidos, polinucleótidos o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar lesión de células neurales asociada con isquemia cerebral. Los polipéptidos, polinucleótidos o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar lesión de células neurales asociada con infarto cerebral. Los polipéptidos, polinucleótidos o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar lesión de células neurales asociada con una apoplejía. Los polipéptidos, polinucleótidos o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar lesión de células neurales cerebrales asociada con una apoplejía.

Los polipéptidos, polinucleótidos o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar lesión de células neurales asociada con un infarto de miocardio.

Los polipéptidos, polinucleótidos o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar lesión de células neurales cerebrales asociada con un infarto de miocardio.

Las composiciones que pueden ser útiles para tratar, prevenir y/o diagnosticar un trastorno del sistema nervioso pueden seleccionarse mediante ensayo con respecto a actividad biológica al promover la supervivencia o diferenciación de neuronas. Por ejemplo, y no como limitación, las composiciones del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que inducen cualquiera de los siguientes efectos pueden ser útiles de acuerdo con la invención:

(1) aumento del tiempo de supervivencia de neuronas en cultivo; (2) aumento de crecimiento de neuronas en cultivo o *in vivo*; (3) aumento de la producción de moléculas asociadas a neuronas en cultivo o *in vivo*, por ejemplo, colina acetiltransferasa o acetilcolinesterasa con respecto a neuronas motoras; o (4) disminución de síntomas de disfunción de neuronas *in vivo*. Tales efectos pueden medirse por cualquier método conocido en la técnica. El aumento de la supervivencia de neuronas puede medirse rutinariamente usando un método expuesto en la presente memoria o conocido de otro modo en la técnica, tal como, por ejemplo, el método expuesto en Arakawa *et al.* (J. Neurosci. 10: 3507-3515 (1990)); el aumento del crecimiento de neuronas puede detectarse por métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, los métodos expuestos en Pestronk *et al.* (Exp. Neurol. 70: 65-82 (1980)) o Brown *et al.* (Ann. Rev. Neurosci. 4: 17-42 (1981)); el aumento de la producción de moléculas asociadas con neuronas puede medirse mediante bioensayo, ensayo enzimático, unión de anticuerpos, ensayo de transferencia de Northern, etc., usando técnicas conocidas en la materia y dependiendo de la molécula a medir; y la disfunción de neuronas motoras puede medirse mediante la evaluación de la manifestación física del trastorno de la neurona motora, por ejemplo, debilidad, velocidad de conducción de la neurona motora o discapacidad funcional.

Las enfermedades, trastornos y/o afecciones de las neuronas motoras que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación, enfermedades, trastornos y/o afecciones tales como infarto, infección, exposición a toxina, traumatismo, daño quirúrgico, enfermedad degenerativa o tumor maligno que puede afectar a las neuronas motoras así como otros componentes del sistema nervioso, así como enfermedades, trastornos y/o afecciones que afectan de forma selectiva a las neuronas tales como esclerosis lateral amiotrófica e incluyendo, pero sin limitación, atrofia muscular espinal progresiva, parálisis bulbar progresiva, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular infantil y juvenil, parálisis bulbar progresiva de la infancia (síndrome de Fazi-Londe), poliomielitis y el síndrome post polio y neuropatía sensitiva y motora hereditaria (Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth).

Además, los polipéptidos o polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden desempeñar un papel en la supervivencia neuronal; formación de sinapsis; conductancia; diferenciación neural, etc. De este modo, las composiciones (incluyendo polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos) pueden usarse para diagnosticar y/o tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con estos papeles, incluyendo, pero sin limitación, trastornos del aprendizaje y/o la cognición. Las composiciones también pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de patologías neurodegenerativas y/o trastornos del comportamiento. Tales patologías neurodegenerativas y/o trastornos del comportamiento incluyen, pero sin limitación, Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington, Síndrome de Tourette, esquizofrenia, manía, demencia, paranoia, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno del pánico, discapacidades de aprendizaje, ALS, psicosis, autismo y comportamientos alterados, incluyendo trastornos en la alimentación, patrones del sueño, equilibrio y percepción. Además, las composiciones también pueden desempeñar un papel en el tratamiento, prevención y/o detección de trastornos del desarrollo asociados con el embrión en desarrollo o trastornos ligados al sexo.

Adicionalmente, los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, pueden ser útiles en la protección de células neurales de enfermedades, daño, trastornos o lesión, asociados con trastornos cerebrovasculares incluyendo, pero sin limitación, enfermedades de la arteria carótida (por ejemplo, trombosis de la arteria carótida, estenosis de la carótida o Enfermedad de Moyamoya), angiopatía amiloide cerebral, aneurisma cerebral, anoxia cerebral, arteriosclerosis cerebral, malformaciones arteriovenosas cerebrales, enfermedades de las arterias cerebrales, embolia cerebral y trombosis (por ejemplo, trombosis de la arteria carótida, trombosis del seno o Síndrome de Wallenberg), hemorragia cerebral (por ejemplo, hematoma epidural o subdural o hemorragia subaracnoidea), infarto cerebral, isquemia cerebral (por ejemplo, isquemia cerebral transitoria, Síndrome del robo de la subclavia o insuficiencia vertebrobasilar), demencia vascular (por ejemplo, multiinfarto), leucomalacia, periventricular y cefalea vascular (por ejemplo, cefalea en racimos o migrañas).

De acuerdo con un aspecto adicional, se describe un procedimiento para utilizar los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, para fines terapéuticos, por ejemplo, para estimular la proliferación y/o diferenciación de células neurológicas. Por lo tanto, pueden usarse polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y/o antagonistas para tratar y/o detectar enfermedades neurológicas. Además pueden usarse polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos como un marcador o detector de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso particular.

Los ejemplos de enfermedades neurológicas que pueden tratarse o detectarse con los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen enfermedades cerebrales, tales como enfermedades cerebrales metabólicas que incluyen fenilcetonuria; tales como fenilcetonuria materna; deficiencia de piruvato carboxilasa, deficiencia del complejo de piruvato deshidrogenasa, Encefalopatía de Wernicke, edema cerebral, neoplasias cerebrales tales como neoplasias cerebelares que incluyen neoplasias infratentoriales, neoplasias del ventrículo cerebral tales como neoplasias del plexo coroideo, neoplasias hipotalámicas, neoplasias supratentoriales, enfermedad de canavan, enfermedades cerebrales tales como ataxia cerebelar que incluyen degeneración espinocerebelar tal como ataxia telangiectasia, disineria cerebelar, Ataxia de Friederich, Enfermedad de Machado-Joseph, atrofia olivopontocerebelar, neoplasias cerebelares tales como neoplasias infratentoriales, esclerosis cerebral difusa tal como encefalitis periaxial, leucodistrofia globoide,

leucodistrofia metacromática y panencefalitis esclerosante subaguda.

Las enfermedades neurológicas adicionales que pueden tratarse o detectarse con los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen trastornos cerebrovasculares (tales como enfermedades de la arteria carótida que incluyen trombosis de la arteria carótida, estenosis de la carótida y Enfermedad de Moyamoya), angiopatía amiloide cerebral, aneurisma cerebral, anoxia cerebral, arteriosclerosis cerebral, malformaciones arteriovenosas cerebrales, enfermedades de la arteria cerebral, embolia y trombosis cerebral tales como trombosis de la arteria carótida, trombosis del seno y Síndrome de Wallenberg, hemorragia cerebral tal como hematoma epidural, hematoma subdural y hemorragia subaracnoidea, infarto cerebral, isquemia cerebral tal como isquemia cerebral transitoria, Síndrome del robo de la subclavia e insuficiencia vertebrovascular, demencia vascular tal como demencia multiinfarto, leucomalacia periventricular, cefalea vascular tal como cefalea en racimos y migraña.

Las enfermedades neurológicas adicionales que pueden tratarse o detectarse con los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen demencia tal como Complejo de Demencia de SIDA, demencia presenil tal como Enfermedad de Alzheimer y Síndrome de Creutzfeldt-Jakob, demencia senil tal como enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear progresiva, demencia vascular tal como demencia multi-infarto, encefalitis que incluye encefalitis periaxial, Encefalitis viral tal como encefalitis epidémica, Encefalitis Japonesa, Encefalitis de St. Louis, encefalitis portada por garrapatas y Fiebre del Nilo Occidental, encefalomiелitis diseminada aguda, meningoencefalitis tal como síndrome uveomeningoencefálico, Enfermedad de Parkinson Postencefálica y panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomalacia tal como leucomalacia periventricular, epilepsia tal como epilepsia generalizada que incluye espasmos infantiles, epilepsia de ausencia, epilepsia mioclónica que incluye Síndrome de MERRF, epilepsia tónico clónica, epilepsia parcial tal como epilepsia parcial compleja, epilepsia del lóbulo frontal y epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia post-traumática, estado epiléptico tal como Epilepsia Parcial Continua y Síndrome de Hallervorden-Spatz.

Las enfermedades neurológicas adicionales que pueden tratarse o detectarse con los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen hidrocefalia tal como Síndrome de Dandy-Walker e hidrocefalia a presión normal, enfermedades hipotálamicas tales como neoplasias hipotálamicas, malaria cerebral, narcolepsia que incluye cataplexia, poliomiелitis bulbar, pseudotumor cerebral, Síndrome de Rett, Síndrome de Reye, enfermedades talámicas, toxoplasmosis cerebral, tuberculosis intracraneal y Síndrome de Zellweger, infecciones del sistema nervioso tales como Complejo de Demencia del SIDA, Absceso Cerebral, empiema subdural, encefalomiелitis tal como Encefalomiелitis Equina, Encefalomiелitis Equina Venezolana, Encefalomiелitis Hemorrágica Necrotizante, Visna y malaria cerebral.

Las enfermedades neurológicas adicionales que pueden tratarse o detectarse con los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen meningitis tal como aracnoiditis, meningitis aséptica, tal como meningitis viral que incluye coriomeningitis linfocítica, meningitis Bacteriana que incluye Meningitis por Haemophilus, Meningitis por Listeria, Meningitis por Meningococos tal como Síndrome de Waterhouse-Friderichsen, Meningitis por Neumococos y tuberculosis meníngea, meningitis fúngica tal como Meningitis por Criptococos, efusión subdural, meningoencefalitis tal como síndrome uveomeningoencefálico, miелitis tal como miелitis transversa, neurosífilis tal como tabes dorsal, poliomiелitis que incluye poliomiелitis bulbar y síndrome postpoliomiелitis, enfermedades por prión (tales como Síndrome de Creutzfeldt-Jakob, Encefalopatía Espongiforme Bovina, Síndrome de Gerstmann-Straussler, Kuru, Tembladera) y toxoplasmosis cerebral.

Las enfermedades neurológicas adicionales que pueden tratarse o detectarse con los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen neoplasias del sistema nervioso central tales como neoplasias cerebrales que incluyen neoplasias cerebelares tales como neoplasias infratentoriales, neoplasias del ventrículo cerebral tal como neoplasias del plexo coroideo, neoplasias hipotálamicas y neoplasias supratentoriales, neoplasias meníngeas, neoplasias de la médula espinal que incluyen neoplasias epidurales, enfermedades desmielinizantes tales como Enfermedades de Canavan, esclerosis cerebral difusa que incluye adrenoleucodistrofia, encefalitis periaxial, leucodistrofia globoide, esclerosis cerebral difusa tal como leucodistrofia metacromática, encefalomiелitis alérgica, encefalomiелitis hemorrágica necrotizante, leucoencefalopatía multifocal progresiva, esclerosis múltiple, mielinolisis central del puente, miелitis transversa, neuromiелitis óptica, tembladera, lordosis, Síndrome de Fatiga Crónica, Visna, Síndrome Nervioso de Alta Presión, Meningismo, enfermedades de la médula espinal tales como amiotonia congénita, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal tal como Enfermedad de Werdnig-Hoffmann, compresión de la médula espinal, neoplasias de la médula espinal tales como neoplasias epidurales, siringomiелia, Tabes Dorsal, Síndrome de la Persona Rígida, retraso mental tal como Síndrome de Angelman, Síndrome del maullido de gato, Síndrome de De Lange, Síndrome de Down, Gangliosidosis tal como gangliosidosis G(M1), Enfermedad de Sandhoff, Enfermedad de Tay-Sachs, Enfermedad de Hartnup, homocistinuria, Síndrome de Laurence-Moon-Biedl, Síndrome de Lesch-Nyhan, Enfermedad de la Orina con Olor a Jarabe de Arce, mucopolisidosis tal como fucosidosis, lipofuscinosis cerioide neuronal, síndrome oculocerebrorenal, fenilcetonuria tal como fenilcetonuria materna, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Rett, Síndrome de Rubinstein-Taybi, Esclerosis Tuberosa, Síndrome de WAGR, anomalías del sistema nervioso tales como holoprosencefalia, defectos del tubo neural tales como anencefalia que incluye hidranencefalia,

Deformidad de Arnold-Chairi, encefalocele, meningocele, meningomielocelo, disrafismo espinal tal como espina bífida cística y espina bífida oculta.

Las enfermedades neurológicas adicionales que pueden tratarse o detectarse con los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos incluyen neuropatías sensitivas y motoras hereditarias que incluyen Enfermedad de Charcot-Marie, atrofia óptica Hereditaria, Enfermedad de Refsum, paraplejía espástica hereditaria, Enfermedad de Werdnig-Hoffmann, Neuropatías Autónomas y Sensitivas Hereditarias tales como Analgesia Congénita y Disautonomía Familiar, manifestaciones Neurológicas (tales como agnosia que incluye Síndrome de Gerstmann, Amnesia tal como amnesia retrógrada, apraxia, vejiga neurogénica, cataplexia, trastornos comunicativos tales como trastornos de la audición que incluyen sordera, pérdida de audición parcial, reclutamiento de volumen y tinitus, trastornos del lenguaje tales como afasia que incluyen agrafia, anomia, afasia de Broca y Afasia de Wernicke, Dislexia tal como Dislexia Adquirida, trastornos del desarrollo del lenguaje, trastornos del habla tal como afasia que incluye anomia, afasia de Broca y Afasia de Wernicke, trastornos de articulación, trastornos comunicativos tales como trastornos del habla que incluyen disartria, ecolalia, mutismo y tartamudeo, trastornos de la voz tal como afonía y ronquera, estado de descerebración, delirio, fasciculación, alucinaciones, meningismo, trastornos del movimiento tales como síndrome de Angelman, ataxia, atetosis, corea, distonía, hipocinesia, hipotonía muscular, mioclonus, tic, tortícolis y temblor, hipertonía muscular tal como rigidez muscular tal como síndrome de la persona rígida, espasticidad muscular, parálisis tal como parálisis facial que incluye Herpes Zoster Oftálmico, Gastroparesis, Hemiplejía, oftalmoplejía tal como diplopía, Síndrome de Duane, Síndrome de Horner, oftalmoplejía externa progresiva crónica tal como Síndrome de Kearns, Parálisis Bulbar, Paraparesis Espástica Tropical, Paraplejía tal como Síndrome de Brown-Sequard, tetraplejía, parálisis respiratoria y parálisis de la cuerdas vocales, paresis, miembro fantasma, trastornos del sabor tales como ageusia y disgeusia, trastornos de la visión tales como ambliopía, ceguera, defectos de la visión del color, diplopía, hemianopsia, escotoma y visión inferior a lo normal, trastornos del sueño tales como hipersomnia que incluye Síndrome de Kleine-Levin, insomnio, y sonambulismo, espasmos tales como trismus, inconsciencia tal como coma, estado vegetativo persistente y síncope y vértigo, enfermedades neuromusculares tales como amiotonía congénita, esclerosis lateral amiotrófica, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad de las neuronas motoras, atrofia muscular tal como atrofia muscular espinal, Enfermedad de Charcot-Marie y Enfermedad de Werdnig-Hoffmann, Síndrome Postpoliomielitis, Distrofia Muscular, Miastenia Grave, Miotonía Atrófica, Miotonía Congénita, Miopatía Nemalínica, Parálisis Periódica Familiar, Paramioclónia Múltiple, Paraparesis Espástica Tropical y Síndrome de la Persona Rígida, enfermedades del sistema nervioso periférico tales como acrodinia, neuropatías amieloides, enfermedades del sistema nervioso autónomo tales como Síndrome de Adie, Síndrome de Barre-Lieou, Disautonomía Familiar, Síndrome de Horner, Distrofia Simpática Refleja y Síndrome de Shy-Drager, Enfermedades del Nervio Craneal tales como Enfermedades del Nervio Acústico tal como Neuroma Acústico que incluye Neurofibromatosis 2, Enfermedades de Nervios Faciales tales como Neuralgia Facial, Síndrome de Melkersson-Rosenthal, trastornos de motilidad ocular que incluyen ambliopía, nistagmo, parálisis del nervio oculomotor, oftalmoplejía tal como Síndrome de Duane, Síndrome de Horner, Oftalmoplejía Externa Progresiva Crónica que incluye Síndrome de Kearns, Estrabismo tal como Esotropía y Exotropía, Parálisis del Nervio Oculomotor, Enfermedades del Nervio Óptico tal como Atrofia Óptica que incluye Atrofia Óptica Hereditaria, Drusen del Disco Óptico, Neuritis Óptica tal como Neuromielitis Óptica, Papiledema, Neuralgia Trigémina, Parálisis de las Cuerdas Vocales, Enfermedades desmielinizantes tal como Neuromielitis Óptica y Lordosis y neuropatías Diabéticas tales como pie diabético.

Las enfermedades neurológicas adicionales que pueden tratarse o detectarse con los polinucleótidos y/o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyen síndromes de compresión nerviosa tales como síndrome del túnel carpiano, síndrome del túnel tarsiano, síndrome del opérculo torácico tal como síndrome de costilla cervical, síndrome de compresión del nervio ulnar, neuralgia tal como causalgia, neuralgia cervico-braquial, neuralgia facial y neuralgia trigémina, neuritis tal como neuritis alérgica experimental, neuritis óptica, polineuritis, polirradiculoneuritis y radiculitis tal como polirradiculitis, neuropatías motoras y sensitivas hereditarias tales como Enfermedad de Charcot-Marie, Atrofia Óptica Hereditaria, Enfermedad de Refsum, Paraplejía Espástica Hereditaria y Enfermedad de Werdnig-Hoffmann, Neuropatías Sensitivas y Autónomas Hereditarias que incluyen Analgesia Congénita y Disautonomía Familiar, Síndrome de POEMS, Ciática, Sudoración gustativa y Tetania).

**Trastornos Hiperproliferativos.** Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas, incluyendo neoplasias. Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden inhibir la proliferación del trastorno a través de interacciones directas o indirectas. Como alternativa, los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden hacer proliferar otras células que pueden inhibir el trastorno hiperproliferativo.

Por ejemplo, aumentando una respuesta inmune, particularmente aumentando las cualidades antigénicas del trastorno hiperproliferativo o mediante proliferación, diferenciación o movilización de linfocitos T, las enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse. Esta respuesta inmune puede aumentarse potenciando una respuesta inmune existente o iniciando una nueva respuesta inmune. Como



alternativa, la disminución de una respuesta inmune también puede ser un método para tratar, prevenir y/o diagnosticar enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas, tales como un agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas que pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse por polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), incluyen, pero sin limitación neoplasias localizadas en el colon, abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (adrenal, paratiroidea, hipófisis, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, tórax y urogenital.

De forma similar, otras enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas también pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse mediante polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G. Los ejemplos de tales enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas incluyen, pero sin limitación: hipergammaglobulinemia, enfermedades, trastornos y/o afecciones lipoproliferativas, paraproteinemias, púrpura, sarcoidosis, Síndrome de Sezary, Macroglobulinemia de Waldenström, Enfermedad de Gaucher, histiocitosis y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, localizada en un sistema de órganos enumerado anteriormente.

Pueden usarse polinucleótidos de CCR5 para inhibir la división celular aberrante, por terapia génica y/o fusiones de proteínas o fragmentos de las mismas.

De este modo, se describe un método para tratar enfermedades, trastornos y/o afecciones proliferativas celulares insertando en una célula que prolifera de forma anómala un polinucleótido de CCR5 en el que dicho polinucleótido reprime dicha expresión.

También se describe un método para tratar enfermedades, trastornos y/o afecciones proliferativas celulares en individuos que comprende la administración de una o más copias génicas activas a una célula o células que proliferan de forma anómala. Los polinucleótidos pueden ser una construcción de ADN que comprende un vector de expresión recombinante eficaz en la expresión de una secuencia de ADN que codifica dichos polinucleótidos. La construcción de ADN que codifica los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden insertarse en las células a tratar utilizando un retrovirus o más preferiblemente un vector adenoviral (Véase G. J. Nabel, *et al.*, PNAS 1999 96: 324-326). El vector viral puede ser defectivo y no transformará células no proliferativas, solamente células proliferativas. Además, los polinucleótidos pueden insertarse en células proliferativas solos o en combinación con o fusionados con otros polinucleótidos, pueden después modularse mediante un estímulo externo (es decir magnético, molécula pequeña específica, agente químico o administración de fármaco, etc.), que actúa sobre el promotor cadena arriba de dichos polinucleótidos para inducir la expresión del producto proteico codificado. Como tal el efecto terapéutico beneficioso de la presente invención puede modularse expresamente (es decir, para aumentar, disminuir o inhibir la expresión) basándose en dichos estímulos externos.

Los polinucleótidos pueden ser útiles en la represión de la expresión de genes oncogénicos o antígenos. Por "represión de la expresión de los genes oncogénicos" se pretende la supresión de la transcripción del gen, la degradación del transcrito génico (ARN premensajero), la inhibición del corte y empalme, la destrucción del ARN mensajero, la prevención de las modificaciones post-traduccionales de la proteína, la destrucción de la proteína o la inhibición de la función normal de la proteína.

Para administración local a células que proliferan de forma anómala, pueden administrarse los polinucleótidos por cualquier método conocido para los expertos en la materia incluyendo, pero sin limitación transfección, electroporación, microinyección de células o en vehículos tales como liposomas, lipofectina o como polinucleótidos desnudos o cualquier otro método descrito a lo largo de la memoria descriptiva. El polinucleótido puede suministrarse por sistemas de suministro génico conocidos tales como, pero sin limitación, vectores retrovirales (Gilboa, J. Virology 44: 845 (1982); Hocke, Nature 320: 275 (1986); Wilson, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 3014), sistemas de virus vaccinia (Chakrabarty *et al.*, Mol. Cell Biol. 5: 3403 (1985)) u otros sistemas de suministro de ADN eficaces (Yates *et al.*, Nature 313: 812 (1985)) conocidos para los expertos en la materia. Para suministrar de forma específica o transfectar células que proliferan de forma anómala y evitar las células no en división, es preferible utilizar un sistema de suministro de retrovirus o adenoviral (como se describe en la técnica y en otra parte en la presente memoria) conocido para los expertos en la materia. Puesto que la replicación de ADN del hospedador es necesaria para que se integre el ADN retroviral y el retrovirus será incapaz de autorreplicarse debido a la falta de los genes del retrovirus necesarios para su ciclo vital, utilizando un sistema de suministro retroviral tal para polinucleótidos lo dirigirá a dicho gen y las construcciones a células con proliferación anómala y evitarán a las células normales no en división.

Los polinucleótidos pueden suministrarse directamente a sitios de trastorno/enfermedad proliferativa celular en órganos internos, cavidades corporales y similares mediante el uso de dispositivos de formación de imágenes usados para guiar una aguja de inyección directamente al sitio enfermo. Los polinucleótidos también pueden administrarse a sitios de enfermedad en el momento de intervención quirúrgica.

Por "enfermedad proliferativa de células" se entiende cualquier enfermedad o trastorno animal o humano, que afecta

a una cualquiera o cualquier combinación de órganos, cavidades o partes del cuerpo, que se caracteriza por proliferaciones anómalas locales sencillas o múltiples de células, grupos de células o tejidos benignos o malignos.

Puede administrarse cualquier cantidad de los polinucleótidos siempre que tengan un efecto biológicamente inhibidor sobre la proliferación de las células tratadas. Además, es posible administrar más de uno de los polinucleótidos de forma simultánea en el mismo sitio. Por "inhibición biológica" se entiende inhibición del crecimiento total o parcial así como disminución en la tasa de proliferación o crecimiento de las células. La dosis de inhibición biológica puede determinarse mediante la evaluación de los efectos de los polinucleótidos sobre crecimiento celular proliferativo de forma anómala o maligno diana en cultivo tisular, crecimiento tumoral en animales y cultivo celulares o cualquier otro método conocido para un experto en la materia.

Se describen además terapias basadas en anticuerpos que implican la administración de anticuerpos anti-polipéptidos y anti-polinucleótidos a un paciente mamífero, preferiblemente humano, para tratar una o más de las enfermedades, trastornos y/o afecciones descritas. Los métodos para producir anticuerpos anti-polipéptidos y anti-polinucleótidos policlonales y monoclonales se describen en detalle en otra parte de la presente memoria. Tales anticuerpos pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica o como se describen en la presente memoria.

Un compendio de los modos en los que los anticuerpos de la presente invención pueden usarse terapéuticamente incluye la unión de polinucleótidos o polipéptidos de CCR5 local o sistémicamente en el cuerpo o por citotoxicidad directa del anticuerpo, por ejemplo, según se media por células del complemento (CDC) o efectoras (ADCC). Algunos de estos enfoques se describen en más detalle posteriormente. Teniendo las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, un experto en la materia sabrá cómo usar los anticuerpos de la presente invención para fines de diagnóstico, control o terapéuticos sin experimentación indebida.

En particular, los anticuerpos, fragmentos y derivados de la presente invención son útiles para tratar a un sujeto que tiene o desarrolla enfermedades, trastornos y/o afecciones de diferenciación y/o proliferativos celulares como se describen en la presente memoria. Dicho tratamiento comprende administrar una dosis sencilla o múltiple del anticuerpo, o un fragmento, derivado o un conjugado del mismo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse de forma ventajosa en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos o con linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos, por ejemplo, que sirven para aumentar el número o actividad de células efectoras que interactúan con los anticuerpos.

Se prefiere usar anticuerpos neutralizantes y/o inhibidores *in vivo* potentes y/o de alta afinidad contra polipéptidos o polinucleótidos de CCR5, fragmentos o regiones de los mismos, para ambos inmunoensayos dirigidos a y terapia de enfermedades, trastornos y/o afecciones relacionadas con estos polinucleótidos o polipéptidos, incluyendo fragmentos de los mismos. Tales anticuerpos, fragmentos o regiones preferiblemente tendrán una afinidad por polinucleótidos o polipéptidos, incluyendo fragmentos de los mismos. Las afinidades de unión preferidas incluyen las de una constante de disociación o  $K_d$  menor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M. Las afinidades de unión más preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación o  $K_d$  menor de  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M o  $10^{-8}$  M. Las afinidades de unión aún más preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación o  $K_d$  menor de  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M, o  $10^{-15}$  M.

Además, los polipéptidos pueden ser útiles en la inhibición de angiogénesis de células o tejidos proliferativos, solos, como una proteína de fusión o en combinación con otros polipéptidos directa o indirectamente, como se describe en otro sitio de la presente memoria. Dicho efecto anti-angiogénesis puede conseguirse indirectamente, por ejemplo, a través de la inhibición de células hematopoyéticas específicas de tumor, tales como macrófagos asociados a tumor (Véase Joseph IB, *et al.* J Natl Cancer Inst, 90(21): 1648-53 (1998)). Los anticuerpos dirigidos a los polipéptidos o polinucleótidos también pueden dar como resultado la inhibición de angiogénesis directa o indirectamente (Véase Witte L, *et al.*, Cancer Metastasis Rev. 17(2): 155-61 (1998)).

Los polipéptidos, incluyendo fusiones de proteína G o fragmentos de las mismas pueden ser útiles en la inhibición de células o tejidos proliferativos a través de la inducción de apoptosis. Dichos polipéptidos pueden actuar directa o indirectamente para inducir apoptosis de células y tejidos proliferativos, por ejemplo en la activación de un receptor de dominio de muerte, tal como un receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) 1 CD95 (Fas/APO-1), proteína mediada por apoptosis relacionada con receptor de TNF (TRAMP) y recepto del ligando inductor de apoptosis relacionada con TNF (TRAIL) 1 y 2 (Véase Schutze-Osthoff K, *et al.*, Eur J Biochem 254(3): 439-59 (1998)). Además, dichos polipéptidos pueden inducir apoptosis a través de otros mecanismos, tales como la activación de otras proteínas que activarán apoptosis, o a través de la estimulación de la expresión de dichas proteínas, solas o en combinación con fármacos o adyuvantes de moléculas pequeñas, tales como apoptonina, galectinas, tioredoxinas, proteínas antiinflamatorias (Véase por ejemplo, Mutat Res 400(1-2): 447-55 (1998), Med Hypotheses. 50(5): 423-33 (1998), Chem Biol Interact. Apr 24; 111-112: 23-34 (1998), J Mol Med.76 (6): 402-12 (1998), Int J Tissue React; 20(1): 3-15(1998)).

Los polipéptidos, incluyendo fusiones de proteína G, o fragmentos de los mismos, pueden ser útiles en la inhibición

de la metástasis de células o tejidos proliferativos. La inhibición puede producirse como un resultado directo de la administración de polipéptidos o anticuerpos dirigidos a dichos polipéptidos como se describe en otro sitio de la presente memoria o indirectamente, tal como activando la expresión de proteínas que se sabe que inhiben la metástasis, por ejemplo integrinas alfa 4 (Véase, por ejemplo Curr Top Microbiol Immunol 1998;231: 125-41). Tales efectos terapéuticos de la presente invención pueden conseguirse solos o en combinación con fármacos o adyuvantes de moléculas pequeñas.

Se describe un método para suministrar composiciones que contienen los polipéptidos (por ejemplo composiciones que contienen polipéptidos o anticuerpos de polipéptidos asociados con polipéptidos heterólogos, ácidos nucleicos heterólogos, toxinas o profármacos) a células diana que expresan el polipéptido. El polipéptido o los anticuerpos de polipéptido de la invención pueden asociarse con polipéptidos heterólogos, ácidos nucleicos heterólogos, toxinas o profármacos mediante interacciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes.

Los polipéptidos, fusiones de proteínas o fragmentos de los mismos, son útiles en la potenciación de la inmunogenicidad y/o antigenicidad de células o tejidos proliferativos, directamente, tal como ocurriría si los polipéptidos "vacunaran" la respuesta inmune para responder a antígenos e inmunógenos proliferativos, o indirectamente, tal como en la activación de la expresión de proteínas que se sabe que potencian la respuesta inmune (por ejemplo, quimiocinas), para dichos antígenos e inmunógenos.

**Trastornos Cardiovasculares.** Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), que codifican Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar enfermedades, trastornos y/o afecciones cardiovasculares, incluyendo enfermedad de arteria periférica, tal como isquemia de las extremidades.

Las enfermedades, trastornos y/o afecciones cardiovasculares incluyen anomalías cardiovasculares, tales como fístula arterioarterial, fístula arteriovenosa, malformaciones arteriovenosas cerebrales, defectos cardíacos congénitos, atresia pulmonar y Síndrome de la Cimitarra. Los defectos cardíacos congénitos incluyen coartación aórtica, cor triatriatum, anomalías de los vasos coronarios, corazón en crisscross, dextrocardia, ductus arterioso persistente, anomalía de Ebstein, complejo de Eisenmenger, síndrome de hipoplasia del corazón izquierdo, levocardia, tetralogía de fallot, transposición de los grandes vasos, ventrículo derecho con doble salida, atresia tricuspídea, truncus arteriosus persistente y defectos de los septos del corazón, tales como defecto del septo aortopulmonar, defectos de las almohadillas endocárdicas, Síndrome de Lutembacher, trilogía de Fallot, defectos del septo cardíaco ventricular.

Las enfermedades, trastornos y/o afecciones cardiovasculares también incluyen enfermedad cardíaca, tal como arritmias, enfermedad cardíaca carcinoide, gasto cardíaco alto, gasto cardíaco bajo, taponamiento cardíaco, endocarditis (incluyendo bacteriana), aneurisma cardíaco, parada cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía congestiva, disnea paroxística, edema cardíaco, hipertrofia cardíaca, cardiomiopatía congestiva, hipertrofia del ventrículo izquierdo, hipertrofia del ventrículo derecho, ruptura cardíaca post-infarto, ruptura del septo ventricular, enfermedades de válvula coronaria, enfermedades del miocardio, isquemia del miocardio, efusión pericárdica, pericarditis (incluyendo constrictiva y tuberculosa), neumopericardio, síndrome post-pericardiotomía, enfermedad cardíaca pulmonar, enfermedad cardíaca reumática, disfunción ventricular, hiperemia, complicaciones cardiovasculares del embarazo, Síndrome de la Cimitarra, sífilis cardiovascular y tuberculosis cardiovascular.

Las arritmias incluyen arritmia del seno, fibrilación auricular, aleteo auricular, bradicardia, extrasístole, Síndrome de Adams-Stokes, bloqueo de rama, bloqueo sinoauricular, síndrome del QT largo, parasístole, Síndrome de Lown-Ganong-Levine, síndrome de pre-excitación de tipo Mahaim, Síndrome de Wolff-Parkinson-White, síndrome del nodo enfermo, taquicardias y fibrilación ventricular. Las taquicardias incluyen taquicardia paroxística, taquicardia supraventricular, ritmo idioventricular acelerado, taquicardia de reentrada nodal auriculoventricular, taquicardia auricular ectópica, taquicardia de la unión ectópica, taquicardia de reentrada del nódulo senoauricular, taquicardia sinusal, Torsade de Pointes y taquicardia ventricular.

La enfermedad de válvula cardíaca incluyen insuficiencia de la válvula aórtica, estenosis de la válvula aórtica, murmullos cardíacos, prolapso de la válvula aórtica, prolapso de la válvula mitral, prolapso de la válvula tricúspide, insuficiencia de la válvula mitral, estenosis de la válvula mitral, atresia pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, estenosis de la válvula pulmonar, atresia tricuspídea, insuficiencia de la válvula tricúspide y estenosis de la válvula tricúspide.

Las enfermedades miocárdicas incluyen cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía congestiva, cardiomiopatía hipertrófica, estenosis subvalvular aórtica, estenosis subvalvular pulmonar, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía de Chagas, fibroelastosis endocárdica, fibrosis endomiocárdica, Síndrome de Kearns, lesión por reperfusión miocárdica y miocarditis.

Las isquemias miocárdicas incluyen enfermedad coronaria, tal como angina de pecho, aneurisma coronario, arteriosclerosis coronaria, trombosis coronaria, vasoespasmo coronario, infarto de miocardio y aturdimiento miocárdico.

Las enfermedades cardiovasculares también incluyen enfermedades vasculares tales como aneurismas,

- angiodisplasia, angiomatosis, angiomatosis bacilar, Enfermedad de Hippel-Lindau, Síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber, Síndrome de Sturge-Weber, edema angioneurótico, enfermedades aórticas, Arteritis de Takayasu, aortitis, Síndrome de Leriche, enfermedades oclusivas arteriales, arteritis, enarteritis, poliarteritis nodosa, enfermedades, trastornos y/o afecciones cerebrovasculares, angiopatías diabéticas, retinopatía diabética, embolias, trombosis, eritromelalgia, hemorroides, enfermedad venooclusiva hepática, hipertensión, hipotensión, isquemia, enfermedades vasculares periféricas, flebitis, enfermedad venooclusiva pulmonar, enfermedad de Raynaud, síndrome de CREST, oclusión de la vena retinal, síndrome de la Cimitarra, síndrome de la vena cava superior, telangiectasia, ataxia telangiectasia, telangiectasia hemorrágica hereditaria, varicocele, venas varicosas, úlcera varicosa, vasculitis e insuficiencia venosa.
- 5 Los aneurismas incluyen aneurismas de disección, aneurismas falsos, aneurismas infectados, aneurismas con ruptura, aneurismas aórticos, aneurismas cerebrales, aneurismas coronarios, aneurismas cardíacos y aneurismas ilíacos.
- 10 Las enfermedades oclusivas arteriales incluyen arterioesclerosis, claudicación intermitente, estenosis carotídea, displasias fibromusculares, oclusión vascular mesentérica, enfermedad de Moyamoya, obstrucción de la arteria renal, oclusión de la arteria renal y tromboangeitis obliterans.
- 15 Las enfermedades, trastornos y/o afecciones cerebrovasculares incluyen enfermedades de la arteria carótida, angiopatía amiloide cerebral, aneurisma cerebral, anoxia cerebral, arterioesclerosis cerebral, malformación arteriovenosa cerebral, enfermedades de la arteria cerebral, embolia y trombosis cerebral, trombosis de arteria carótida, trombosis del seno, síndrome de Wallenberg, hemorragia cerebral, hematoma epidural, hematoma subdural, hemorragia subaracnoidea, infarto cerebral, isquemia cerebral (incluyendo transitoria), síndrome del robo de la subclavia, leucomalacia periventricular, cefalea vascular, cefalea en racimos, migraña e insuficiencia vertebrobasilar.
- 20 Las embolias incluyen embolias gaseosas, embolias de fluido amniótico, embolias de colesterol, síndrome del dedo azul, embolias de grasa, embolias pulmonares y tromboembolias. Las trombosis incluyen trombosis coronaria, trombosis de vena hepática, oclusión de la vena retinal, trombosis de arteria carótida, trombosis de seno, trombosis de Wallenberg y tromboflebitis.
- 25 La isquemia incluye isquemia cerebral, colitis isquémica, síndromes de compartimento, síndrome del compartimento anterior, isquemia miocárdica, lesiones por reperusión e isquemia de extremidades periféricas. La vasculitis incluye aortitis, arteritis, Síndrome de Behcet, Síndrome de Churg-Strauss, síndrome del ganglio linfático mucocutáneo, tromboangeitis obliterante, vasculitis de hipersensibilidad, púrpura de Schoenlein-Henoch, vasculitis cutánea alérgica y granulomatosis de Wegener.
- 30 Los polinucleótidos o polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) son especialmente eficaces para el tratamiento de isquemia de extremidades crítica y enfermedad coronaria.
- 35 Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden administrarse usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, inyección con aguja directa en el sitio de suministro, inyección intravenosa, administración tópica, infusión por catéter, inyector de biolística, aceleradores de partículas, depósitos de esponja de espuma de gel, otros materiales de depósito disponibles en el mercado, bombas osmóticas, formaciones farmacéuticas sólidas orales o de supositorio, aplicaciones tópicas o de decantación durante la cirugía, suministro de aerosol. Tales métodos se conocen en la técnica. Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden administrarse como parte de un compuesto terapéutico descrito en más detalle posteriormente. Se describen métodos para suministrar los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en más detalle en la presente memoria.
- 40

#### **Tratamiento de Trastornos de Embolia de Carbohidratos**

- 45 Los polinucleótidos y/o polipéptidos que corresponden a este gen y/o agonistas o antagonistas de esos polipéptidos (incluyendo anticuerpos) así como fragmentos y variantes de esos polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y antagonistas, pueden usarse para diagnosticar, pronosticar, tratar, prevenir o mejorar enfermedades y trastornos asociados con metabolismo de la glucosa o captación de la glucosa en células aberrante.
- 50 Los polinucleótidos y/o polipéptidos que corresponden a este gen y/o agonistas y/o antagonistas de los mismos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar, tratar, prevenir y/o aliviar diabetes melitus de tipo I (diabetes melitus insulino dependiente, IDDM).
- Los polinucleótidos y/o polipéptidos correspondientes a este gen y/o agonistas y/o antagonistas de los mismos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar, tratar, prevenir y/o aliviar la diabetes melitus de tipo II (diabetes melitus resistente a insulina).
- 55 Los polinucleótidos y/o polipéptidos que corresponden a este gen y/o antagonistas de los mismos (especialmente anticuerpos antagonistas o neutralizadores) pueden usarse para diagnosticar, pronosticar, tratar, prevenir y/o aliviar

las afecciones asociadas con diabetes melitus (tipo I o tipo n), que incluyen, pero sin limitación, cetoacidosis diabética, coma diabético, coma hiperglucémico-hiperosmolar no cetótico, ataques, confusión mental, somnolencia, enfermedad cardiovascular (por ejemplo, enfermedad cardíaca, aterosclerosis, enfermedad microvascular, hipertensión, apoplejía y otras enfermedades y trastornos como se describen en la sección “Trastornos Cardiovasculares”), dislipidemia, enfermedad renal (por ejemplo, insuficiencia renal y nefropatía) daño nervioso, neuropatía, alteración de la visión (por ejemplo retinopatía diabética y ceguera), úlceras y cicatrización alterada, infecciones (por ejemplo, enfermedades y trastornos infecciosos como se describen en la sección “Enfermedades Infecciosas” especialmente del tracto urinario y la piel), síndrome del túnel carpiano y contractura de Dupuytren.

Los polinucleótidos y/o polipéptidos que corresponden a este gen y/o agonistas y/o antagonistas de los mismos se administran a un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano para regular el peso del animal. Los polinucleótidos y/o polipéptidos que corresponden a este gen y/o agonistas o antagonistas de los mismos se administran a un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano, para controlar el peso del animal mediante la modulación de una ruta bioquímica que implica insulina. Los polinucleótidos y/o polipéptidos que corresponden a este gen y/o agonistas y/o antagonistas de los mismos se administran a un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano, para controlar el peso del animal mediante la modulación de una ruta bioquímica que implica factor de crecimiento de tipo insulina.

**Actividad Anti-Angiogénesis.** El equilibrio de origen natural entre estimuladores e inhibidores endógenos de angiogénesis es uno en el que predominan las influencias inhibitoras. Rastinejad *et al.*, Cell 56: 345-355 (1989). En los raros casos en los que se produce neovascularización en condiciones fisiológicas normales, tales como procesos de cicatrización, regeneración de órganos, desarrollo embrionario y reproducción femenina, la angiogénesis se regula de forma rigurosa y se delimita espacial y temporalmente. En condiciones de angiogénesis patológica tales como las que caracterizan el crecimiento de tumores sólidos, estos controles reguladores fallan. La angiogénesis desregulada se convierte en patológica y mantiene la progresión de muchas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Varias enfermedades graves están dominadas por neovascularización anómala incluyendo crecimiento de tumores sólidos y metástasis, artritis, algunos tipos de enfermedades, trastornos y/o afecciones oculares y psoriasis. Véase, por ejemplo, revisiones de Moses *et al.*, Biotech. 9: 630-634 (1991); Folkman *et al.*, N. Engl. J. Med, 333: 1757-1763 (1995); Auerbach *et al.*, J. Microvasc. Res. 29: 401-411 (1985); Folkman, Advances in Cancer Research, eds. Klein y Weinhouse, Academic Press, Nueva York, pág. 175-203 (1985); Patz, Am. J. Ophthalmol. 94: 715-743 (1982); y Folkman *et al.*, Science 221: 719-725 (1983). En varias afecciones patológicas, el proceso de angiogénesis contribuye a la patología. Por ejemplo, se han acumulado datos significativos que sugieren que el crecimiento de tumores sólidos depende de angiogénesis. Folkman y Klagsbrun, Science 235: 442-447 (1987).

Se describe un tratamiento de enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con neovascularización mediante la administración de los polinucleótidos y/o polipéptidos así como agonistas o antagonistas. Las afecciones malignas y metastásicas que pueden tratarse con los polinucleótidos y polipéptidos o agonistas o antagonistas incluyen, pero sin limitación, tumores malignos, tumores sólidos y cánceres descritos en la presente memoria y conocidos de otro modo en la técnica (para una revisión de tales trastornos, véase Fishman *et al.*, Medicine, 2ª Ed., J. B. Lippincott Co., Filadelfia (1985)). De este modo, se describe un método para tratar una enfermedad y/o trastorno relacionado con angiogénesis, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido, polipéptido, antagonista y/o agonista. Por ejemplo, los polinucleótidos, polipéptidos, antagonistas y/o agonistas pueden utilizarse en una diversidad de métodos adicionales para tratar de forma terapéutica o prevenir un cáncer o un tumor. Los cánceres que pueden tratarse con polinucleótidos, polipéptidos, antagonistas y/o agonistas incluyen, pero sin limitación tumores sólidos, incluyendo cáncer de próstata, de pulmón, de mama, de ovario, de estómago, de páncreas, de laringe, de esófago, de testículo, de hígado, de parótida, de tracto biliar, de colon, de recto, de cuello del útero, del útero, del endometrio, de riñón, de vejiga, de tiroides; tumores primarios y metástasis; melanomas; glioblastoma; sarcoma de Kaposi; leiomiomas; cáncer pulmonar de células no pequeñas; cáncer colorrectal; tumores malignos avanzados; y tumores de origen sanguíneo tales como leucemias. Por ejemplo, los polinucleótidos, polipéptidos, antagonistas y/o agonistas pueden suministrarse por vía tópica, para tratar o prevenir cánceres tales como cáncer de piel, tumores de cabeza y cuello, tumores de mama y sarcoma de Kaposi.

Dentro de otros aspectos más, los polinucleótidos, polipéptidos, antagonistas y/o agonistas pueden utilizarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar formas superficiales de cáncer de vejiga mediante, por ejemplo, administración intravesical. Los polinucleótidos, polipéptidos, antagonistas y/o agonistas pueden suministrarse directamente en el tumor o cerca del sitio del tumor, mediante inyección o un catéter. Por supuesto, como apreciará el experto en la materia, el modo apropiado de administración variará de acuerdo con el cáncer a tratar. Otros modos de suministro se analizan en la presente memoria.

Los polinucleótidos, polipéptidos, antagonistas y/o agonistas pueden ser útiles en el tratamiento de otras enfermedades, trastornos y/o afecciones, además de cánceres, que implican angiogénesis. Estas enfermedades, trastornos y/o afecciones incluyen, pero sin limitación: tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, traquiomas y granulomas piógenos; placas arteroscleróticas; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis, retinoblastomas, uveítis y Pterigia (crecimiento de vaso sanguíneo anómalo) del ojo; artritis reumatoide; psoriasis; cicatrización retardada; endometriosis;

vasculogénesis; granulaciones; cicatrices hipertróficas (queloides); fracturas no de unión; esclerodermia; traquioma; adhesiones vasculares; angiogénesis miocárdica; colaterales coronarias; colaterales cerebrales; malformaciones arteriovenosas; angiogénesis isquémica de extremidades; Síndrome de Osler-Webber; neovascularización de placas; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma, displasia fibromuscular; granulación de heridas; enfermedad de Crohn y aterosclerosis.

Por ejemplo, se proporcionan métodos para tratar cicatrices hipertróficas y queloides, que comprenden la etapa de administrar un polinucleótido, polipéptido, antagonista y/o agonista a una cicatriz hipertrófica o queloide.

Los polinucleótidos, polipéptidos, antagonistas y/o agonistas pueden inyectarse directamente en una cicatriz hipertrófica o queloide, para prevenir la progresión de estas lesiones. Esta terapia es de particular valor en el tratamiento profiláctico de afecciones que se sabe que dan como resultado el desarrollo de cicatrices hipertróficas y queloides (por ejemplo, quemaduras) y se inicia preferiblemente después de que la fase proliferativa haya tenido tiempo de progresar (aproximadamente 14 días después de la lesión inicial), pero antes del desarrollo de cicatriz hipertrófica o queloide. Como se ha indicado anteriormente, se describen métodos para tratar enfermedades neovasculares del ojo, incluyendo por ejemplo, neovascularización de la córnea, glaucoma neovascular, retinopatía diabética proliferativa, fibroplasia retrolental y degeneración macular.

Además, las enfermedades, trastornos y/o afecciones oculares asociadas con neovascularización que pueden tratarse con los polinucleótidos y polipéptidos (incluyendo agonistas y/o antagonistas) incluyen, pero sin limitación; glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinoblastoma, fibroplasia retrolental, uveítis, retinopatía del prematuro, degeneración macular, neovascularización de injerto corneal, así como otras enfermedades inflamatorias oculares, tumores oculares y enfermedades asociadas con coroides o neovascularización del iris. Véase, por ejemplo, revisiones por Waltman *et al.*, Am. J. Ophthal. 85: 704-710 (1978) y Gartner *et al.* Surv. Ophthal. 22: 291-312 (1978).

De este modo, se describen métodos para tratar enfermedades neovasculares del ojo tales como neovascularización de la córnea (incluyendo neovascularización de injerto corneal), que comprenden la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto (como se ha descrito anteriormente) a la córnea, de modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos. Brevemente, la córnea es un tejido que normalmente carece de vasos sanguíneos. Ciertas afecciones patológicas sin embargo, pueden extender capilares a la córnea desde el plexo vascular pericorneal del limbus. Cuando la córnea se vasculariza, también se enturbia, dando como resultado una disminución de la agudeza visual del paciente. La pérdida visual puede resultar completa si la córnea se vuelve completamente opaca. Una amplia diversidad de enfermedades, trastornos y/o afecciones pueden dar como resultado neovascularización de la córnea, incluyendo por ejemplo, infecciones de la córnea (por ejemplo, traqueoma, queratitis de herpes simple, leishmaniasis y oncocerciasis), procesos inmunológicos (por ejemplo, rechazo de injertos y síndrome de Stevens-Johnson), quemaduras alcalinas, traumatismo, inflamación (de cualquier causa), estados deficitarios nutricionales y tóxicos y como una complicación de llevar lentes de contacto.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden prepararse para administración tópica en solución salina (combinados con cualquiera de los conservantes y agentes antimicrobianos habitualmente usado en preparaciones oculares) y administrarse en forma de colirio. La solución o suspensión puede prepararse en su forma pura y administrarse varias veces al día. Como alternativa, también pueden administrarse composiciones antiangiogénicas, preparadas como se ha descrito anteriormente, directamente a la córnea. La composición antiangiogénica puede prepararse con un polímero mucoadhesivo que se une a la córnea. Los factores antiangiogénicos o composiciones antiangiogénicas pueden utilizarse como adjuntos a la terapia de esteroides convencional. También puede ser útil la terapia tópica de forma profiláctica en lesiones de la córnea que se sabe que tienen una alta probabilidad de inducir una respuesta angiogénica (tal como quemaduras químicas). En estos casos el tratamiento, probablemente en combinación con esteroides, puede implantarse inmediatamente para ayudar a prevenir complicaciones posteriores.

Los compuestos descritos anteriormente pueden inyectarse directamente en el estroma corneal por un oftalmólogo con guía microscópica. El sitio preferido de inyección puede variar con la morfología de la lesión individual, pero el objetivo de la administración será colocar la composición en el frente de avance de la vasculatura (es decir, intercalado entre los vasos sanguíneos y la córnea normal). En la mayoría de los casos esto implicaría inyección corneal perilímbica para "proteger" la córnea de los vasos sanguíneos en avance. Este método también pueden utilizarse poco después de una lesión corneal para prevenir de forma profiláctica la neovascularización corneal. En esta situación el material podría inyectarse en la córnea perilímbica intercalada entre la lesión corneal y su aporte sanguíneo límbico potencial no deseado. Tales métodos también pueden utilizarse de una manera similar para evitar la invasión capilar de córneas trasplantadas. En una forma de liberación prolongada las inyecciones podrían requerirse solamente 2-3 veces al año. También podría añadirse un esteroide a la solución de inyección para reducir la inflamación resultante de la propia inyección.

Se describen métodos para tratar glaucoma neovascular, que comprenden la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido, polipéptido, antagonista y/o agonista al ojo, de modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos. El compuesto puede administrarse por vía tópica al ojo para tratar o prevenir formas tempranas de glaucoma neovascular. El compuesto puede implantarse por inyección en la región del ángulo de la cámara anterior. El compuesto también puede colocarse en cualquier localización de modo que el

compuesto se libere de forma continua en el humor acuoso. Se describen métodos para tratar retinopatía diabética proliferativa, que comprenden la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido, polipéptido, antagonista y/o agonista a los ojos, de modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos.

- 5 Puede tratarse la retinopatía diabética proliferativa mediante inyección en el humor acuoso o el vítreo para aumentar la concentración local del polinucleótido, polipéptido, antagonista y/o agonista en la retina. Preferiblemente, este tratamiento debería iniciarse antes de la adquisición de enfermedad grave que requiere fotocoagulación.

Se describen métodos para tratar fibroplasia retrolental, que comprenden la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido, polipéptido, antagonista y/o agonista al ojo, de modo que se inhibe la formación de vasos sanguíneos. El compuesto puede administrarse por vía tópica, mediante inyección intravítrea y/o mediante implantes intraoculares.

- 10 Adicionalmente, las enfermedades, trastornos y/o afecciones que pueden tratarse con los polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y/o antagonistas incluyen, pero sin limitación, hemangioma, artritis, soriasis, angiofibroma, placas ateroscleróticas, cicatrización retardada, granulaciones, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, fracturas sin unión, síndrome de Osler-Weber, granuloma piógeno, esclerodermia, traquioma y adhesiones vasculares.

- Además, las enfermedades, trastornos y/o afecciones y/o estados, que pueden tratarse con los polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y/o antagonistas incluyen, pero sin limitación, tumores sólidos, tumores de origen en la sangre tales como leucemias, metástasis tumoral, sarcoma de Kaposi, tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, traquiomas y granulomas piógenos, artritis reumatoide, soriasis, enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis, retinoblastoma y uveítis, cicatrización retardada, endometriosis, vasculogénesis, granulaciones, cicatrices hipertróficas (queloides), fracturas sin unión, esclerodermia, traquioma, adhesiones vasculares, angiogénesis miocárdica, colaterales coronarios, colaterales cerebrales, malformaciones arteriovenosas, angiogénesis isquémica de las extremidades, Síndrome de Osler-Webber, neovascularización de placas, telangiectasia, articulaciones hemofílicas, angiofibroma, displasia fibromuscular, granulación de heridas, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, agente de control de la natalidad mediante la prevención de la vascularización requerida para la implantación del embrión que controla la menstruación, enfermedades que tienen angiogénesis como una consecuencia patológica tal como enfermedad del araño de gato (Rochele minalia quintosa), úlceras (*Helicobacter pylori*), Bartonellosis y angiomatosis bacilar.

- En un aspecto del método de control de natalidad, se administra una cantidad del compuesto suficiente para bloquear la implantación del embrión antes o después de que se haya producido la relación sexual y la fertilización, proporcionando de este modo un método eficaz de control de la natalidad, posiblemente un método "del día después". También pueden usarse polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y/o antagonistas en el control de la menstruación o administrarse como un fluido de lavado peritoneal o para implantación peritoneal en el tratamiento de endometriosis.

Los polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y/o antagonistas pueden incorporarse en suturas quirúrgicas para prevenir granulomas de los puntos.

- Los polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y/o antagonistas pueden utilizarse en una amplia diversidad de procedimientos quirúrgicos. Por ejemplo, una composición (en forma de, por ejemplo, una pulverización o una película) puede utilizarse para recubrir o extenderse por pulverización en un área antes de la retirada de un tumor, para aislar los tejidos circundantes normales del tejido maligno y/o para evitar la expansión de la enfermedad a tejidos circundantes. Las composiciones (por ejemplo, en forma de un pulverizador) pueden suministrarse mediante procedimientos endoscópicos para recubrir tumores o inhibir angiogénesis en una localización deseada. Las mallas quirúrgicas que se han recubierto con composiciones antiangiogénicas pueden utilizarse en cualquier procedimiento en el que podría utilizarse una malla quirúrgica. Una malla quirúrgica cargada con una composición antiangiogénica puede utilizarse durante la cirugía de resección de cáncer abdominal (por ejemplo, después de resección de colon) para proporcionar soporte a la estructura y para liberar una cantidad del factor antiangiogénico.

- Se describen métodos para tratar sitios de escisión de tumores, que comprenden administrar un polinucleótido, polipéptido, agonista y/o antagonista a los márgenes de la resección de un tumor después de la escisión, de modo que se inhibe la recurrencia local del cáncer y la formación de nuevos vasos sanguíneos en el sitio. El compuesto antiangiogénico puede administrarse directamente al sitio de escisión del tumor (por ejemplo, aplicarse por hisopo, frotando o recubriendo de otro modo los márgenes de la resección del tumor con el compuesto antiangiogénico). Como alternativa, los compuestos antiangiogénicos pueden incorporarse en pastas quirúrgicas conocidas antes de la administración. Los compuestos antiangiogénicos pueden aplicarse después de resecciones hepáticas para tumores malignos y después de operaciones neuroquirúrgicas.

Los polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y/o antagonistas pueden administrarse al margen de la resección de una amplia diversidad de tumores, incluyendo por ejemplo, tumores de mama, de colon, de cerebro y hepáticos. Por

ejemplo, los compuestos antiangiogénicos pueden administrarse en el sitio de un tumor neurológico después de la escisión, de modo que se inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos en el sitio.

Los polinucleótidos, polipéptidos, agonistas y/o antagonistas pueden también administrarse junto con otros factores antiangiogénicos. Los ejemplos representativos de otros factores antiangiogénicos incluyen: Factor Anti-Invasivo, ácido retinoico y derivados de los mismos, Suramina, Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa-1, Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa-2, Inhibidor del Activador de Plasminógeno 1, Inhibidor del Activador de Plasminógeno 2 y diversas formas de los metales de transición ligeros del "grupo d".

Los metales de transición más ligeros del "grupo d" incluyen, por ejemplo, vanadio, molibdeno, tungsteno, titanio, niobio y tántalo. Tales especies de metales de transición pueden formar complejos de metales de transición. Los complejos adecuados de las especies de metales de transición anteriormente mencionadas incluyen complejos de metales de transición oxo.

Los ejemplos representativos de complejos de vanadio incluyen complejos de oxovanadio tales como complejos de vanadato y vanadilo. Los complejos de vanadato adecuados incluyen complejos de metavanadato y ortovanadato tales como, por ejemplo, metavanadato de amonio, metavanadato sódico y ortovanadato sódico. Los complejos de vanadilo adecuados incluyen, por ejemplo, acetilacetionato de vanadilo y sulfato de vanadilo incluyendo sulfatos de vanadilo hidratos tales como sulfatos de vanadilo mono y trihidratos.

Los ejemplos representativos de complejos de tungsteno y molibdeno también incluyen complejos oxo. Los complejos de oxotungsteno adecuados incluyen complejos de tungstato y óxido de tungsteno. Los complejos de tungstato adecuados incluyen tungstato de amonio, tungstato cálcico, tungstato sódico dihidrato y ácido tungstico. Los óxidos de tungsteno adecuados incluyen óxido de tungsteno (IV) y óxido de tungsteno (VI). Los complejos de oxomolibdeno adecuados incluyen complejos de molibdato, óxido de molibdeno y molibdenilo. Los complejos de molibdato adecuados incluyen molibdato de amonio y sus hidratos, molibdato sódico y sus hidratos y molibdato potásico y sus hidratos. Los óxidos de molibdeno adecuados incluyen óxido de molibdeno (VI), óxido de molibdeno (VI) y ácido molibdico. Los complejos de molibdenilo adecuados incluyen, por ejemplo, acetilacetionato de molibdenilo. Otros complejos de tungsteno y molibdeno adecuados incluyen derivados hidroxilo derivados de, por ejemplo, glicerol, ácido tartárico y azúcares.

También puede utilizarse una amplia diversidad de otros factores antiangiogénicos dentro del contexto de la presente descripción. Los ejemplos representativos incluyen factor de plaquetas 4; sulfato de protamina; derivados de quitina sulfatada (preparados de conchas de cangrejos de las nieves), (Murata *et al.*, Cancer Res. 51: 22-26, 1991); Complejo de Peptidoglucano Polisacárido Sulfatado (SP- PG) (la función de este compuesto puede potenciarse por la presencia de esteroides tales como estrógeno y citrato de tamoxifeno); estaurosporina, moduladores de metabolismo de la matriz, incluyendo por ejemplo, análogos de prolina, cishidroxiprolina, d,L-3,4-deshidroprolina, Tiaprolina, alfa, alfa-dipiridil, aminopropionitril fumarato; 4-propil-5-(4-piridinil)-2(3H)-oxazolona; Metotrexato; Mitoxantrona; Heparina; Interferones; suero de Macroglobulina 2; ChIMP-3 (Pavloff *et al.*, J. Bio. Chem. 267: 17321-17326, 1992); Quimostatina (Tomkinson *et al.*, Biochem J. 286: 475-480, 1992); Tetradecasulfato de Ciclodextrina; Eponemicina; Camptotecina; Fumagilina (Ingber *et al.*, Nature 348: 555-557, 1990); Tiomalato Sódico de Oro ("GST"; Matsubara y Ziff, J. Clin. Invest. 79: 1440-1446; 1987); suero de anticollagenasa; antiplasmina alfa2 (Holmes *et al.*, J. Biol. Chem. 262(4): 1659-1664, 1987); Bisantreno (National Cancer Institute); disodio de Lobenzarit (ácido N-(2)-carboxifenil-4- cloroantrónilico disódico o "CCA"; Takeuchi *et al.*, Agents Actions 36: 312-316, 1992); Talidomida; esteroide Angostático; AGM-1470; carboxinaminolmidazol; e inhibidores de metaloproteinasa tales como BB94.

**Actividad de Unión.** Pueden usarse polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para explorar con respecto a moléculas que se unen al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o con respecto a moléculas a las que se une el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). La unión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y la molécula puede activar (agonista), aumentar, inhibir (antagonista) o disminuir la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o la molécula unida. Los ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas (por ejemplo receptores) o moléculas pequeñas.

Preferiblemente, la molécula está cercanamente relacionada con el ligando natural del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), por ejemplo, un fragmento del ligando o un sustrato natural, un ligando, un mimético estructural o funcional. (Véase, Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology 1(2):Capítulo 5 (1991). De forma similar, la molécula puede estar cercanamente relacionada con el receptor natural al que se une el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o al menos, un fragmento del receptor capaz de unirse al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, sitio activo). En ambos casos, la molécula puede diseñarse de forma racional usando técnicas conocidas.

Preferiblemente, la exploración con respecto a estas moléculas implica producir células apropiadas que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), como una proteína secretada o en la membrana celular. Las células preferidas incluyen células de mamíferos, levadura, *Drosophila*, o *E. coli*. Las células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (o membrana celular que contiene el polipéptido expresado) se ponen en contacto preferiblemente después con un compuesto de ensayo que contiene potencialmente la molécula para observar la



unión, estimulación o inhibición de la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o la molécula.

El ensayo puede simplemente ensayar la unión de un compuesto candidato con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), detectándose la unión mediante un marcador o en un ensayo que implica competición con un competidor marcado. Además, la prueba puede ensayar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por la unión al Receptor de Quimiocina de proteína G.

Como alternativa, el ensayo puede llevarse a cabo usando preparaciones sin células, polipéptidos/moléculas fijadas con un soporte sólido, bibliotecas químicas o mezclas de productos naturales. El ensayo también puede comprender simplemente las etapas de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), medir la actividad o unión de Receptor de Quimiocina de proteína G/molécula y comparar la actividad o unión de Receptor de Quimiocina de proteína G/molécula con un patrón.

Preferiblemente, un ensayo de ELISA puede medir el nivel o actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una muestra (por ejemplo, muestra biológica) usando un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede medir el nivel o actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) por unión, directa o indirectamente, con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o mediante competición con el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con respecto a un sustrato.

Adicionalmente, los ligandos a los que se une el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden identificarse por numerosos métodos conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, selección de ligando y clasificación por FACS (Coligan, *et al.*, Current Protocols in Immun., 1(2), Capítulo 5, (1991). Por ejemplo, se emplea clonación de expresión en la que se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible a los polipéptidos, por ejemplo, células NIH3T3 que se sabe que contienen múltiples receptores para las proteínas de la familia FGF y células SC-3 y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles a los polipéptidos. Las células transfectadas que se cultivan en portaobjetos de vidrio se exponen al polipéptido de CCR5, después de que se hayan marcado. Los polipéptidos pueden marcarse por una diversidad de medios que incluyen yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio.

Después de fijación e incubación, los portaobjetos se someten a análisis autorradiográfico. Se identifican los grupos positivos y se preparan y re-transfectan los subgrupos usando un procedimiento de subagrupación y reexploración iterativos, produciendo con el tiempo un clon único que codifica el receptor potencial.

Como un enfoque alternativo para la identificación de receptores, los polipéptidos marcados pueden unirse por fotoafinidad con una membrana celular o preparaciones de extracto que expresan la molécula receptora. El material entrecruzado se resuelve por análisis de PAGE y se expone a película de rayos X. El complejo marcado que contiene los receptores de los polipéptidos puede escindirse, resolverse en fragmentos peptídicos y someterse a microsecuenciación proteica. La secuencia de aminoácidos obtenida de microsecuenciación se usaría para diseñar un conjunto de sondas oligonucleotídicas degeneradas para explorar una biblioteca de ADNc para identificar los genes que codifican los receptores potenciales.

Además, las técnicas de combinación de genes, combinación de motivos, combinación de exones y/o combinación de codones (denominadas de forma colectiva "barajado de ADN") pueden emplearse para modular las actividades del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) generando de este modo de forma eficaz agonistas y antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Véase *generalmente*, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458, y Patten, P. A., *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 724-33 (1997); Harayama, S. Trends Biotechnol. 16(2): 76-82 (1998); Hansson, L. O., *et al.*, J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999); y Lorenzo, M. M. y Blasco, Biotechniques 24(2): 308-13 (1998). La alteración de los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y los polipéptidos correspondientes pueden conseguirse mediante barajado de ADN. El barajado de ADN implica el ensamblaje de dos o más segmentos de ADN en una molécula Receptora de Quimiocina de proteína G (CCR5) deseada mediante recombinación homóloga o específica de sitio. Los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y polipéptidos correspondientes pueden alterarse sometiéndolos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos aleatoria u otros métodos antes de la recombinación. Uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. De una o más moléculas heterólogas. Las moléculas heterólogas son miembros de la familia del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). La molécula heteróloga puede ser un factor de crecimiento tal como, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-I), factor de crecimiento transformante (TGF)-alfa, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), TGF-beta, proteína morfogenética del hueso (BMP)-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, activinas A y B, decapentaplégico(dpp), 60A, OP-2, dorsalina, factores de diferenciación de crecimiento (GDF), factor nodal, MIS, inhibina-alfa, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta5 y factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).

Otros fragmentos preferidos son fragmentos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) biológicamente activos. Los fragmentos biológicamente activos son los que muestran actividad similar, pero no necesariamente

idéntica, a una actividad del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). La actividad biológica de los fragmentos pueden incluir una actividad deseada mejorada o una actividad no deseada disminuida.

Adicionalmente, se describe un método para explorar compuestos para identificar los que modulan la acción de polipéptidos de CCR5. Un ejemplo de un ensayo tal comprende combinar una célula fibroblástica de mamífero, un polipéptido de CCR5, el compuesto a explorar y  $^3\text{H}$  timidina en condiciones de cultivo celular en las que la célula fibroblástica normalmente proliferaría. Puede realizarse un ensayo control en ausencia del compuesto a explorar y compararse con la cantidad de proliferación de fibroblastos en presencia del compuesto para determinar si el compuesto estimula la proliferación determinando la captación de  $^3\text{H}$  timidina en cada caso. La cantidad de proliferación de células fibroblásticas se mide mediante cromatografía de centelleo líquido que mide la incorporación de  $^3\text{H}$  timidina. Pueden identificarse compuestos tanto agonistas como antagonistas por este procedimiento.

En otro método, una célula de mamífero o preparación de membrana que expresa un receptor para un polipéptido descrito en la presente memoria se incuba con un polipéptido marcado descrito en la presente memoria en presencia del compuesto. La capacidad del compuesto para potenciar o bloquear esta interacción puede después medirse. Como alternativa, se mide la respuesta de un sistema de segundo mensajero conocido después de interacción de un compuesto a explorar y el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y se mide la capacidad del compuesto para unirse con el receptor e inducir una respuesta de segundo mensajero para determinar si el compuesto es un agonista o antagonista potencial. Tales sistemas del segundo mensajero incluyen pero sin limitación, AMPc, guanilato ciclase, canales iónicos o hidrólisis de fosfoinositida.

Todos estos ensayos anteriores pueden usarse como marcadores de diagnóstico o pronóstico. Las moléculas descubiertas usando estos ensayos pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar enfermedad o para proporcionar un resultado particular en un paciente (por ejemplo, crecimiento de vasos sanguíneos) mediante la activación o inhibición del polipéptido/molécula. Además, los ensayos pueden descubrir agentes que pueden inhibir o potenciar la producción de los polipéptidos a partir de células o tejidos manipulados de forma adecuada. Por lo tanto, se describe un método para identificar compuestos que se unen al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto de unión candidato con Receptor de Quimiocina de proteína G; y (b) determinar si se ha producido unión. Además, se describe un método para identificar agonistas/antagonistas que comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto candidato con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), (b) ensayar una actividad biológica y (b) determinar si se ha alterado una actividad biológica del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Además, se podrían identificar moléculas que se unen al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) experimentalmente usando las regiones de lámina plegada en beta descritas en la FIGURA 3 y la Tabla 1. Se describen polinucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden, o como alternativa que consisten en, la secuencia de aminoácidos de cada región de lámina plegada en beta descrita en la FIGURA 3/Tabla 1. Se describen polinucleótidos que codifican polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprenden, o como alternativa consisten en, cualquier combinación de todas las regiones de lámina plegada en beta descritas en la FIGURA 3/Tabla 1. Se describen polipéptidos que comprenden, o como alternativa consisten en, la secuencia de aminoácidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de cada una de las regiones de lámina plegada en beta descritas en la FIGURA 3/Tabla 1. Se describen polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprenden, o como alternativa que consisten en, cualquier combinación de todas las regiones de lámina plegada en beta descritas en la FIGURA 3/Tabla 1.

### **Suministro Dirigido**

Se describe un método para suministrar composiciones a células diana que expresan un receptor para un polipéptido de CCR5 o células que expresan una forma unida a célula de un polipéptido de CCR5.

Como se analiza en la presente memoria, los polipéptidos o anticuerpos de la invención pueden asociarse con polipéptidos heterólogos, ácidos nucleicos heterólogos, toxinas o profármacos mediante interacciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes. Se describe un método para el suministro específico de composiciones de la invención a células mediante la administración de polipéptidos o anticuerpos de la invención que están asociados con polipéptidos heterólogos o ácidos nucleicos. Se describe un método para suministrar una proteína terapéutica a las células diana. En otro ejemplo, se describe un método para suministrar un ácido nucleico monocatenario (por ejemplo, antisentido o de ribozimas) o ácido nucleico bicatenario (por ejemplo, ADN que puede integrarse en el genoma de la célula o replicar de forma episomal y que puede transcribirse) en la célula diana.

También se describe un método para la destrucción específica de células (por ejemplo, la destrucción de células tumorales) mediante la administración de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos o anticuerpos de la invención) en asociación con toxinas o profármacos citotóxicos.

Por "toxina" se entienden compuestos que se unen y activan sistemas efectores citotóxicos endógenos, radioisótopos, holotoxinas, toxinas modificadas, subunidades catalíticas de toxinas o cualquier molécula o enzima que no esté normalmente presente en o sobre la superficie de una célula que en condiciones definidas causa la muerte de la célula. Las toxinas que pueden usarse de acuerdo con los métodos incluyen, pero sin limitación,

- radioisótopos conocidos en la técnica, compuestos tales como, por ejemplo, anticuerpos (o partes de los mismos que contienen fijación a complemento) que se unen a un sistema efector citotóxico endógeno inducido o inherente, timidina quinasa, endonucleasa, RNasa, toxina alfa, ricina, abrina, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina de la difteria, saponina, momordina, gelonina, proteína antiviral de ombú, alfa-sarcina y toxina del cólera. Por "profármaco citotóxico" se entiende un compuesto no tóxico que se convierte por una enzima normalmente presente en la célula, en un compuesto citotóxico. Los profármacos citotóxicos que pueden usarse de acuerdo con los métodos incluyen, pero sin limitación, derivados de glutamilo de agente alquilante de mostaza de ácido benzoico, derivados fosfato de etopósido o mitomicina C, citosina arabinósido, daunorrubicina y derivados de fenoxiacetamida de doxorrubicina.

### **Exploración de Fármacos**

- Se contempla adicionalmente el uso de los polipéptidos, o los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, para explorar con respecto a moléculas que modifican las actividades de los polipéptidos. Dicho método incluiría poner en contacto el polipéptido con un compuesto o compuestos seleccionados sospechosos de tener actividad antagonista o agonista y ensayar la actividad de estos polipéptidos después de la unión.

- La presente descripción es particularmente útil para exploración de compuestos terapéuticos mediante el uso de los polipéptidos o fragmentos de unión de los mismos, en cualquiera de una diversidad de técnicas de exploración de fármacos. El polipéptido o fragmento empleado en dicho ensayo puede fijarse en un soporte sólido, expresarse en una superficie celular, estar libre en solución o localizarse intracelularmente. Un método de exploración de fármacos utiliza células hospedadoras eucariotas o procariotas que se transforman de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido o fragmento. Los fármacos se exploran contra dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Se pueden medir, por ejemplo, la formulación de complejos entre el agente que se ensaya y un polipéptido.

- De este modo, se describen métodos para explorar con respecto a fármacos o cualquier otro agente que afecte a las actividades mediadas por los polipéptidos. Estos métodos comprenden poner en contacto dicho agente con un polipéptido o un fragmento del mismo y ensayar con respecto a la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido o un fragmento del mismo, por métodos bien conocidos en la técnica. En un ensayo de unión competitiva tal, los agentes a explorar típicamente están marcados. Después de la incubación, se separa el agente libre del presente en forma unida y la cantidad de marcador libre o no en complejo es una medida de la capacidad de un agente particular para unirse a los polipéptidos.

- Otra técnica para exploración de fármacos proporciona exploración de alto rendimiento para compuestos que tienen afinidad de unión adecuada con los polipéptidos y se describe en gran detalle en la Solicitud de Patente Europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. Indicado brevemente, se sintetiza gran variedad de compuestos de ensayo de péptidos pequeños diferentes en un sustrato sólido, tal como puntas de plástico o cualquier otra superficie. Los compuestos de ensayo peptídicos se hacen reaccionar con los polipéptidos y se lavan. Los polipéptidos unidos se detectan después mediante métodos bien conocidos en la técnica. Se recubren placas con polipéptidos purificados directamente para su uso en las técnicas de exploración de fármacos anteriormente mencionadas. Además, pueden usarse anticuerpos no neutralizadores para capturar el péptido e inmovilizarlo en el soporte sólido.

- Se describe el uso de ensayos de exploración de fármacos competitiva en los que compiten anticuerpos neutralizadores capaces de unirse a los polipéptidos específicamente con un compuesto de ensayo con respecto a unión con los polipéptidos o fragmentos de los mismos. De este modo, los anticuerpos se usan para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más epitopos antigénicos con el polipéptido.

- De este modo, los polipéptidos pueden usarse para identificar compuestos que modulan la actividad del receptor. Tanto la proteína receptora como variantes y fragmentos apropiados pueden usarse en exploraciones de alto rendimiento para ensayar compuestos candidatos con respecto a la capacidad de unión al receptor. Estos compuestos pueden explorarse adicionalmente frente a un receptor funcional para determinar el efecto del compuesto en la actividad del receptor. Pueden identificarse compuestos que activan (agonistas) o inactivan (antagonistas) el receptor con un grado deseado.

- Los términos "agonista" y "antagonista" representan compuestos que potencian o disminuyen una respuesta. Como una forma de un agonista, el compuesto se une al mismo sitio que el compuesto endógeno y produce el mismo tipo de señal, habitualmente de magnitud igual o mayor que el agente endógeno. Otra forma de agonista se une a un sitio diferente que el primer agonista, no produciendo señal por sí mismo, sin embargo, se genera una señal potenciada cuando el agente endógeno también se une en su sitio. Esto se llama una acción alostérica. Una forma de antagonista se une al sitio usado por el agente endógeno y disminuye o bloquea la señal generada por el agente endógeno. Otra forma de antagonista se une a un sitio alostérico, de forma similar a la segunda forma de agonista, pero produce una señal disminuida generada por el agente endógeno. Una tercera forma de antagonista se disuelve en la membrana o cruza la membrana e intercepta la señal generada por el agente endógeno dentro de la membrana o en el lado intracelular. Un antagonista, en consecuencia, abarca agonistas negativos o "agonistas inversos", que tienen una actividad intrínseca negativa que reduce la actividad de señal del receptor en relación con la actividad de señalización medida en ausencia del agonista inverso. Dicho antagonista se distingue de un

antagonista que no tiene actividad intrínseca ni efecto en la actividad basal del receptor. De este modo, por ejemplo, un agonista inverso podría alterar la confirmación del receptor, reduciendo o eliminando de este modo la interacción con un ligando. Véase, Milligan *et al.*, TIPS 16: 10 (1995).

Los polipéptidos receptores pueden usarse para explorar un compuesto con respecto a la capacidad para estimular o inhibir la interacción entre la proteína receptora y una molécula diana que normalmente interacciona con la proteína receptora. La diana puede ser ligando o un componente de la ruta de señalización con la que interacciona normalmente la proteína receptora (por ejemplo, una proteína G u otro agente de interacción implicado en renovación de AMPc o fosfatidil inositol y/o adenilato ciclasa o activación de fosfolipasa C). El ensayo incluye las etapas de combinar la proteína receptora con un compuesto candidato en condiciones que permiten a la proteína receptora o fragmento interaccionar con la molécula diana y detectar la formación de un complejo entre la proteína y la diana o detectar la consecuencia bioquímica de la interacción con la proteína receptora y la diana, de modo que cualquiera de los efectos asociados de la transducción de señal, tales como flujo de iones, fosforilación de proteína G, renovación de fosfatidil inositol o AMP cíclico y activación de fosfolipasa C o adenilato ciclasa.

Los polipéptidos del receptor son útiles en ensayos basados en células cuando se sobreexpresan en una célula. En consecuencia, tales células que sobreexpresan el receptor son útiles para identificar compuestos que son capaces de modular o compensar la sobreexpresión. Las células que sobreexpresan el receptor pueden derivar de fuentes naturales o pueden crearse por métodos recombinantes rutinarios.

Los polipéptidos del receptor también son útiles para explorar compuestos en un ensayo basado en células cuando se activan de forma constitutiva en una célula. Tales células que expresan receptores activados de forma constitutiva son útiles para explorar compuestos que modulan la activación del receptor. Tales células pueden derivar de fuentes naturales o pueden crearse por medios recombinantes que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, véase Scheer *et al.*, J. Receptor Signal Transduction Res. 17: 57-73 (1997); Patente de Estados Unidos Nº 5.750.353.

Los compuestos candidatos incluyen, por ejemplo, (1) péptidos tales como péptidos solubles, incluyendo péptidos de fusión con cola de Ig y miembros de bibliotecas peptídicas aleatorias (véase, por ejemplo Lam *et al.*, Nature 354: 82-84 (1991); Houghten *et al.*, Nature 354: 84-86 (1991)) y bibliotecas moleculares derivadas de química combinatoria hechas de aminoácidos de configuración D y/o L; (2) fosfopéptidos (por ejemplo, miembros de bibliotecas de fosfopéptidos dirigidas aleatorias y parcialmente degeneradas, véase, por ejemplo, Songyang *et al.*, Cell 72: 767-778 (1993)); (3) anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, anti-idiotípicos, quiméricos, intracuerpos y de cadena sencilla, así como Fab, F(ab)<sub>2</sub>, fragmentos de biblioteca de expresión de Fab y fragmentos de unión a epítomos de los anticuerpos); y (4) moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas (por ejemplo, moléculas obtenidas de bibliotecas de producto combinatorio y natural).

Un compuesto candidato es un receptor soluble de longitud completa o fragmento que compite por unión a ligando. Otros compuestos candidatos incluyen receptores mutantes o fragmentos apropiados que contienen mutaciones que afectan a la función del receptor y compiten de este modo por el ligando. En consecuencia, un fragmento que compite por el ligando, por ejemplo con una mayor afinidad, o un fragmento que se une a ligando pero no permite la liberación, están abarcados por la invención.

Se describen otros criterios de valoración para identificar compuestos que modulan (estimulan o inhiben) la actividad del receptor. Los ensayos típicamente implican un ensayo de acontecimientos en la ruta de transducción de señales que indican actividad del receptor. De este modo, puede ensayarse la expresión de genes que se regulan positiva o negativamente en respuesta a la cascada de señales dependientes de proteína del receptor. La región reguladora de tales genes puede unirse operativamente a un marcador que es fácilmente detectable, tal como luciferasa. Como alternativa, la fosforilación de la proteína del receptor o una diana de la proteína del receptor, también podría medirse.

También se entiende que un trastorno causado por niveles aberrantes o mutaciones en la proteína pueden usarse como una base para un criterio de valoración. En consecuencia, las desviaciones específicas en el desarrollo o transcurso del trastorno en respuesta a un compuesto que actúa sobre el receptor puede servir como un criterio de valoración. Cualquiera de las funciones biológicas o bioquímicas mediadas por el receptor pueden usarse como un ensayo de puntos finales. Estos incluyen todos los acontecimientos bioquímicos o bioquímicos/biológicos descritos en la presente memoria, en las referencias citadas en la presente memoria, con respecto a estas dianas de ensayos de puntos finales y otras funciones conocidas para los expertos habituales en la materia.

También pueden explorarse compuestos de unión y/o activación mediante el uso de proteínas de receptor quiméricas en las que el dominio extracelular aminoterminal, o partes del mismo, el dominio transmembrana completo o subregiones, tales como cualquiera de los siete segmentos transmembrana o cualquiera de los bucles intracelulares o extracelulares y el dominio intracelular carboxi terminal; o partes de los mismos, pueden reemplazarse con dominios o subregiones heterólogos. Por ejemplo, puede usarse una región de unión a proteína G que interacciona con una proteína G diferente que la que se reconoce por el receptor nativo. En consecuencia, un conjunto diferente de componentes de transducción de señal está disponible como un ensayo de puntos finales para activación. Como alternativa, la parte transmembrana completa o subregiones (tales como segmentos transmembrana o bucles extracelulares o intracelulares) pueden reemplazarse con la parte transmembrana completa o

subregiones específicas de una células hospedadora que es diferente de la célula hospedadora de la que derivan el domino extracelular amino terminal y/o la región de unión a proteína G. Esto permite que se realicen ensayos en células distintas de la hospedadora específica de la que deriva el receptor. Como alternativa, el dominio extracelular amino terminal (y/u otras regiones de unión a ligando) podrían reemplazarse mediante un dominio (y/u otra región de unión) que se une a un ligando diferente, proporcionando, de este modo, un ensayo para compuestos de ensayo que interaccionan con el dominio extracelular amino terminal heterólogo (o región) pero aún causan transducción de señal. Finalmente, puede detectarse activación mediante un gen informador que contiene una región codificante fácilmente detectable unida operativamente a una secuencia reguladora transcripcional que es parte de la ruta de transducción de señales nativa.

Los polipéptidos del receptor también son útiles en ensayos de unión de competición en métodos diseñados para descubrir compuestos que interaccionan con el receptor. De este modo, un compuesto se expone a un polipéptido del receptor en condiciones que permiten que el compuesto se una o interaccione de otro modo con el polipéptido. También se añade polipéptido del receptor soluble a la mezcla. Si el compuesto de ensayo interacciona con el polipéptido del receptor soluble, disminuye la cantidad de complejo formado o actividad de la diana receptora. Este tipo de ensayo es particularmente útil en casos en los que se buscan compuestos que interaccionan con regiones específicas del receptor. De este modo, el polipéptido soluble que compite con la región del receptor diana se diseña para contener secuencias peptídicas que corresponden a la región diana.

Para realizar ensayos de exploración de fármacos sin células, es deseable inmovilizar la proteína receptora, o fragmento, o su molécula diana para facilitar la separación de complejos de formas no en complejo de una o ambas proteínas, así como para facilitar la automatización del ensayo.

Pueden usarse técnicas para inmovilizar proteínas G en matrices en los ensayos de exploración de fármacos. Puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite que la proteína se una a una matriz. Por ejemplo, pueden adsorberse proteínas de fusión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)/glutación-S-transferasa en perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) para placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que se combinan después con los lisados celulares (por ejemplo, marcados con <sup>35</sup>S) y el compuesto candidato y la mezcla incubada en condiciones que conducen a la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las perlas se lavan para retirar cualquier marcador no unido y se inmoviliza la matriz y se determina el radiomarcador directamente o en el sobrenadante después de que se disocian los complejos. Como alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz, separarse por SDS-PAGE y cuantificarse el nivel de proteína unida a receptor hallado en la fracción de perla a partir del gel usando técnicas electroforéticas convencionales. Por ejemplo, el polipéptido o su molécula diana pueden inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y estreptavidina usando técnicas bien conocidas en la materia. Como alternativa, pueden derivatizarse anticuerpos reactivos con la proteína pero que no interfieren con la unión de la proteína a su molécula diana en los pocillos de la placa y atraparse la proteína en los pocillos por conjugación de anticuerpos. Las preparaciones de una proteína de unión a receptor y un compuesto candidato se incuban en los pocillos presentadores de proteína del receptor y puede cuantificarse la cantidad de complejo atrapado en el pocillo. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con la molécula diana de proteína receptora o que son reactivos con la proteína receptora y compiten con la molécula diana; así como ensayos ligados a enzima que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con la molécula diana.

Pueden usarse moduladores de la actividad de la proteína del receptor identificada de acuerdo con estos ensayos de exploración de fármacos para tratar a un sujeto con un trastorno mediado por la ruta del receptor, tratando las células que expresan la proteína del receptor. Estos métodos de tratamiento incluyen las etapas de administrar los moduladores de actividad de la proteína en una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria, a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

### **Antisentido y Ribozima (Antagonistas)**

Los antagonistas pueden ser ácidos nucleicos que corresponden a las secuencias contenidas en SEC ID N°: 1 o la hebra complementaria de la misma, y/o a secuencias de nucleótidos contenidas en el clon depositado 97183. La secuencia antisentido puede generarse de forma interna, por el organismo, la secuencia antisentido puede administrarse de forma separada (véase, por ejemplo, O'Connor, J., *Neurochem.* 56: 560 (1991). Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Puede usarse tecnología antisentido para controlar la expresión génica a través de ADN o ARN antisentido o a través de la formación de triple hélice. Las técnicas antisentido se analizan, por ejemplo, en Okano, J., *Neurochem.* 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). La formación de triples hélices se analiza en, por ejemplo, Lee *et al.*, *Nucleic Acids Research* 6: 3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science* 241:456 (1988); y Dervan *et al.*, *Science* 251: 1300 (1991). Los métodos se basan en la unión de un polinucleótido con un ADN o ARN complementario.

Por ejemplo, el uso de construcciones de ARN antisentido c-myc y c-myb para inhibir el crecimiento de la línea celular de leucemia no linfocítica HL-60 y otras líneas celulares se ha descrito previamente (Wickstrom *et al.* (1988); Anfossi *et al.* (1989). Estos experimentos se realizaron *in vitro* mediante la incubación de células con el

oligorribonucleótido. Un procedimiento similar para uso *in vivo* se describe en el documento WO 91/15580. Brevemente, se produce un par de oligonucleótidos para un ARN antisentido dado como sigue: Una secuencia complementaria a las 15 primeras bases de la fase abierta de lectura está flanqueada por un sitio de EcoRI en el extremo 5' y un sitio HindIII en el extremo 3'. A continuación, el par de oligonucleótidos se calienta a 90°C durante un minuto y después se hibrida en tampón de ligación 2X (TRIS HCl 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 10 mM (DTT) y ATP 0,2 mM) y después se ligan con el sitio EcoRI/Hind del vector retroviral PMV7 (documento WO 91/15580).

Por ejemplo, la parte codificante 5' de un polinucleótido que codifica el polipéptido maduro puede usarse para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para ser complementario con una región del gen implicado en la transcripción previniendo de este modo la transcripción y la producción del receptor. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm al polipéptido del receptor.

El ácido nucleico antisentido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se produce intracelularmente por transcripción a partir de una secuencia exógena. Por ejemplo, un vector o una parte del mismo puede transcribirse, produciendo un ácido nucleico antisentido (ARN). Un vector tal contendría una secuencia que codifica el ácido nucleico antisentido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Un vector tal podría seguir siendo episomal o integrarse cromosómicamente siempre que pueda transcribirse para producir el ARN antisentido deseado. Tales vectores pueden construirse por métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales en la técnica. Los vectores pueden ser plasmídicos, virales u otros conocidos en la técnica, usados para replicación y expresión en células de vertebrados. La expresión de la secuencia que codifica el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o fragmentos del mismo, puede ser por cualquier promotor conocido en la técnica que actúa en vertebrados, preferiblemente células humanas. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen, pero sin limitación, la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 29: 304-310 (1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, Cell 22: 787-797 (1980), el promotor de la timidina de herpes (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445 (1981), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster, *et al.*, Nature 296: 39-42 (1982)), etc.

Los ácidos nucleicos antisentido comprenden una secuencia complementaria al menos a una parte de un transcrito de ARN de un gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, la complementariedad absoluta, aunque se prefiere, no es necesaria. Una secuencia "complementaria al menos a una parte de un ARN", referida en la presente memoria, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para ser capaz de hibridar con el ARN, formando una doble cadena estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) bicatenarios, una cadena sencilla del ADN de doble cadena puede ensayarse de este modo o puede ensayarse la formación de triple cadena. La capacidad de hibridar dependerá del grado de complementariedad y la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto mayor sea el ácido nucleico que hibrida, más emparejamientos erróneos con un ARN del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede contener y formar aún una doble cadena estable (o triple según sea el caso). Un experto en la materia puede establecer un grado tolerable de emparejamiento erróneo mediante el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del mensaje, por ejemplo, la secuencia no traducida 5' hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar de forma más eficaz en la inhibición de la traducción. Sin embargo, las secuencias complementarias a las secuencias no traducidas 3' de los ARNm se ha mostrado que son eficaces en la inhibición de la traducción de ARNm también. Véase generalmente, Wagner, R., 1994, Nature 372: 333-335. De este modo, los oligonucleótidos complementarios a las regiones no codificantes no traducidas 5' ó 3' del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mostradas en las Figuras 1A-B o dentro de la región codificante del clon depositado pudieron usarse en un enfoque antisentido para inhibir la traducción de ARNm del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los oligonucleótidos complementarios a la región no traducida 5' del ARNm deberían incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos antisentido complementarios a las regiones codificantes de ARNm son inhibidores menos eficaces de la traducción pero podrían usarse. Si se diseñan para hibridar con la región 5', 3' o codificante de ARNm del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o dentro de la región codificante del clon depositado, los ácidos nucleicos antisentido deberían ser al menos de 6 nucleótidos de longitud y son preferiblemente oligonucleótidos que varían de 6 a 50 nucleótidos en longitud. En aspectos específicos el oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

Los polinucleótidos de la invención pueden ser ADN o ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, bicatenarios o monocatenarios. El oligonucleótido puede modificarse en el resto base, resto azúcar o cadena principal de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos añadidos tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirse a receptores de las células hospedadoras *in vivo*) o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556; Lemaitre *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652; Publicación de PCT N° WO88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación de PCT N° WO89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión desencadenada por hibridación (Véase, por ejemplo, Krol *et al.*, 1988, BioTechniques 6: 958-

976) o agentes intercalantes. (Véase, por ejemplo, Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549). Con este objetivo, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de entrecruzamiento desencadenado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión desencadenada por hibridación, etc.

5 El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto de base modificado que se selecciona del grupo que incluye, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxoacético, ácido uracil-5-oxiacético (v); 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3) w y 2,6-diaminopurina.

15 El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un resto azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos una cadena principal de fosfato modificada seleccionada del grupo que incluye, pero sin limitación, un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforoamidotioato, un fosforoamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo y un formacetal o análogo del mismo.

20 El oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido a-anomérico. Un oligonucleótido a-anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que, a diferencia de las unidades b habituales, las cadenas se disponen paralelas entre sí (Gautier *et al.*, 1987, Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641). El oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue *et al.*, 1987, Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148), o un análogo de ADN-ARN quimérico (Inoue *et al.*, 1987, FEBS Lett. 215: 327-330).

25 Los polinucleótidos pueden sintetizarse por métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como los que están disponibles en el mercado de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, los oligonucleótidos de fosforotioato pueden sintetizarse por el método de Stein *et al.* (1988, Nucl. Acids Res. 16: 3209), pueden prepararse oligonucleótidos de metilfosfonato mediante el uso de soportes de polímero de vidrio de poro controlado (Sarin *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7448-7451), etc.

Aunque podrían usarse nucleótidos antisentido complementarios a la secuencia de región codificante del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), se prefieren más los complementarios a la región no traducida transcrita.

35 Los antagonistas potenciales también incluyen ARN catalítico o una ribozima (Véase, por ejemplo, Publicación Internacional de PCT WO 90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver *et al.*, Science 247: 1222-1225 (1990)). Aunque pueden usarse ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específico de sitio para destruir ARNm del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden ARNm en localizaciones marcadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cadena de martillo se conoce bien en la técnica y se describe de forma más completa en Haseloff y Gerlach, Nature 334: 585-591 (1988). Existen numerosos sitios de escisión de ribozimas de cabeza de martillo potenciales dentro de la secuencia de nucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (Figuras 1A-B o la secuencia del clon depositado). Preferiblemente, la ribozima se desarrolla por ingeniería genética de modo que el sitio de reconocimiento de escisión esté localizado cerca del extremo 5' del ARNm del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5); es decir, para 45 aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales.

Como en el enfoque antisentido, las ribozimas pueden componerse de oligonucleótidos modificados (por ejemplo para mejorar la estabilidad, la dirección, etc.) y deberían suministrarse a células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) *in vivo*. Pueden introducirse construcciones de ADN que codifican la ribozima en la célula del mismo modo que se ha descrito anteriormente para la introducción de ADN codificante antisentido. Un 50 método preferido de suministro implica usar una construcción de ADN "que codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, tal como, por ejemplo, promotor pol III o pol II, de modo que las células transfectadas producirán suficientes cantidades de la ribozima para destruir los mensajes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, a diferencia de las moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para su eficacia.

55 Los compuestos antagonistas/agonistas pueden emplearse para inhibir los efectos de proliferación y crecimiento celular de los polipéptidos en células y tejidos neoplásicos, es decir estimulación de angiogénesis de tumores y, por lo tanto, retardo o prevención del crecimiento y proliferación celular anómalo, por ejemplo, en formación o crecimiento de tumores.

El antagonista/agonista puede emplearse también para prevenir enfermedades hipervasculares y prevenir la proliferación de células epiteliales del cristalino después de cirugía de cataratas extracapsular. La prevención de la actividad mitogénica de los polipéptidos también puede ser deseable en casos tales como reestenosis después de angioplastia de globo.

- 5 El antagonista/agonista también puede emplearse para prevenir el crecimiento de tejido de cicatriz durante la curación de heridas.

El antagonista/agonista también puede emplearse para tratar las enfermedades descritas en la presente memoria.

- 10 De este modo se describe un método para tratar o prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones, incluyendo pero sin limitación las enfermedades, trastornos y/o afecciones enumeradas a lo largo de esta aplicación, asociadas con la sobreexpresión de un polinucleótido de CCR5 mediante la administración a un paciente de (a) una molécula antisentido dirigida al polinucleótido y/o (b) una ribozima dirigida al polinucleótido.

### **Uso de Fragmentos Transmembrana como Antagonistas/Inhibidores**

- 15 Se describe la modulación, especialmente la inhibición, de actividades biológicas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mediante su exposición a moléculas que interfieren con el correcto ensamblaje del receptor. En particular, se describen fragmentos aislados o péptidos del dominio transmembrana del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que inhiben la transducción de señal mediada por Receptor de Quimiocina de proteína G o unión a ligando. Pueden añadirse restos cargados en un extremo Terminal del fragmento para promover la orientación correcta del fragmento en la membrana.

- 20 Se ha demostrado que los segmentos de dominio transmembrana (TM) del receptor acoplado a proteína G (GPCR) interaccionan de una manera específica durante el ensamblaje de moléculas receptoras. Estas interacciones no conducen a una estructura rígida debido a que se requiere cierta flexibilidad para cambios conformacionales después de la unión del ligando, lo que permite a la molécula señalar desde la superficie celular a las partes intracelulares. También se demostró para varios GPCR que el dominio transmembrana está implicado en la unión a ligando y por lo tanto contiene aberturas que permiten la penetración de los ligandos. Los informes de que la expresión de dominios transmembrana ausentes rescata vasopresina V2 truncada inactiva, receptores M3 muscarínicos y beta adrenérgicos (Schoneberg *et al.* EMBO J. 15: 1283 (1996); Wong *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 6219 (1990); Monnot *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 1507 (1996); Gudermann *et al.*, Annu. Rev. Neurosci. 20: 399 (1997); Osuga *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 25006 (1997)) sugirieron que un péptido derivado del sexto dominio transmembrana del receptor P2-adrenérgico inhibe la activación y dimerización del receptor (Hebert *et al.*, J. Biol. Chem., 271(27): 16384-92 (1996)). De este modo, la función de GPCR puede rescatarse dirigiéndose a interacciones intramembrana de GPCR.

- 35 Adicionalmente, la función de GPCR puede inhibirse dirigiéndose a interacciones intramembrana. Por ejemplo, los fragmentos correspondientes a segmentos TM predichos de CCR5, que funcionan como un correceptor durante la entrada de VIH en células, produjeron una inhibición potente de la entrada de VIH sin aparente toxicidad para las células (Véase el documento WO 99/43711). La utilidad del método también se demostró mediante el marcaje específico de CXCR4, que funciona como un correceptor durante la entrada en células de cepas trópicas para linfocitos T de VIH-1. Fragmentos que contenían 20-25 restos aminoácidos inhibieron la señalización del receptor e infección por VIH-1 *in vitro* a una concentración tan baja como 0,2 micromolar (Véase documento WO 99/43711).

- 40 La naturaleza hidrófoba y/o anfipática de los fragmentos transmembrana permite su penetración en la bicapa. Además, la orientación dentro de la membrana puede controlarse mediante la adición de restos cargados en el extremo que se expone en el lado extracelular de la membrana en el receptor intacto. La inserción en la membrana se ensaya mediante microscopia de fluorescencia de análogos peptídicos marcados usando metodología conocida para los expertos en la materia y como se describe en el documento WO 99/43711.

- 45 Se describen fragmentos transmembrana que modulan y preferiblemente inhiben las propiedades biológicas y actividades del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mediante la dirección a dominios transmembrana de este receptor.

También se describen métodos para alterar la función del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mediante el uso de estos antagonistas.

- 50 Puede usarse tecnología de ADN recombinante o química para obtener fragmentos transmembrana del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), que preferiblemente son tan pequeños como sea posible manteniendo aún una afinidad suficientemente alta para la unión con, o asociación con, Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los ejemplos no limitantes de polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluyen fragmentos de 10 a 50 aminoácidos correspondientes al menos a un segmento transmembrana de los segmentos 1-7.

- 55 Se describe una molécula moduladora del Receptor de Quimiocina de proteína G aislada que comprende un fragmento, un péptido o peptidomimético que es un análogo estructural de una parte de un segmento transmembrana del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), teniendo dicha molécula un extremo extracelular



y un extremo intracelular y teniendo dicha molécula en dicho extremo extracelular un grupo cargado negativamente y en dicho extremo intracelular una carga neutra en condiciones fisiológicas; dicha molécula se inserta espontáneamente en una membrana en la misma orientación que el dominio transmembrana del que deriva; y dicha molécula modula una actividad o propiedad biológica de dicho Receptor de Quimiocina de proteína G.

- 5 Las moléculas pueden contener un grupo de cabeza no peptídico hidrófilo cargado negativamente y una cola no cargada, que asegura la orientación correcta de la molécula en la membrana celular. El grupo de cabeza cargado negativamente puede ser uno o más aminoácidos ácidos.

10 La actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) modulada por dicho fragmento incluye inhibición de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediada por Receptor de Quimiocina de proteína G e inhibición de infección por VIH mediada por Receptor de Quimiocina de proteína G. La actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) modulada por dicho péptido también incluye la unión de un ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Las actividades adicionales del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) moduladas por dicho péptido incluyen las de la Descripción y Ejemplos de la presente memoria.

15 Se describen métodos para modular la actividad biológica de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) poniendo en contacto una célula que expresa el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con una molécula de la invención. En un método, la actividad biológica modulada es inhibición de infección de VIH mediada por Receptor de Quimiocina de proteína G. En otro método, la actividad biológica modulada es inhibición de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediada por Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Otras actividades moduladas incluyen las descritas en otra parte en la presente memoria.

20 Se describe un método para inhibir infección por VIH-1, que comprende poner en contacto una célula que expresa el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que se une a VIH-1 con una molécula que comprende un fragmento polipeptídico, un péptido o peptidomimético que es un análogo estructural de una parte del dominio transmembrana de dicho Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), en el que el contacto de la célula con dicha molécula inhibe la infección por VIH-1. El péptido o peptidomimético puede ser un análogo estructural de una parte de un dominio transmembrana del Receptor de Quimiocina de proteína G.

25 La molécula imita un segmento transmembrana del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y bloquea el autoensamblaje del receptor, posiblemente por inhibición competitiva con el segmento TM nativo. Estas por lo tanto bloquean o inhiben la transducción de señal en la célula afectada.

30 También se describen análogos peptídicos y peptidomiméticos que poseen propiedades beneficiosas tales como semivida aumentada, falta de inmunogenicidad y la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica.

35 Los análogos peptídicos median los efectos químicos y/o biológicos de agonistas/antagonistas de hormonas u otros péptidos. Son útiles para el desarrollo de técnicas farmacéuticas, terapéuticas y de diagnóstico. En consecuencia, se describen métodos para producir una respuesta terapéutica o profiláctica en un mamífero mediante la administración al mamífero de una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más análogos peptídicos. Se describen métodos para producir tales respuestas mediante la modulación de la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mediante la administración de una cantidad eficaz de uno o más análogos peptídicos.

Puede administrarse más de un péptido como un cóctel para modular la actividad biológica del Receptor de Quimiocina de proteína G.

40 La expresión "péptido transmembrana del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)" puede incluir un fragmento del dominio transmembrana, un segmento transmembrana, un fragmento de un segmento transmembrana y/o un péptido homólogo de los mismos. Los fragmentos preferidos incluyen los de al menos 4-50 y preferiblemente al menos 4-30 y preferiblemente al menos 10-30 aminoácidos de longitud o cualquier intervalo de los mismos. Los fragmentos preferidos adicionalmente incluyen los de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 aminoácidos de longitud. También se incluye cualquier secuencia correspondiente que tenga sustituciones de aminoácidos conservativas.

45 Los fragmentos transmembrana de la muestra incluyen, pero sin limitación, cualquier fragmento descrito en la presente memoria. Un fragmento transmembrana preferido, cuando se pone en contacto con una célula o estructura de membrana (por ejemplo, liposoma) que contiene Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) biológicamente activo, modula la actividad biológica de dicho Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) *in vitro*, *in vivo*, o *in situ*. La concentración del fragmento en una solución que pone en contacto la célula *in vivo* (por ejemplo plasma sanguíneo o fluido intersticial) o *in vitro* (por ejemplo medio de cultivo) está entre 1 nanomolar y 50 micromolar, preferiblemente entre 1 nanomolar y 1 micromolar y más preferiblemente menos de 5 micromolar.

55 "Cargado negativamente" se refiere a los aminoácidos, derivados de aminoácidos, miméticos de aminoácidos y restos químicos que están cargados negativamente a pH fisiológico. Los aminoácidos cargados negativamente incluyen, por ejemplo, Asp y Glu. Un resto "ácido" es un resto que está cargado negativamente a pH fisiológico.

“Cargado positivamente” se refiere a los aminoácidos, derivados de aminoácidos, miméticos de aminoácidos y restos químicos que están cargados positivamente a pH fisiológico. Los aminoácidos cargados positivamente incluyen, por ejemplo, Lys y Arg. Un “resto básico” es un resto que está cargado positivamente a pH fisiológico.

5 “Neutro” se refiere a los aminoácidos, derivados de aminoácidos, miméticos de aminoácidos y restos químicos que no están cargados ni positiva ni negativamente a pH fisiológico.

La expresión “modula una actividad o propiedad biológica” significa que en presencia de un fragmento transmembrana de ensayo un parámetro biológico o acontecimiento medible aumenta o disminuye en relación con un control en ausencia de dicho péptido. Los ejemplos de actividades o propiedades biológicas incluyen: conformación del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), asociación del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con otras moléculas, transducción de señal, secreción extracelular de proteínas celulares, cambios conformacionales en proteínas, cambios en actividad enzimática, cambios en la actividad metabólica, cambios en la afinidad por un ligando, cambios en los niveles de infección viral, cambios en vasodilatación, modulación de frecuencia cardíaca, modulación de la broncodilatación, modulación de las secreciones endocrinas y modulación de los movimientos peristálticos del intestino. Obsérvese que la actividad biológica del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede no ser una que se limite al papel *in vivo* preciso realizado por el Receptor de Quimiocina de proteína G. La expresión también abarca propiedades del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) tales como unión a proteína viral, que no son parte del papel biológico *in vivo* del Receptor de Quimiocina de proteína G. Adicionalmente abarca propiedades intrínsecas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que sólo se describen por manipulación experimental en el laboratorio, tal como la capacidad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en bicapas artificiales (por ejemplo liposomas) para interaccionar con ligandos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

“Transducción de señal” es el proceso por el que la unión de un ligando con un receptor se traduce en cambio fisiológico. En general, la unión de un ligando con un receptor causa un cambio en una propiedad física del receptor, por ejemplo un cambio en su conformación o su orientación o en su capacidad para unirse a otros ligandos. Este cambio en una propiedad fisiológica puede dar como resultado, directa o indirectamente, un aumento o disminución de los flujos iónicos, aumento o disminución de la actividad enzimática, aumento o disminución de la fosforilación, aumento o disminución de la traslocación del receptor o de cualquier molécula (por ejemplo un resto de inositol o una subunidad de proteína G) de un compartimento celular a otro.

“Ligandos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)” se refiere a moléculas biológicas que se unen al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) *in vitro*, *in situ*, o *in vivo* y pueden incluir hormonas, neurotransmisores, virus o dominios de unión a receptor de los mismos, proteínas G, opsinas, rodopsinas, nucleósidos, nucleótidos, factores de cascada de coagulación, odorizantes o feromonas, toxinas, factores estimulantes de colonias, factores activadores de plaquetas, péptidos neuroactivos, neurohumor o cualquier compuesto biológicamente activo, tal como fármacos o compuestos de origen natural o sintético.

35 La frase “inhibe infección por VIH” significa que un péptido descrito en la presente memoria inhibe la unión de un VIH con un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o inhibe la actividad biológica de un Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que media la entrada y reproducción exitosa de un virus VIH en una célula que expresa Receptor de Quimiocina de proteína G.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o ácidos nucleicos que los codifican, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos de sustitución o polinucleótidos que pueden obtenerse de forma rutinaria por un experto en la materia, sin experimentación indebida, basándose en la enseñanzas y directrices presentadas en la presente memoria. Para una descripción detallada de estructura y química de proteínas, véase Schulz *et al.*, PRINCIPLES OF PROTEIN STRUCTURE, Springer-Verlag, Nueva York, 1978, y Creighton, T. E., PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983. Para una presentación de sustituciones de secuencia de nucleótidos, tal como preferencias codónicas, véase Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente, en las secciones A.1.1-A.1.24, y Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, en los Apéndices C y D.

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluyen secuencias homólogas y/o fragmentos del dominio transmembrana, en particular, al menos uno de los segmentos transmembrana 1-7 del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) u homólogos de los mismos.

Sin embargo, se prefieren polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de al menos 15-20 aminoácidos de modo que los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) sean capaces de abarcar la bicapa lipídica.

55 Particularmente se prefiere que los péptidos se seleccionen o modifiquen de modo que un extremo está cargado y el otro es neutro en condiciones fisiológicas. Esto es para que el péptido se inserte de forma espontánea en una membrana. Es de particular importancia que el péptido se inserte en la misma orientación que el dominio transmembrana del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) del que deriva.

Los péptidos pueden derivar de cualquiera de los 7 segmentos TM. Las posiciones de aminoácidos de los

segmentos TM pueden determinarse usando modelización molecular, combinado opcionalmente con análisis de hidrofobicidad (véase Tabla 1) y/o ajustando a hélices modelo, como ejemplos no limitantes. Tal modelización puede conseguirse de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, ECEPP, INSIGHT, DISCOVER, CHEM-DRAW, AMBER, FRODO y CHEM-X. Tales algoritmos comparan dominios transmembrana y segmentos entre GPCR relacionados, determinan las estructuras de energía minimizada probables y definen secuencias transmembrana alternativas.

Los fragmentos del dominio transmembrana del Receptor de Quimiocina acoplado a proteína G que son útiles como antagonistas comprenden, o como alternativa consisten en, las siguientes partes de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado:

- 10 Segmento 1: aminoácidos 31-58, 32-58, 33-58, 34-58, 35-58, 36-58, 37-58, 38-58, 31-57, 32-57, 33-57, 34-57, 35-57, 36-57, 37-57, 31-56, 32-56, 33-56, 34-56, 35-56, 36-56, 31-55, 32-55, 33-55, 34-55, 35-55, 31-54, 32-54, 33-54, 34-54, 31-53, 32-53, 33-53, 31-52, 32-52, 31-51 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado, o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente de al menos 15 aminoácidos de longitud;
- 15 Segmento 2: aminoácidos 68-97, 69-97, 70-97, 71-97, 72-97, 73-97, 74-97, 75-97, 76-97, 68-96, 69-96, 70-96, 71-96, 72-96, 73-96, 74-96, 75-96, 76-96, 68-95, 69-95, 70-95, 71-95, 72-95, 73-95, 74-95, 75-95, 68-94, 69-94, 70-94, 71-94, 72-94, 73-94, 74-94, 68-93, 69-93, 70-93, 71-93, 72-93, 73-93, 68-92, 69-92, 70-92, 71-92, 72-92, 68-91, 69-91, 70-91, 71-91, 68-90, 69-90, 70-90, 68-89, 69-89, 68-88 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado, o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente de al menos 15 aminoácidos de longitud;
- 20 Segmento 3: aminoácidos 103-124, 104-124, 105-124, 106-124, 107-124, 108-124, 109-124, 103-123, 103-122, 103-121, 103-120, 103-119, 103-118 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado, o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente de al menos 15 aminoácidos de longitud;
- 25 Segmento 4: aminoácidos 142-169, 143-169, 144-169, 145-169, 146-169, 147-169, 148-169, 149-169, 142-168, 143-168, 144-168, 145-168, 146-168, 147-168, 148-168, 142-167, 143-167, 144-167, 145-167, 146-167, 147-167, 142-166, 143-166, 144-166, 145-166, 146-166, 142-165, 143-165, 144-165, 145-165, 142-164, 143-164, 144-164, 142-163, 143-163, 142-163 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado, o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente de al menos 15 aminoácidos de longitud;
- 30 Segmento 5: aminoácidos 196-223, 197-223, 198-223, 199-223, 200-223, 201-223, 202-223, 203-223, 196-222, 197-222, 198-222, 199-222, 200-222, 201-222, 202-222, 196-221, 197-221, 198-221, 199-221, 200-221, 201-221, 196-220, 197-220, 198-220, 199-220, 200-220, 196-219, 197-219, 198-219, 199-219, 196-218, 197-218, 198-218, 196-217, 197-217, 196-216 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado, o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente de al menos 15 aminoácidos de longitud,
- 35 Segmento 6: aminoácidos 236-260, 237-260, 238-260, 239-260, 240-260, 236-259, 237-259, 238-259, 239-259, 236-258, 237-258, 238-258, 236-257, 237-257, 236-256 de SEC ID NO:2 o del polipéptido codificado por el clon depositado, o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente de al menos 15 aminoácidos de longitud;
- 40 Segmento 7: aminoácidos 275-305, 276-305, 277-305, 278-305, 279-305, 280-305, 281-305, 282-305, 283-305, 284-305, 285-305, 275-304, 276-304, 277-304, 278-304, 279-304, 280-304, 281-304, 282-304, 283-304, 284-304, 275-303, 276-303, 277-303, 278-303, 279-303, 280-303, 281-303, 282-303, 283-303, 275-302, 276-302, 277-302, 278-302, 279-302, 280-302, 281-302, 282-302, 275-301, 276-301, 277-301, 278-301, 279-301, 280-301, 281-301, 275-300, 276-300, 277-300, 278-300, 279-300, 280-300, 275-299, 276-299, 277-299, 278-299, 279-299, 275-298, 276-298, 277-298, 278-298, 275-297, 276-297, 277-297, 275-296, 276-296, 275-295 de SEC ID N°: 2 o del polipéptido codificado por el clon depositado, o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente de al menos 15 aminoácidos de longitud;

- 45 Los fragmentos de CCR5 descritos en el documento WO 99/43711 se excluyen específicamente de la descripción en esta sección.

Los aminoácidos cargados negativamente, tales como Asp o Glu, pueden sustituirse o añadirse al extremo extracelular del fragmento. El número de aminoácidos cargados negativamente es típicamente 1, 2 ó 3. Los aminoácidos neutros pueden sustituirse o añadirse en el extremo intracelular del fragmento. Véase, también, Ejemplo 57.

### **Otras Actividades**

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista como resultado de la capacidad para estimular el crecimiento de células endoteliales vasculares, puede emplearse en el tratamiento para la estimulación de la revascularización de tejidos isquémicos debido a diversas enfermedades tales como trombosis, arterioesclerosis y otras afecciones cardiovasculares. El polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede emplearse para estimular la

angiogénesis y regeneración de extremidades, como se ha analizado anteriormente.

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede emplearse para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de heridas debido a lesiones, quemaduras, reparación de tejido postoperatoria y úlceras debido a que son mitógenos para diversas células de diferentes orígenes, tales como células fibroblásticas y células de músculo esquelético y, por lo tanto, facilitan la reparación o reemplazo de tejido dañado o enfermo.

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede emplearse para estimular crecimiento neuronal y para tratar y prevenir el daño neuronal que se produce en ciertas enfermedades, trastornos y/o afecciones neuronales o afecciones neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y complejo relacionado con el SIDA. Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista puede tener la capacidad de estimular crecimiento de condrocitos, por lo tanto pueden emplearse para potenciar la regeneración ósea y periodontal y ayudar en los trasplantes de tejidos o injertos de hueso.

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede emplearse para prevenir el envejecimiento de la piel debido a quemaduras solares mediante la estimulación del crecimiento de queratinocitos.

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede emplearse para prevenir pérdida de cabello, puesto que los miembros de la familia FGF activan las células formadoras de cabello y promueven el crecimiento de melanocitos. En la misma línea, un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista puede emplearse para estimular el crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas y células de médula ósea cuando se usan en combinación con otras citocinas.

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede emplearse para mantener órganos antes de su trasplante o para soportar cultivos celulares de tejidos primarios. Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede emplearse para inducir que el tejido de origen mesodérmico se diferencie en embriones tempranos.

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede aumentar o disminuir la diferenciación o proliferación de células madre embrionarias, además, como se ha analizado anteriormente, de linaje hematopoyético.

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede usarse para modular características de los mamíferos, tales como altura corporal, peso, color de pelo, color de ojos, piel, porcentaje de tejido adiposo, pigmentación, tamaño y forma (por ejemplo cirugía cosmética). De forma similar, un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede usarse para modular el metabolismo de mamíferos que afecta al catabolismo, anabolismo, procesamiento, utilización y almacenamiento de energía.

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede usarse para cambiar el estado mental de un mamífero o su estado físico influyendo en los biorritmos, ritmos circadianos, depresión (incluyendo enfermedades, trastornos y/o afecciones depresivas), tendencia a la violencia, tolerancia al dolor, capacidades reproductivas (preferiblemente mediante Activina o actividad de tipo Inhibina), niveles hormonales o endocrinos, apetito, libido, memoria, estrés u otras cualidades cognitivas.

Un polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista también puede usarse como un aditivo o conservante alimentario, tal como para aumentar o disminuir las capacidades de almacenamiento, el contenido de grasas, lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, cofactores u otros componentes nutricionales.

Las aplicaciones anteriormente mencionadas tienen usos en una amplia diversidad de hospedadores. Tales hospedadores incluyen, pero sin limitación, seres humanos, murinos, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo, ratón, rata, hámster, cerdo, cerdo miniaturizado, pollo, cabra, vaca, oveja, perro, gato, primate no humano y ser humano. Como hospedador se prefiere un ratón, conejo, cabra, cobaya, pollo, rata, hámster, cerdo, oveja, perro o gato. En realizaciones preferidas, el hospedador es un mamífero. En realizaciones más preferidas, el hospedador es un ser humano.

Habiendo descrito de forma general la invención, la misma se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan como ilustración y no se pretende que sean limitantes.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1**

#### **Expresión Bacteriana y Purificación de HDGNR10**

La secuencia de ADN que codifica HDGNR10, ATCC N° 97183 se amplifica inicialmente usando cebadores oligonucleotídicos de PCR que corresponden a las secuencias del extremo 5' de la proteína HDGNR10 (sin la secuencia de péptido señal) y las secuencias del vector 3' del gen de HDGNR10. Se añadieron nucleótidos adicionales correspondientes a HDGNR10 a las secuencias 5' y 3' respectivamente. El cebador oligonucleotídico 5' tiene la secuencia 5' CGGAATTCCTCCATGGATTATCAAGTGTCA 3' (SEC ID N°: 3) y contiene un sitio de enzima

de restricción EcoRI seguido de 18 nucleótidos de la secuencia codificante de HDG NR10 comenzando por el aminoácido terminal supuesto del codón de la proteína procesada.

La secuencia 3' 5' CGGAAGCTTCGTCACAAGCCCACAGATAT 3' (SEC ID N°: 4) contiene secuencias complementarias a un sitio HindIII y está seguida de 18 nucleótidos de la secuencia codificante de HDG NR10. Los sitios de enzima de restricción corresponden a los sitios de enzima de restricción del vector de expresión bacteriano pQE-9 (Qiagen, Inc. 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311). pQE-9 codifica resistencia a antibióticos (Amp<sup>r</sup>), un origen bacteriano de replicación (ori), un operador promotor regulable por IPTG (P/O), un sitio de unión a ribosoma (RBS), un marcador 6-His y sitios de enzima de restricción. pQE-9 se digirió después con EcoRI y HindIII. Las secuencias amplificadas se ligaron en pQE-9 y se insertaron en fase con la secuencia codificante del marcador de histidina y el RBS. La mezcla de ligación se usó después para transformar la cepa de *E. coli* M15/rep 4 (Qiagen, Inc.) por el procedimiento descrito en Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989). M15/rep4 contiene múltiples copias del plásmido pREP4, que expresa el represor lacI y también confiere resistencia a kanamicina (Kan<sup>r</sup>). Se identificaron los transformantes por su capacidad para crecer en placas LB y se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina/kanamicina. Se aisló ADN plasmídico y se confirmó por análisis de restricción.

Los clones que contienen las construcciones deseadas se cultivaron durante una noche (O/N) en cultivo líquido en medio LB complementado con Amp (100 µg/ml) y Kan (25 µg/ml). El cultivo O/N se usó para inocular un cultivo grande a una relación de 1:100 a 1:250. Las células se cultivaron a una densidad óptica 600 (O.D.<sup>600</sup>) de entre 0,4 y 0,6. Se añadió después IPTG ("Isopropil-B-D-tiogalacto piranosido") a una concentración final de 1 mM. IPTG induce por inactivación del represor lacI, eliminando el P/O lo que conduce a un aumento en la expresión génica. Se cultivaron las células de 3 a 4 horas adicionales. Las células se recolectaron después por centrifugación. El sedimento celular se solubilizó en el agente caotrópico Guanidina HCl 6 Molar. Después de la clarificación, se purificó HDG NR10 de esta solución por cromatografía en una columna de Quelado de Níquel en condiciones que permiten una unión estrecha por proteínas que contienen el marcador 6-His. Hochuli, E. *et al.*, J. Chromatography 411: 177-184 (1984). HDG NR10 se eluyó de la columna en guanidina HCl 6 molar pH 5,0 y con el fin de renaturalizar se ajustó a guanidina HCl 3 molar, fosfato sódico 100 mM, glutatión 10 mmolar (reducido) y glutatión 2 mmolar (oxidado). Después de la incubación en esta solución durante 12 horas la proteína se dializó a fosfato sódico 10 mmolar.

## Ejemplo 2

### Expresión de HDG NR10 Recombinante en células COS

La expresión de HDG NR10 HA plasmídico deriva de un vector pcDNAI/Amp (Invitrogen) que contiene: 1) origen de replicación de SV40, 2) gen de resistencia a ampicilina, 3) origen de replicación de *E. coli*, 4) promotor de CMV seguido de una región de polienlazador, un intrón de SV40 y sitio de poliadenilación. Un fragmento de ADN que codifica el precursor de HDG NR10 completo y un marcador HA fusionado en fase con su extremo 3' se clonó en la región polienlazadora del vector, por lo tanto, la expresión de la proteína recombinante se dirige bajo el promotor de CMV. El marcador HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe como se ha descrito previamente (I. Wilson, *et al.*, Cell 37: 767 (1984)). La infusión de marcador HA a la proteína diana permite una detección fácil de la proteína recombinante con un anticuerpo que reconoce en epítipo HA.

La estrategia de construcción de plásmido se describe como sigue:

La secuencia de ADN codificante de HDG NR10, ATCC N° 97183, se construyó por PCR usando dos cebadores:

el cebador 5' 5' GTCCAAGCTTGCCACCATGGATTATCA AGTGTCA 3' (SEC ID N°: 5) contiene un sitio HindIII seguido de 18 nucleótidos de la secuencia codificante de HDG NR10 comenzando desde el codón de inicio; la secuencia 3' 5' CTAGCTCGAGTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGCACAA GCCACAGATATTTTC 3' (SEC ID N°: 6) contiene secuencias complementarias a un sitio XhoI, codón de terminación de la traducción, marcador HA y los últimos 18 nucleótidos de la secuencia codificante de HDG NR10 (sin incluir el codón de terminación). Por lo tanto, el producto de PCR contiene una secuencia codificante de HDG NR10 de sitio HindIII seguida de marcador HA fusionado en fase, un codón de terminación de la traducción junto al marcador HA y un sitio XhoI. El fragmento de ADN amplificado por PCR y el vector, pcDNAI/Amp se digirieron con enzima de restricción HindIII y XhoI y se ligaron. La mezcla de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* SURE (disponible de Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037), el cultivo transformado se sembró en placas de medio con ampicilina y se seleccionaron colonias resistentes. Se aisló ADN plasmídico de los transformantes y se examinó mediante análisis de restricción con respecto a la presencia del fragmento correcto. Para la expresión del HDG NR10 recombinante, se transfectaron células COS con el vector de expresión mediante el método de DEAE-DEXTRANO (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989)). La expresión de la proteína HDG NR10 HA se detectó mediante método de radiomarcaje e inmunoprecipitación (E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)). Las células se marcaron durante 8 horas con <sup>35</sup>S-cisteína dos días después de la transfección. Después se recogieron los medios de cultivo y las células se lisaron con detergente (tampón RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 0,1%, NP-40 1%, DOC 0,5%, Tris 50 mM, pH 7,5)). (Wilson, I. *et*

*al.*, Id. 37:767 (1984). Tanto el lisado celular como el medio de cultivo se precipitaron con un anticuerpo monoclonal específico de HA. Se analizaron las proteínas precipitadas en geles de SDS-PAGE 15%.

### Ejemplo 3

#### Clonación y Expresión de HDGMR10 Usando el Sistema de Expresión de Baculovirus

- 5 La secuencia de ADN que codifica la proteína HDGMR10 de longitud completa, ATCC N° 97183, se amplificó usando cebadores oligonucleotídicos de PCR correspondientes a las secuencias 5' y 3' del gen:

El cebador 5' tiene la secuencia

- 10 5' CGGGATCCCTCCATGGATTATCAAGTGTC 3' (SEC ID N°: 7) y contiene un sitio de enzima de restricción BamHI seguido de 4 nucleótidos que asemejan una señal eficaz para el inicio de la traducción en células eucariotas (Kozak, M., J. Mol. Biol. 196:947-950 (1987)) y justo detrás de los primeros 18 nucleótidos del gen de HDGMR10 (el codón de inicio para la traducción es "ATG").

El cebador 3' tiene la secuencia

- 15 5' CGGGATCCCGCTCACAAGCCACAGATAT 3' (SEC ID N°: 8) y contiene el sitio de escisión para la endonucleasa de restricción BamHI y 18 nucleótidos complementarios a la secuencia no traducida 3' del gen de HDGMR10. Las secuencias amplificadas se aislaron de un gel de agarosa 1% usando un kit disponible en el mercado ("GeneClean," BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). El fragmento se digirió después con la endonucleasa BamHI y se purificó como se ha descrito anteriormente. Este fragmento se designa F2.

- 20 El vector pRG1 (modificación del vector pVL941, analizado posteriormente) se usa para la expresión de la proteína HDGMR10 usando el sistema de expresión de baculovirus (para una revisión véase: Summers, M. D. y Smith, G. E. 1987, A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin N° 1555). Este vector de expresión contiene el promotor de polihedrina fuerte del virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) seguido de los sitios de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BamHI. El sitio de poliadenilación del virus de simios (SV)40 se usa para poliadenilación eficaz. Para una selección fácil de virus recombinantes se inserta el gen de la beta-galactosidasa de *E. coli* en la misma orientación que el promotor de polihedrina seguido de la señal de poliadenilación del gen de la polihedrina. Las secuencias de polihedrina se flanquean en ambos lados por secuencias virales para la recombinación homóloga mediada por células de ADN viral de tipo silvestre cotransfectado. Muchos otros vectores de baculovirus podrían usarse en lugar de pRG1 tales como pAc373, pVL941 y pAcIM1 (Luckow, V. A. y Summers, M. D., Virology 170: 31-39).

- 30 El plásmido se digirió con la enzima de restricción BamHI y después se desfosforiló usando fosfatasa intestinal de ternero por procedimientos conocidos en la técnica. El ADN se aisló después de un gel de agarosa 1% como se ha descrito anteriormente. Este ADN del vector se designa V2.

- 35 El fragmento F2 y el plásmido desfosforilado V2 se ligaron con ADN ligasa T4. Se transformaron después células HB101 de *E. coli* y se identificaron bacterias que contenían el plásmido (pBacHDGMR10) con el gen de HDGMR10 usando la enzima BamHI. La secuencia del fragmento clonado se confirmó mediante secuenciación de ADN.

Se cotransfectaron 5 µg del plásmido pBacHDGMR10 con 1,0 µg de un baculovirus linealizado disponible en el mercado ("ADN de baculovirus BaculoGold™", Pharmingen, San Diego, CA.) usando el método de lipofección (Felgner, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417 (1987)).

- 40 Se mezclaron 1 µg de ADN de virus BaculoGold™ y 5 µg del plásmido pBacHDGMR10 en un pocillo estéril de una placa de microtitulación que contenía 50 µg de medio de Grace sin suero (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). Después se añadieron 10 µl de lipofectina más 90 µl de medio de Grace, se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después la mezcla de transfección se añadió en gotas a las células de insecto Sf9 (ATCC CRL 1711) sembradas en una placa de cultivo tisular de 35 mm con 1 ml de medio de Grace sin suero. La placa se balanceó adelante y atrás para mezclar la solución recién añadida. La placa se incubó después durante 5 horas a 27°C. Después de 5 horas la solución de transfección se retiró de la placa y se añadió 1 ml de medio de insecto de Grace complementado con suero de ternero fetal 10%. La placa se volvió a poner en un incubador y el cultivo continuó a 27°C durante 4 días.

- 50 Después de cuatro días el sobrenadante se recogió y se realizó un ensayo en placa similar al descrito en Summers y Smith (mencionado anteriormente). Se usó como una modificación un gel de agarosa con "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburg) que permite un aislamiento fácil de placas teñidas de azul. (Una descripción detallada de un "ensayo de placa" puede hallarse también en la guía del usuario para cultivo de células de insecto y baculovirología distribuida por Life Technologies Inc., Gaithersburg, páginas 9-10).

Cuatro días después de la dilución en serie, los virus se añadieron a las células, se tomaron las placas teñidas de azul con la punta de una pipeta Eppendorf. El agar que contenía los virus recombinantes se resuspendió después en

un tubo Eppendorf que contenía 200 µl de medio de Grace. El agar se retiró por una centrifugación breve y el sobrenadante que contenía los baculovirus recombinantes se usó para infectar células Sf9 sembradas en placas de 35 mm. Cuatro días después se recolectaron los sobrenadantes de estas placas de cultivo y se almacenaron después a 4°C.

- 5 Se cultivaron las células Sf9 en medio de Grace complementado con FBS inactivado por calor 10%. Las células se infectaron con el baculovirus recombinante V-HDGNR10 a una multiplicidad de infección (MOI) de 2. Seis horas después el medio se retiró y se reemplazó con medio SF900 II menos metionina y cisteína (Life Technologies Inc., Gaithersburg). 42 horas después se añadieron 5 µCi de <sup>35</sup>S-metionina y 5 µCi de <sup>35</sup>S cisteína (Amersham). Las células se incubaron adicionalmente durante 16 horas antes de recolectarse por centrifugación y las proteínas marcadas se visualizaron por SDS-PAGE y autorradiografía.

#### **Ejemplo 4**

##### **Expresión mediante Terapia Génica**

- 15 Se obtienen fibroblastos de un sujeto mediante biopsia de la piel. Se coloca el tejido resultante en medio de cultivo tisular y se separa en trozos pequeños. Las partes pequeñas del tejido se colocan en una superficie húmeda de un matraz de cultivo tisular, aproximadamente diez trozos se colocan en cada matraz. Se da la vuelta al matraz, se cierra de forma estrecha y se deja a temperatura ambiente durante una noche. Después de 24 horas a temperatura ambiente, el matraz se invierte y los trozos de tejido permanecen fijados en el fondo del matraz y se añade medio fresco (por ejemplo, medio F12 de Ham, con FBS 10%, penicilina y estreptomycin). Esto se incuba después a 37°C durante aproximadamente una semana. En este tiempo, se añaden medios frescos y se cambian posteriormente cada varios días. Después de dos semanas adicionales en cultivo, emerge una monocapa de fibroblastos. La monocapa se tripsiniza y se amplía a matraces más grandes.

pMV-7 (Kirschmeier, P. T. *et al*, DNA 7: 219-25 (1988)) flanqueado por las repeticiones terminales largas del virus del sarcoma murino de Moloney, se digiere con EcoRI y HindIII y se trata posteriormente con fosfatasa intestinal de ternero. El vector lineal se fracciona en gel de agarosa y se purifica, usando perlas de vidrio.

- 25 El ADNc que codifica un polipéptido de CCR5 se amplifica usando cebadores de PCR que corresponden a las secuencias de los extremos 5' y 3' respectivamente. El cebador 5' contiene un sitio de EcoRI y el cebador 3' contiene un sitio de HindIII. Se añaden juntas cantidades iguales de la cadena principal lineal del virus del sarcoma murino de Moloney y el fragmento de EcoRI y Hind III, en presencia de ADN ligasa T4. La mezcla resultante se mantiene en condiciones apropiadas para la ligación de los dos fragmentos. La mezcla de ligación se usa para transformar bacterias HB101, que se siembran en placas en agar que contiene kanamicina con el fin de confirmar que el vector tiene el gen de interés insertado de forma apropiada.

- 35 Las células de empaquetamiento pA317 o GP+am12 anfitriónicas se dejan crecer en cultivo tisular hasta una densidad de confluencia en medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con suero de ternero (CS) 10%, penicilina y estreptomycin. El vector de MSV que contiene el ge se añade después al medio y se transducen las células de empaquetamiento con el vector. Las células de empaquetamiento producen ahora partículas virales infecciosas que contienen el gen (las células de empaquetamiento se denominan ahora células productoras).

- 40 Se añade medio fresco a las células productoras transducidas y posteriormente el medio se recolecta de una placa de 10 cm de células productoras confluyentes. El medio agotado, que contiene las partículas virales infecciosas, se filtra a través de un filtro de membrana para retirar las células productoras separadas y este medio se usa después para infectar células fibroblásticas. Se retira el medio de una placa de fibroblastos por debajo de la confluencia y se reemplaza rápidamente con el medio de las células productoras. Este medio se retira y se reemplaza con medio fresco. Si la titulación del virus es alta, entonces virtualmente todos los fibroblastos se infectarán y no se requiere selección. Si la titulación es muy baja, entonces es necesario usar un vector retroviral que tenga un marcador seleccionable, tal como neo o his.

- 45 Los fibroblastos modificados por ingeniería genética se inyectan después en el hospedador, solos o después de haberse cultivado hasta la confluencia en perlas de microvehículo cytodex 3. Los fibroblastos producen ahora el producto proteico.

#### **Ejemplo 5**

##### **Aislamiento del Clon de ADN del Receptor de Quimiocina de proteína de G (CCR5) de la Muestra Depositada**

- 50 El ADN para el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se inserta en el sitio de clonación múltiple de pQE-9 (Qiagen, Inc.). pQE-9 contiene un gen de resistencia a Ampicilina y puede transformarse en la cepa de *E. coli* DH10B, disponible de Life Technologies. (Véase, por ejemplo, Gruber, C. E., *et al.*, Focus 15: 59- (1993).)

- 55 Pueden usarse dos enfoques para aislar Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de la muestra depositada. Primero, el clon depositado se transforma en un hospedador adecuado (tal como XL-1 Blue (Stratagene)) usando técnicas conocidas para los expertos en la materia, tales como las proporcionadas por el proveedor del vector o en

publicaciones o patentes relacionadas. Los transformantes se siembran en placas de agar 1,5% (que contienen el agente de selección apropiado, por ejemplo ampicilina) hasta una densidad de aproximadamente 150 transformantes (colonias) por placa. Se usa después una colonia sencilla para generar ADN usando técnicas de aislamiento de ácido nucleico bien conocidas para los expertos en la materia. (por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edic., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

Como alternativa, se sintetizan dos cebadores de 17-20 nucleótidos derivados de ambos extremos de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 21 (es decir, dentro de la región de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 21 limitada por el NT 5' y el NT 3' del clon) y se usan para amplificar el ADN del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) usando el plásmido de ADN depositado como un molde. La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo en condiciones rutinarias, por ejemplo, en 25 µl de mezcla de reacción con 0,5 µg del molde de ADN anterior. Una mezcla de reacción conveniente es MgCl<sub>2</sub> 1,5-5 mM, gelatina 0,01% (p/v), dATP, dCTP, dGTP, dTTP 25 µM cada uno, 25 pmol de cada cebador y 0,25 Unidades de Taq polimerasa. Se realizan treinta y cinco ciclos de PCR (desnaturalización a 94 grados C durante 1 minuto; hibridación a 55 grados C durante 1 minuto; elongación a 72 grados C durante 1 minuto) con un termociclador automático Perkin-Elmer Cetus. El producto amplificado se analiza por electroforesis en gel de agarosa y la banda de ADN con el peso molecular esperado se escinde y purifica. Se verifica que el producto de PCR es la secuencia seleccionada mediante subclonación y secuenciación del producto de ADN.

Están disponibles varios métodos para la identificación de las partes no codificantes 5' ó 3' del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que pueden no estar presentes en el clon depositado. Estos métodos incluyen pero sin limitación, ensayo de filtro, enriquecimiento de clones usando sondas específicas y protocolos similares o idénticos a los protocolos "RACE" 5' y 3' que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un método similar a RACE 5' está disponible para generar el extremo ausente 5' de un transcrito de longitud completa deseado. (Fromont-Racine *et al.*, Nucleic Acids Res. 21(7): 1683-1684 (1993).)

Brevemente, se liga un oligonucleótido de ARN específico a los extremos 5' de una población de ARN que presumiblemente contiene transcritos de ARN génico de longitud completa. Un conjunto de cebadores que contiene un cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico para una secuencia conocida del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de interés se usa para amplificar por PCR la parte 5' del gen de longitud completa del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Este producto amplificado puede después secuenciarse y usarse para generar el gen de longitud completa.

Este método anterior empieza con ARN total aislado de la fuente deseada, aunque puede usarse ARN poli-A+. La preparación de ARN puede después tratarse con fosfatasa si es necesario para eliminar grupos fosfato 5' en ARN degradado o dañado que puede interferir con la etapa de ARN ligasa posterior. La fosfatasa debería después inactivarse y tratarse el ARN con pirofosfatasa ácida del tabaco para retirar la estructura de protección presente en los extremos 5' de los ARN mensajeros. Esta reacción deja un grupo fosfato 5' en el extremo 5' del ARN con recubrimiento escindido que puede después ligarse con un oligonucleótido de ARN usando ARN ligasa T4.

Esta preparación de ARN modificada se usa como un molde para síntesis de ADNc de primera cadena usando un oligonucleótido específico del gen. La reacción de síntesis de la primera cadena se usa como un molde para amplificación por PCR del extremo 5' deseado usando un cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico para la secuencia conocida del gen de interés. El producto resultante se secuencia y analiza después para confirmar que la secuencia del extremo 5' pertenece al gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

### **Ejemplo 6**

#### **Aislamiento de los Clones Genómicos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

Se explora una biblioteca de P1 genómico humano (Genomic Systems, Inc.) mediante PCR usando cebadores seleccionados para la secuencia de ADN correspondiente a SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 21, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5 (Véase también, Sambrook.)

### **Ejemplo 7**

#### **Distribución Tisular de Polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

La distribución tisular de la expresión de ARNm del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se determina usando protocolos para análisis de transferencia de Northern, descritos por, entre otros, Sambrook *et al.* Por ejemplo, una sonda del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) producida por el método descrito en el Ejemplo 5 se marca con P<sup>32</sup> usando el sistema de marcaje de ADN rediprime™ (Amersham Life Science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del marcaje, la sonda se purifica usando columna CHROMA SPIN-100™ (Clontech Laboratories, Inc.), de acuerdo con el protocolo del fabricante número PT1200-1. La sonda marcada purificada se usa después para examinar diversos tejidos humanos con respecto a expresión de ARNm.

Se examinan transferencias de Northern de Tejido Múltiple (MTN) que contienen diversos tejidos humanos (H) o tejidos del sistema inmune humano (IM) (Clontech) con la sonda marcada usando solución de hibridación



ExpressHyb™ (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante número PT1190-1. Después de la hibridación y el lavado, las manchas de transferencia se montan y exponen a película a -70 grados C durante un noche y las películas se revelan de acuerdo con procedimientos convencionales.

### **Ejemplo 8**

#### **5 Mapeo Cromosómico del Receptor de Quimiocina de proteína G**

Se diseña un conjunto de cebadores oligonucleotídicos de acuerdo con la secuencia en el extremo 5' de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 21. Este cebador preferiblemente abarca aproximadamente 100 nucleótidos. Este conjunto de cebadores se usa después en una reacción en cadena de la polimerasa en el siguiente conjunto de condiciones: 30 segundos, 95 grados C; 1 minuto, 56 grados C; 1 minuto, 70 grados C. Este ciclo se repite 32 veces seguido de un ciclo de 5 minutos a 70 grados C. Se usa ADN de ser humano, ratón y hámster como molde además de un panel de híbridos celulares somáticos que contienen cromosomas individuales o fragmentos cromosómicos (Bios, Inc). Las reacciones se analizan en geles de poliacrilamida 8% o geles de agarosa 3,5%. Se determina el mapeo cromosómico por la presencia de un fragmento de PCR de aproximadamente 100 pb en el híbrido celular somático particular.

### **15 Ejemplo 9**

#### **Expresión Bacteriana del Receptor de Quimiocina de proteína G**

El polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que codifica un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de la invención se amplifica usando cebadores oligonucleotídicos de PCR que corresponden a los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN, como se define en el Ejemplo 5, para sintetizar fragmentos de inserción. Los cebadores usados para amplificar el inserto de ADNc preferiblemente deberían contener sitios de restricción, tales como BamHI y XbaI en el extremo 5' de los cebadores para clonar el producto amplificado en el vector de expresión. Por ejemplo, BamHI y XbaI corresponden a los sitios de enzima de restricción del vector de expresión bacteriana pQE-9. (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). Este vector plasmídico codifica resistencia a antibiótico (Amp<sup>r</sup>), un origen bacteriano de replicación (ori), un promotor/operador regulable por IPTG (P/O), un sitio de unión a ribosoma (RBS), un marcador de 6-histidina (6-His) y sitios de clonación de enzima de restricción.

El vector pQE-9 se digiere con BamHI y XbaI y el fragmento amplificado se liga en el vector pQE-9 manteniendo la fase de lectura iniciada en el RBS bacteriano. La mezcla de ligación se usa después para transformar la cepa de *E. coli* M15/rep4 (Qiagen, Inc.) que contiene múltiples copias del plásmido pREP4, que expresa el represor lacI y confiere también resistencia a kanamicina (Kan<sup>r</sup>). Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas LB y se seleccionan colonias resistentes a ampicilina/kanamicina. Se aísla ADN plasmídico y se confirma por análisis de restricción.

Los clones que contienen las construcciones deseadas se cultivan durante una noche (O/N) en cultivo líquido en medio LB complementado con Amp (100 µg/ml) y Kan (25 µg/ml). El cultivo O/N se usa para inocular un cultivo grande a una relación de 1:100 a 1:250. Las células se cultivan hasta una densidad óptica a 600 (D.O.<sup>600</sup>) de entre 0,4 y 0,6. Se añade después IPTG (Isopropil-B-D-tiogalacto piranosido) a una concentración final de 1 mM. IPTG induce por inactivación del represor lacI, eliminado el P/O lo que conduce a un aumento de la expresión génica.

Las células se cultivan durante 3 a 4 horas adicionales. Se recolectan las células por centrifugación (20 minutos a 6000 Xg). El sedimento celular se solubiliza en el agente caotrópico Guanidina HCl 6 Molar mediante agitación durante 3-4 horas a 4 grados C. El residuo celular se elimina por centrifugación y el sobrenadante que contiene el polipéptido se carga en una columna de resina de afinidad de ácido níquel-nitrilo-triacético ("Ni-NTA") (disponible de QIAGEN, Inc., mencionado anteriormente). Las proteínas con un marcador 6 x His se unen a la resina Ni-NTA con alta afinidad y pueden purificarse en un procedimiento de una etapa sencillo (para detalles véase: The QIAexpressionist (1995) QIAGEN, Inc., mencionado anteriormente).

Brevemente, el sobrenadante se carga en la columna en guanidina-HCl 6 M pH 8, la columna se lava primero con 10 volúmenes de guanidina HCl 6 M pH 8, después se lava con 10 volúmenes de guanidina-HCl 6 M pH 6 y finalmente el polipéptido se eluye con guanidina-HCl 6 M, pH 5.

La proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G purificada (CCR5) se renaturaliza después dializándola frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón Na-acetato 50 mM de pH 6 más NaCl 200 mM. Como alternativa, la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede volver a plegarse de forma exitosa estando inmovilizada en la columna Ni-NTA. Las condiciones recomendadas son las siguientes: renaturalizar usando un gradiente lineal de urea 6 M-1 M en NaCl 500 mM, glicerol 20%, Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, que contiene inhibidores de proteasa. La renaturalización debería realizarse durante un periodo de 1,5 horas o más. Después de la renaturalización las proteínas se eluyen por la adición de imidazol 250 mM. El imidazol se retira por una etapa de diálisis final frente a PBS o tampón de acetato sódico 50 mM pH 6 más NaCl 200 mM. La proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) purificada se almacena a 4°C o se congela a -80 grados C.

Además del vector de expresión anterior, la presente invención incluye adicionalmente un vector de expresión que

comprende elementos promotores y operadores de fago unidos operativamente a un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), llamado pHE4a. (Número de Acceso de ATCC 209645, depositado el 25 de febrero de 1998). Este vector contiene: 1) un gen de neomicinofototransferasa como un marcador de selección, 2) un origen de replicación de *E. coli*, 3) una secuencia promotora de fago T5, 4) dos secuencias operadoras lac, 5) una secuencia Shine-Delgarno y 6) el gen represor del operón de la lactosa (lacIq). El origen de replicación (oriC) deriva de pUC19 (LTI, Gaithersburg, MD). La secuencia promotora y las secuencias operadoras se preparan de forma sintética.

Puede insertarse ADN en el pHEa restringiendo el vector con NdeI y XbaI, BamHI, XhoI o Asp718, ejecutando el producto restringido en un gel y aislando el fragmento mayor (el fragmento más grande debería ser de aproximadamente 310 pares de bases). El inserto de ADN se genera de acuerdo con el protocolo de PCR descrito en el Ejemplo 5, usando cebadores de PCR que tienen sitios de restricción para NdeI (cebador 5') y XbaI, BamHI, XhoI o Asp718 (cebador 3'). El inserto de PCR se purifica en gel y se restringe con enzimas compatibles. El inserto y el vector se ligan de acuerdo con protocolos convencionales.

El vector desarrollado por ingeniería genética podría fácilmente sustituirse en el protocolo anterior para expresar proteína en un sistema bacteriano.

### **Ejemplo 10**

#### **Purificación del Polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de un cuerpo de inclusión**

El siguiente método alternativo puede usarse para purificar polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) expresado en *E. coli* cuando está presente en forma de cuerpos de inclusión. A no ser que se especifique de otro modo, todas las siguientes etapas se realizan a 4-10 grados C.

Después de la compleción de la fase de producción de la fermentación de *E. coli*, el cultivo celular se enfría a 4-10 grados C y las células se recolectan por centrifugación continua a 15.000 rpm (Heraeus Sepatech). Basándose en el rendimiento esperado de proteína por unidad de peso de concentrado celular y la cantidad de proteína purificada requerida, una cantidad apropiada de concentrado celular, por peso, se suspende en una solución de tampón que contiene Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4. Las células se dispersan a una suspensión homogénea usando un mezclador de alto cizallamiento.

Las células se lisan después pasando la solución a través de un microfluidizador (Microfluidics, Corp. o APV Gaulin, Inc.) dos veces a 4000-6000 psi (27,57-41,36 MPa). El homogeneizado se mezcla después con solución de NaCl hasta una concentración final de NaCl 0,5 M, seguido de centrifugación a 7000 xg durante 15 min. El sedimento resultante se lava de nuevo usando NaCl 0,5 M, Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4.

Los cuerpos de inclusión lavados resultantes se solubilizan con guanidina hidrocloreuro (GuHCl) 1,5 M durante 2-4 horas. Después de centrifugación 7000 xg durante 15 minutos, el sedimento se descarta y el polipéptido que contiene sobrenadante se incuba a 4 grados C durante una noche para permitir una extracción de GuHCl adicional.

Después de una centrifugación a alta velocidad (30.000 xg) para retirar partículas insolubles, la proteína solubilizada con GuHCl se vuelve a plegar mediante mezcla rápida del extracto de GuHCl con 20 volúmenes de tampón que contiene sodio 50 mM, pH 4,5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM mediante agitación vigorosa. La solución de proteína diluida replegada se mantiene a 4 grados C sin mezclar durante 12 horas antes de las etapas de purificación adicionales.

Para clarificar la solución de polipéptido replegado, se emplea una unidad de filtración tangencial preparada previamente equipada con un filtro de membrana de 0,16 µm con área de superficie apropiada (por ejemplo, Filtron), equilibrada con acetato sódico 40 mM, pH 6,0. La muestra filtrada se carga en una resina de intercambio catiónico (por ejemplo, Poros HS-50, Perseptive Biosystems). La columna se lava con acetato sódico 40 mM, pH 6,0 y se eluye con NaCl 250 mM, 500 mM, 1000 mM y 1500 mM en el mismo tampón, de una manera por etapas. La absorbancia a 280 nm del efluente se controla continuamente. Se recogen fracciones y se analizan adicionalmente mediante SDS-PAGE.

Las fracciones que contienen el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se agrupan después y se mezclan con 4 volúmenes de agua. La muestra diluida se carga después en un conjunto preparado previamente de columnas en tándem de resinas de intercambio aniónico fuerte (Poros HQ-50, Perseptive Biosystems) y aniónico débil (Poros CM-20, Perseptive Biosystems). Las columnas se equilibran con acetato sódico 40 mM, pH 6,0. Ambas columnas se lavan con acetato sódico 40 mM, pH 6,0, NaCl 200 mM. La columna CM-20 se eluye después usando un gradiente lineal de volumen de columna 10 que varía de NaCl 0,2 M, acetato sódico 50 mM, pH 6,0 a NaCl 1,0 M, acetato sódico 50 mM, pH 6,5. Las fracciones se recogen con control de A<sub>280</sub> constante del efluente. Las fracciones que contienen el polipéptido (determinadas, por ejemplo, mediante SDS-PAGE 16%) se agrupan después.

El polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) resultante debería mostrar más del 95% de pureza después de las etapas de replegamiento y purificación anteriores. No deberían observarse bandas importantes de contaminantes de gel SDS-PAGE 16% teñido con azul de Commassie cuando se cargan 5 µg de proteína purificada.

La proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) purificada también puede ensayarse con respecto a contaminación de endotoxina/LPS y típicamente el contenido de LPS es menor de 0,1 ng/ml de acuerdo con ensayos de LAL.

### **Ejemplo 11**

#### **5 Clonación y Expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un Sistema de expresión de Baculovirus**

En este ejemplo, el vector lanzadera plasmídico pA2 se usa para insertar un polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un baculovirus para expresar el Receptor de Quimiocina de proteína G. Este vector de expresión contiene el promotor fuerte de polihedrina del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) seguido de sitios de restricción convenientes tales como BamHI, Xba I y Asp718. El sitio de poliadenilación del virus de simio 40 ("SV40") se usa para una poliadenilación eficaz. Para la selección sencilla de virus recombinantes, el plásmido contiene el gen de la beta galactosidasa de *E. coli* bajo el control de un promotor débil de *Drosophila* en la misma orientación, seguido de la señal de poliadenilación del gen de la polihedrina. Los genes insertados están flanqueados en ambos lados por secuencias virales para recombinación homóloga mediada por células con ADN viral de tipo silvestre para generar un virus viable que exprese el polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) clonado.

Pueden usarse muchos otros vectores de baculovirus en lugar del vector anterior, tales como pAc373, pVL941 y pAcIM1, como apreciará fácilmente un experto en la materia, siempre que la construcción proporcione señales localizadas de forma apropiada para la transcripción, traducción, secreción y similares, incluyendo un péptido señal y un AUG en fase según se requiera. Tales vectores se describen, por ejemplo, en Luckow *et al.*, *Virology* 170: 31-39 (1989).

Específicamente, la secuencia de ADNc del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) contenida en el clon depositado, incluyendo el codón de iniciación AUG y cualquier secuencia líder asociada de forma natural, se amplifica usando el protocolo de PCR descrito en el Ejemplo 5. Si la secuencia señal de origen natural se usa para producir la proteína secretada, el vector pA2 no necesita un segundo péptido señal. Como alternativa, el vector puede modificarse (pA2 GP) para incluir una secuencia líder de baculovirus, usando los métodos convencionales descritos en Summers *et al.*, "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures," Texas Agricultural Experimental Station Bulletin Nº 1555 (1987).

El fragmento amplificado se aísla de un gel de agarosa 1% usando un kit disponible en el mercado ("GeneClean," BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). El fragmento se digiere después con enzimas de restricción apropiadas y se purifica de nuevo en un gel de agarosa 1%.

El plásmido se digiere con las enzimas de restricción correspondientes y opcionalmente, puede desfosforilarse usando fosfatasa intestinal de ternero, usando procedimientos rutinarios conocidos en la técnica. El ADN se aísla después de un gel de agarosa 1% usando un kit disponible en el mercado ("GeneClean" BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.).

El fragmento y el plásmido desfosforilado se ligan juntos con ADN ligasa T4. HB101 de *E. coli* u otros hospedadores de *E. coli* adecuados tales como células XL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) se transforman con la mezcla de ligación y se extienden en placas de cultivo. Las bacterias que contienen el plásmido se identifican mediante digestión de ADN de colonias individuales y analizando el producto de digestión por electroforesis en gel. La secuencia del fragmento clonado se confirma por secuenciación de ADN.

Se cotransfectan cinco µg de un plásmido que contiene el polinucleótido con 1,0 µg de un ADN de baculovirus linealizado disponible en el mercado ("BaculoGold™ baculovirus DNA", Pharmingen, San Diego, CA), usando el método de lipofección descrito por Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417 (1987). Se mezclan un µg de ADN de virus BaculoGold™ y 5 µg del plásmido en un pocillo estéril de una placa de microtitulación que contiene 50 µl de medio de Grace sin suero (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). Después, se añaden 10 µl de Lipofectin más 90 µl de medio de Grace, se mezclan y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añade la mezcla de transfección en gotas a células de insecto Sf9 (ATCC CRL 1711) sembradas en placas de cultivo tisular de 35 mm con 1 ml de medio de Grace sin suero. La placa se incuba después durante 5 horas a 27 grados C. La solución de transfección se retira después de la placa y se añade 1 ml de medio de insectos de Grace complementado con suero de ternero fetal 10%. El cultivo se continúa después a 27 grados C durante cuatro días.

Después de cuatro días el sobrenadante se recoge y se realiza un ensayo en placa, como se describe en Summers y Smith, mencionado anteriormente. Un gel de agarosa con "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburg) se usa para permitir la identificación y el aislamiento fáciles de clones que expresan gal, que producen placas teñidas de azul. (Una descripción detallada de un "ensayo de placa" de este tipo también puede encontrarse en la guía del usuario para el cultivo de células de insecto y baculovirología distribuido por Life Technologies Inc., Gaithersburg, páginas 9-10). Después de incubación apropiada, las placas teñidas de azul se tomaron con la punta de una micropipeta (por ejemplo, Eppendorf). El agar que contiene los virus recombinantes se resuspende después en un

tubo de microcentrífuga que contiene 200 µl de medio de Grace y la suspensión que contiene el baculovirus recombinante se usa para infectar células Sf9 sembradas en placas de 35 mm. Cuatro días después los sobrenadantes de estas placas de cultivo se recolectan y se almacenan después a 4 grados C.

Para verificar la expresión del polipéptido, se cultivan células Sf9 en medio de Grace complementado con FBS inactivado por calor 10%. Las células se infectan con el baculovirus recombinante que contiene el polinucleótido a una multiplicidad de infección ("MOI") de aproximadamente 2. Si se desean proteínas radiomarcadas, 6 horas después el medio se retira y se reemplaza con medio SF900 II sin metionina ni cisteína (disponible de Life Technologies Inc., Rockville, MD). Después de 42 horas, se añaden 5 µCi de <sup>35</sup>S-metionina y 5 µCi <sup>35</sup>S-cisteína (disponibles de Amersham). Las células se incuban adicionalmente durante 16 horas y después se recolectan por centrifugación. Las proteínas en el sobrenadante así como las proteínas intracelulares se analizan mediante SDS-PAGE seguido de autorradiografía (si están radiomarcadas).

Puede usarse microsecuenciación de la secuencia de aminoácidos del extremo aminoterminal de la proteína purificada para determinar la secuencia amino terminal de la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) producida.

## Ejemplo 12

### **Expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en Células de Mamífero**

El polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede expresarse en una célula de mamífero. Un vector de expresión de mamíferos típico contiene un elemento promotor, que media la iniciación de la transcripción de ARNm, una secuencia codificante de proteína y señales requeridas para la terminación de la transcripción y poliadenilación del transcrito. Los elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donadores y aceptores para corte y empalme de ARN. Se consigue transcripción altamente eficaz con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de Retrovirus, por ejemplo, VSR, HTLV, VIH y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden usarse elementos celulares (por ejemplo el promotor de actina humana).

Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2DHFR (ATCC 37146), pBC12MI (ATCC 67109), pCMVSPORT 2.0 y pCMVSPORT 3.0. Las células hospedadoras de mamífero que podrían usarse incluyen, células Hela, 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, Cos 1, Cos 7 y CV1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster Chino (CHO).

Como alternativa, puede expresarse el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en líneas celulares estables que contienen el polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) integrado en un cromosoma. La cotransfección con un marcador seleccionable tal como DHFR, gpt, neomicina, higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas.

El gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) transfectado también pueden amplificarse para expresar grandes cantidades de la proteína codificada. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil en el desarrollo de líneas celulares que portan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés (véase, por ejemplo, Alt, F. W., *et al.*, J. Biol. Chem. 253: 1357-1370 (1978); Hamlin, J. L. y Ma, C., Biochem. et Biophys. Acta, 1097: 107-143 (1990); Page, M. J. y Sydenham, M. A., Biotechnology 9: 64-68 (1991)). Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy *et al.*, Biochem J. 227: 277-279 (1991); Bebbington *et al.*, Bio/Technology 10: 169-175 (1992)). Usando estos marcadores, las células de mamíferos se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Estas líneas celulares contienen el gen o los genes amplificados integrados en un cromosoma. Con frecuencia se usan las células de ovario de hámster Chino (CHO) y NSO para la producción de proteínas.

Los derivados del plásmido pSV2-DHFR (Nº de Acceso de ATCC 37146), los vectores de expresión pC4 (Nº de Acceso de ATCC 209646) y pC6 (Nº de Acceso de ATCC 209647) contienen el promotor fuerte (LTR) del Virus del Sarcoma de Rous (Cullen *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 438-447 (Marzo, 1985)) más un fragmento del potenciador de CMV (Boshart *et al.*, Cell 41: 521-530 (1985)). Múltiples sitios de clonación, por ejemplo, con los sitios de escisión de la enzima de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del Receptor de Quimiocina de proteína G. Los vectores también contienen el intrón 3', la señal de poliadenilación y terminación del gen de preproinsulina de rata y el gen DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano de SV40.

Específicamente, el plásmido pC6 o pC4 se digiere con enzimas de restricción que cortan dentro del sitio de clonación múltiple y después se desfosforila usando fosfatos intestinales de ternero o procedimientos conocidos en la técnica. El vector se aísla después de un gel de agarosa 1%.

El vector puede modificarse para incluir una secuencia de señal heteróloga en un intento de secretar la proteína de la células (véase, por ejemplo, el documento WO 96/34891).

El fragmento amplificado se digiere después con enzimas de restricción que generan extremos complementarios a

los del vector digerido y se purifica en un gel de agarosa 1% usando un kit disponible en el mercado ("Geneclean," BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). El fragmento aislado y el vector desfosforilado se ligan después con ADN ligasa T4. Se transforman después células HB101 o XL-1 Blue de *E. coli* y se identifican bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC6 o pC4 usando, por ejemplo, análisis de enzimas de restricción.

Las células de ovario de hámster Chino que carecen de un gen DHFR activo se usan para transfección. Cinco µg del plásmido de expresión pC6 o pC4 se cotransfectan con 0,5 µg del plásmido pSVneo usando lipofectina (Felgner *et al.*, mencionado anteriormente). El plásmido pSV2-neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen de neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos incluyendo G418. Las células se siembran en MEM menos alfa complementado con G418 1 mg/ml. Después de 2 días, las células se tripsinizan y se siembran en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) en MEM menos alfa complementado con 10, 25 ó 50 ng/ml de metotrexato más G418 1 mg/ml. Después de aproximadamente 10-14 días se tripsinizan clones sencillos y se siembran después en placas de petri de 6 pocillos o matraces de 10 ml usando diferentes concentraciones de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen a las concentraciones mayores de metotrexato se transfieren después a nuevas placas de 6 pocillos que contienen concentraciones incluso mayores de metotrexato (1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 mM, 20 mM). El mismo procedimiento se repite hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100-200 µM. Se analiza la expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), por ejemplo, mediante SDS-PAGE y transferencia de Western o por análisis de HPLC de fase inversa.

### **Ejemplo 13**

#### **Construcción de Mutantes con Delección N Terminal y/o C Terminal**

El siguiente enfoque general puede usarse para clonar un mutante con delección del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de delección N terminal o C terminal. Generalmente, dos cebadores oligonucleotídicos de aproximadamente 15-25 nucleótidos derivan de las posiciones 5' y 3' deseadas de un polinucleótido de SEC ID N°: 1 o del clon depositado (SEC ID N°: 21). Las posiciones 5' y 3' de los cebadores se determinan basándose en el fragmento polinucleotídico del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) deseado. Un codón de inicio y terminación se añade a los cebadores 5' y 3' respectivamente, si es necesario, para expresar el fragmento polipeptídico del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) codificado por el fragmento polinucleotídico. Los fragmentos polinucleotídicos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) preferidos son los que codifican los mutantes de delección N terminal y C terminal descritos anteriormente en la sección "Fragmentos Polinucleotídicos y Polipeptídicos" de la memoria descriptiva.

También pueden añadirse nucleótidos adicionales que contienen sitios de restricción para facilitar la clonación del fragmento polinucleotídico del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un vector deseado a las secuencias de cebadores 5' y 3'. El fragmento polinucleotídico del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se amplifica a partir de ADN genómico o del clon de ADNc depositado usando los cebadores oligonucleotídicos de PCR apropiados y las condiciones analizadas en la presente memoria o conocidas en la técnica. Los fragmentos polipeptídicos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) codificados por los fragmentos polinucleotídicos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden expresarse y purificarse de la misma manera general que los polipéptidos de longitud completa, aunque pueden ser necesarias modificaciones rutinarias debido a las diferencias en propiedades químicas y físicas entre un fragmento particular y un polipéptido de longitud completa.

Como medio para ejemplificar pero no limitar la presente invención, el polinucleótido que codifica el fragmento polipeptídico del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) Y-37 a Q-280 se amplifica y clona como sigue: se genera un cebador 5' que comprende un sitio de enzima de restricción seguido de un codón de iniciación en fase con la secuencia polinucleotídica que codifica la parte N terminal del fragmento polipeptídico que comienza con Y-37. Se genera un cebador 3' complementario que comprende un sitio de enzima de restricción seguido de un codón de terminación en fase con la secuencia polinucleotídica que codifica la parte C terminal del fragmento polipeptídico del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que termina en Q-280.

El fragmento polinucleotídico amplificado y el vector de expresión se digieren con enzimas de restricción que reconocen los sitios en los cebadores. Los polinucleótidos digeridos se ligan después entre sí. El fragmento polinucleotídico del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se inserta en el vector de expresión restringido, preferiblemente de una manera que sitúa la región codificante del fragmento polipeptídico del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) cadena abajo del promotor. La mezcla de ligación se transforma en células *E. coli* competentes usando procedimientos convencionales y como se describe en los Ejemplos en la presente memoria. Se aísla ADN plasmídico de colonias resistentes y se confirma la identidad del ADN clonado por análisis de restricción, PCR y secuenciación de ADN.

### **Ejemplo 14**

#### **Fusiones Proteicas del Receptor de Quimiocina de proteína G**

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se fusionan preferiblemente con otras proteínas.

Estas proteínas de fusión pueden usarse para una diversidad de aplicaciones. Por ejemplo, la fusión de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con marcador de His, marcador de HA, proteína A, dominios de IgG y proteína de unión a maltosa facilitan la purificación. (Véase Ejemplo 9; véase también el documento EP A 394.827; Traunecker, *et al.*, Nature 331: 84-86 (1988)). De forma similar, la fusión con IgG-1, IgG-3 y albúmina aumenta el tiempo de semivida *in vivo*. Las señales de localización nuclear fusionadas con polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden dirigir la proteína a una localización subcelular específica, mientras que los heterodímeros u homodímeros covalentes pueden aumentar o reducir la actividad de una proteína de fusión. Las proteínas de fusión también pueden crear moléculas quiméricas que tienen más de una función. Finalmente, las proteínas de fusión pueden aumentar la solubilidad y/o estabilidad de la proteína de fusión en comparación con la proteína no fusionada. Todos los tipos de proteínas de fusión descritos anteriormente pueden prepararse modificando el siguiente protocolo, que describe la fusión de un polipéptido con una molécula de IgG, o el protocolo descrito en el Ejemplo 9.

Brevemente, la parte Fc humana de la molécula IgG puede amplificarse por PCR, usando cebadores que abarcan los extremos 5' y 3' de la secuencia descrita posteriormente. Estos cebadores también deberían tener sitios de enzima de restricción convenientes que facilitarían la clonación en un vector de expresión, preferiblemente un vector de expresión de mamífero.

Por ejemplo, si se usa pC4 (Nº de Acceso 209646), la parte Fc humana puede ligarse en el sitio de clonación BamHI. Obsérvese que el sitio BamHI 3' debería destruirse. A continuación, el vector que contiene la parte Fc humana se restringe con BamHI, linealizando el vector, y el polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), aislado por el protocolo de PCR descrito en el Ejemplo 5, se liga en este sitio BamHI. Obsérvese que el polinucleótido se clona sin un codón de terminación, de otro modo no se produciría una proteína de fusión.

Si la secuencia señal de origen natural se usa para producir la proteína secretada, pC4 no requiere un segundo péptido señal. Como alternativa, si la secuencia señal de origen natural no se usa, el vector puede modificarse para incluir una secuencia señal heteróloga (Véase, por ejemplo, documento WO 96/34891).

#### Región Fc de IgG humana:

```
GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAT
TCGAGGGTGCACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACTCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTAAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAACCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA
AGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
```

```
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGCGACTCTAGAGGAT (SEC ID N°: 10)
```

#### Ejemplo 15

##### Producción de un Anticuerpo

##### Tecnología de Hibridoma

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse por una diversidad de métodos (Véase, Current Protocols, Capítulo 2). Como ejemplo de tales métodos, se administran células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) a un animal para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales. En un método preferido, se prepara una preparación de proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y se purifica para hacerla sustancialmente sin contaminantes naturales. Dicha preparación se introduce después en un animal para producir antisueros policlonales de actividad específica mayor.

Se preparan anticuerpos monoclonales específicos para proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) usando tecnología de hibridoma (Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975); Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976); Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6: 292 (1976); Hammerling *et al.*, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas,

Elsevier, N. Y., pág. 563-681 (1981)). En general, un animal (preferiblemente un ratón) se inmuniza con polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o, más preferiblemente, con una célula que expresa polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) secretado. Tales células que expresan polipéptido se cultivan en cualquier medio de cultivo tisular adecuado, preferiblemente en medio de Eagle modificado por Earle complementado con suero bovino fetal 10% (inactivado a aproximadamente 56°C) y complementado con aminoácidos no esenciales aproximadamente 10 g/l, penicilina aproximadamente 1.000 U/ml y estreptomycin aproximadamente 100 µg/ml.

Los esplenocitos de tales ratones se extraen y fusionan con una línea celular de mieloma adecuada. Cualquier línea celular de mieloma adecuada puede emplearse de acuerdo con la presente invención; sin embargo, es preferible emplear en la línea celular de mieloma parental (SP20), disponible de la ATCC. Después de la fusión, las células de hibridoma resultante se mantiene selectivamente en medio HAT y después se clonan por dilución limitante como se describe en Wands *et al.* (Gastroenterology 80: 225-232 (1981)). Las células de hibridoma obtenidas a través de una selección tal se ensayan después para identificar clones que secretan anticuerpos capaces de unirse al polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Como alternativa, pueden producirse anticuerpos adicionales capaces de unirse al polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un procedimiento de dos etapas usando anticuerpos anti-idiotípicos. Un método tal hace uso del hecho de que los anticuerpos son en sí mismos antígenos y, por lo tanto, es posible obtener un anticuerpo que se une a un anticuerpo secundario. De acuerdo con este método, se usan anticuerpos específicos de proteínas para inmunizar un animal, preferiblemente un ratón. Los esplenocitos de un animal tal se usan después para producir células de hibridoma y las células de hibridoma se exploran para identificar clones que producen un anticuerpo cuya habilidad para unirse al anticuerpo específico de proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede bloquearse por Receptor de Quimiocina de proteína G. Tales anticuerpos comprenden anticuerpos anti-idiotípicos para el anticuerpo específico de proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y se usan para inmunizar un animal para inducir formación de anticuerpos específicos de proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) adicionales.

Para uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos, un anticuerpo se "humaniza". Tales anticuerpos pueden producirse usando construcciones genéticas derivadas de células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. Se conocen en la materia métodos para producir anticuerpos humanizados y quiméricos y se analizan en la presente memoria. (Véase, para revisión, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4: 214 (1986); Cabilly *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; Taniguchi *et al.*, documento EP 171496; Morrison *et al.*, documento EP 173494; Neuberger *et al.*, documento WO 8601533; Robinson *et al.*, documento WO 8702671; Boulianne *et al.*, Nature 312: 643 (1984); Neuberger *et al.*, Nature 314: 268 (1985).

#### **Aislamiento De Fragmentos de Anticuerpo Dirigidos Contra Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) De Una Biblioteca de scFv**

Se construyen genes V de origen natural aislados de PBL humanas en una biblioteca de fragmentos de anticuerpo que contienen reactividades frente a Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) al que el donador puede haber o no estado expuesto (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.885.793 incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad).

**Rescate de la Biblioteca.** Se construye una biblioteca de scFv a partir del ARN de PBL humanas como se describe en la publicación de PCT WO 92/01047. Para rescatar fagos que presentan fragmentos de anticuerpo, se usan *E. coli* que portan el fagémido para inocular 50 ml de 2xTY que contiene glucosa 1% y ampicilina 100 µg/ml (2xTY-AMP-GLU) y se cultivan a una D.O. de 0,8 con agitación. Se usan cinco ml de este cultivo para inocular 50 ml de 2xTY-AMP-GLU, 2 x 10<sup>8</sup> TU de gen delta 3 auxiliar (gen delta M13 III, véase publicación de PCT WO 92/01047) se añaden y el cultivo se incuba a 37°C durante 45 minutos sin agitación y después a 37°C durante 45 minutos con agitación. El cultivo se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 10 minutos y el sedimento se resuspende en 2 litros de 2xTY que contiene ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml y se dejan crecer durante una noche. Se preparan fagos como se describe en la publicación de PCT WO 92/01047.

El gel delta M13 III se prepara como sigue: el fago auxiliar de gen delta M13 III no codifica proteína del gen III, por eso el fago (o fagémido) que presenta fragmentos de anticuerpo tiene una mayor avidez de unión por el antígeno. Las partículas de gen delta M13 III infecciosas se preparan cultivando el fago auxiliar en células que portan un derivado de pUC19 que aporta la proteína del gen III de tipo silvestre durante la morfogénesis del fago. El cultivo se incuba durante 1 hora a 37°C sin agitación y después durante 1 hora adicional a 37°C con agitación. Las células se centrifugan (IEC-Centra 8.400 r.p.m. durante 10 minutos), se resuspenden en 300 ml de cultivo 2xTY que contiene 100 µg de ampicilina/ml y 25 µg de kanamicina/ml (2xTY-AMP-KAN) y se deja crecer durante una noche, agitando a 37°C. Se purifican las partículas de fago y se concentran a partir del medio de cultivo por dos precipitaciones con PEG (Sambrook *et al.*, 1990), se resuspenden en 2 ml de PBS y se pasan a través de un filtro de 0,45 µm (Minisart NML; Sartorius) para proporcionar una concentración final de aproximadamente 1013 unidades de transducción/ml (clones resistentes a ampicilina).

**Selección de la Biblioteca.** Se recubren inmunotubos (Nunc) durante una noche en PBS con 4 ml de un polipéptido

100 µg/ml o 10 µg/ml de la presente invención. Se bloquean tubos con Marvel-PBS 2% durante 2 horas a 37°C y después se lavan 3 veces en PBS. Se aplican aproximadamente 1013 TU del fago al tubo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente volteando en una placa giratoria inferior y superior y después se deja que permanezca durante otras 1,5 horas. Se lavan los tubos 10 veces con PBS 0,1% Tween-20 y 10 veces con PBS. Se eluye el fago mediante la adición de 1 ml de trietilamina 100 mM y rotación 15 minutos en una placa rotatoria inferior y superior después de lo cual la solución se neutraliza inmediatamente con 0,5 ml de Tris-HCl 1,0 M, pH 7,4. Los fagos se usan después para infectar 10 ml de *E. coli* TG1 semilogarítmicas mediante la incubación de fago eluido con bacterias durante 30 minutos a 37°C. Las *E. coli* se siembran después en placas TYE que contienen glucosa 1% y ampicilina 100 µg/ml. La biblioteca bacteriana resultante se rescata después con fago auxiliar de gen delta 3 como se ha descrito anteriormente para preparar fagos para un ciclo posterior de selección. Este procedimiento se repite después hasta un total de 4 ciclos de purificación de afinidad con lavado de tubos aumentado a 20 veces con PBS, Tween-20 0,1% y 20 veces con PBS para los ciclos 3 y 4.

**Caracterización de Agentes de Unión.** El fago eluido del 3º y 4º ciclos de selección se usa para infectar *E. coli* HB 2151 y se produce scFv soluble (Marks, *et al.*, 1991) de colonias sencillas para ensayo. Se realizan ELISA con placas de microtitulación recubiertas con polipéptido de la presente invención 10 pg/ml en bicarbonato 50 mM pH 9,6. Los clones positivos en ELISA se caracterizan adicionalmente mediante identificación genética por PCR (véase, por ejemplo, publicación de PCT WO 92/01047) y después por secuenciación. Estos clones positivos en ELISA se pueden caracterizar adicionalmente por técnicas conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, mapeo de epítomos, afinidad de unión, transducción de señal del receptor, capacidad de bloquear o inhibir competitivamente unión de anticuerpo/antígeno y actividad agonista o antagonista competitiva.

### **Ejemplo 16**

#### **Producción de Ligando o Proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) Para Ensayos de Exploración de Alto Rendimiento**

El siguiente protocolo contiene un sobrenadante que contiene un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) a ensayar. Los ligandos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) incluyen MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, Eotaxina, RANTES y VIH. Este sobrenadante puede usarse después en los ensayos de exploración descritos en los Ejemplos 18-25.

Primero, diluir solución madre de poli-D-Lisina (644 587 Boehringer-Mannheim) (1mg/ml en PBS) 1:20 en PBS (sin calcio o magnesio 17-516F Biowhittaker) para una solución de trabajo de 50 µg/ml. Añadir 200 µl de esta solución a cada pocillo (placas de 24 pocillos) e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Asegúrese de distribuir la solución sobre cada pocillo (obsérvese: puede usarse un pipeteador de 12 canales con puntas cada dos canales). Retirar por aspiración la solución de poli-D-Lisina y aclarar con 1 ml de PBS (Solución Salina Tamponada con Fosfato). El PBS debería permanecer en el pocillo hasta justo antes de sembrar las células en placas y las placas deberían recubrirse con polilisina con anterioridad durante dos semanas.

Sembrar células 293T en placas (no llevar las células más allá de P+20) a  $2 \times 10^5$  células/pocillo en 0,5 ml de DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) (con glucosa 4,5 G/L y L-glutamina (12-604F Biowhittaker))/FBS inactivada por calor 10% (14-503F Biowhittaker)/1x Penstrep (17-602E Biowhittaker). Dejar crecer las células durante una noche.

Al día siguiente, mezclar juntas en una cubeta de solución estéril: 300 µl de Lipofectamine (18324-012 Gibco/BRL) y 5ml de Optimen I (31985070 Gibco/BRL)/placa de 96 pocillos. Con un pipeteador multicanal de volumen pequeño, distribuir en alícuotas aproximadamente 2 µg de un vector de expresión que contiene un inserto polinucleotídico, producido por los métodos descritos en los Ejemplos 8-10, en una placa de fondo redondo de 96 pocillos marcada de forma apropiada. Con un pipeteador multicanal, añadir 50 µl de la mezcla de Lipofectamine/Optimen I a cada pocillo. Pipetear arriba y abajo suavemente para mezclar. Incubar a temperatura ambiente durante 15-45 minutos. Después de aproximadamente 20 minutos usar un pipeteador multicanal para añadir 150 µl de Optimen I a cada pocillo. Como un control, debería transfectarse una placa de ADN de vector sin un inserto con cada conjunto de transfecciones.

Preferiblemente, la transfección debería realizarse distribuyendo en equipo las diferentes tareas. Distribuyendo en equipo, el tiempo de trabajo se divide a la mitad y las células no pasan demasiado tiempo en PBS. Primero, la persona A retira por aspiración el medio de cuatro placas de 24 pocillos de células y después la persona B aclara cada pocillo con 0,5-1 ml de PBS. La persona A retira después por aspiración el aclarado de PBS y la persona B usando un pipeteador de 12 canales con puntas cada dos canales, añade los 200 µl de complejo ADN/Lipofectamine/Optimen I a los pocillos impares primero, después a los pocillos pares, a cada fila de las placas de 24 pocillos. Incubar a 37°C durante 6 horas.

Mientras las células se están incubando preparar medio apropiado, BSA 1% en DMEM con penstrep 1 x o medio de HGS CHO-5 (CaCl 2116,6 mg/l (anhid); CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,00130 mg/l; Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O 0,050 mg/l; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,417 mg/l; KCl 311,80 mg/l; MgCl<sub>2</sub> 28,64 mg/l; MgSO<sub>4</sub> 48,84 mg/l; NaCl 6995,50 mg/l; NaHCO<sub>3</sub> 2400,0 mg/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 62,50 mg/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 71,02 mg/l; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,4320 mg/l; Ácido Araquidónico 0,002 mg/l; Colesterol 1,022 mg/l;



DL-alfa-Tocoferol-Acetato 0,070 mg/l; Ácido Linoleico 0,0520 mg/l; Ácido Linolénico 0,010 mg/l; Ácido Mirístico 0,010 mg/l; Ácido Oleico 0,010 mg/l; Ácido Palmítico 0,010 mg/l; Pluronic F-68 100 mg/l; Ácido Esteárico 0,010 mg/l; Tween 80 2,20 mg/l; D-Glucosa 4551 mg/l; L-Alanina 130,85 mg/ml; L-Arginina-HCl 147,50 mg/ml; L-Asparagina-H<sub>2</sub>O 7,50 mg/ml; Ácido L-Aspártico 6,65 mg/ml; L-Cisteína-2HCl-H<sub>2</sub>O 29,56 mg/ml; L-Cistina-2HCl 31,29 mg/ml; Ácido L-Glutámico 7,35 mg/ml; L-Glutamina 365,0 mg/ml; Glicina 18,75 mg/ml; L-Histidina-HCl-H<sub>2</sub>O 52,48 mg/ml; L-Isoleucina 106,97 mg/ml; L-Leucina 111,45 mg/ml; L-Lisina HCl 163,75 mg/ml; L-Metionina 32,34 mg/ml; L-Fenilalanina 68,48 mg/ml; L-Prolina 40,0 mg/ml; L-Serina 26,25 mg/ml; L-Treonina 101,05 mg/ml; L-Triptófano 19,22 mg/ml; L-Tirosina-2Na-2H<sub>2</sub>O 91,79 mg/ml y L-Valina 99,65 mg/ml; Biotina 0,0035 mg/l; D-Ca Pantotenato 3,24 mg/l; Cloruro de Colina 11,78 mg/l; Ácido Fólico 4,65 mg/l; i-Inositol 15,60 mg/l; Niacinamida 3,02 mg/l; Piridoxal HCl 3,40 mg/l; Piridoxina HCl 0,031 mg/l; Riboflavina 0,319 mg/l; Tiamina HCl 3,17 mg/l; Timidina 0,365 mg/l; Vitamina B<sub>12</sub> 0,680 mg/l; Tampón HEPES 25 mM; Na Hipoxantina 2,39 mg/l; Ácido Lipoico 0,105 mg/l; Putrescina Sódica-2HCl 0,081 mg/l; Piruvato Sódico 55,0 mg/l; Selenita Sódica 0,0067 mg/l; Etanolamina 20 µM; Citrato Férrico 0,122 mg/l; Metil-B-Ciclodextrina en complejo con Ácido Linoleico 41,70 mg/l; Metil-B-Ciclodextrina en complejo con Ácido Oleico 33,33 mg/l; Metil-B-Ciclodextrina en complejo con Acetato de Retinal 10 mg/l. Ajustar la osmolaridad a 327 mOsm con glutamina 2 mm y penstrep 1x (BSA (81-068-3 Bayer) 100gm disuelto en 1 l de DMEM para una solución madre de BSA 10%). Filtrar los medios y recoger 50 µl para ensayo de endotoxina en 15 ml de poliestireno cónico.

La reacción de transfección se detiene, preferiblemente mediante trabajo en equipo, al final del periodo de incubación. La persona A retira por aspiración el medio de transfección mientras la persona B añade 1,5 ml de medio apropiado a cada pocillo. Incubar a 37 grados C durante 42 o 72 horas dependiendo del medio usado: BSA 1% durante 45 horas o CHO-5 durante 72 horas.

El día cuatro, usando un pipeteador multicanal de 300 µl, repartir en alícuotas 600 µl en una placa de pocillos de 1 ml de profundidad y el sobrenadante restante en un pocillo de 2 ml de profundidad. Los sobrenadantes de cada pocillo pueden usarse después en los ensayos descritos en los Ejemplos 18-25.

Se entiende específicamente que cuando se obtiene actividad en cualquiera de los ensayos descritos posteriormente usando un sobrenadante, la actividad se origina del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) directamente (por ejemplo, como una proteína secretada, soluble o asociada a membrana) o del ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) directamente o induciendo el ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) expresión de otras proteínas, que se secretan después en el sobrenadante. Por lo tanto, la invención proporciona adicionalmente un método para identificar la proteína en el sobrenadante caracterizado por una actividad en un ensayo particular.

### **Ejemplo 17**

#### **Construcción de Construcción Informadora de GAS**

Una ruta de transducción de señal implicada en la diferenciación y proliferación de células se llama la ruta Jaks-STAT. Las proteínas activadas en la ruta Jaks-STAT se unen a elementos "GAS" de sitios de activación gamma o elementos de respuesta sensibles a interferón ("ISRE"), localizados en el promotor de muchos genes. La unión de una proteína a estos elementos altera la expresión del gen asociado.

Los elementos GAS e ISRE se reconocen por una clase de factores de transcripción llamados transductores de señal y activadores de transcripción o "STAT". Existen seis miembros de la familia STAT. Stat1 y Stat3 están presentes en muchos tipos celulares, al igual que Stat2 (puesto que la respuesta a IFN-alfa es generalizada). Stat4 está más restringido y no está en muchos tipos celulares aunque se ha encontrado en linfocitos auxiliares T de clase I después de tratamiento con IL-12. Stat5 se llamó originalmente factor de crecimiento mamario, pero se ha encontrado en mayores concentraciones en otras células incluyendo células mieloides. Puede activarse en células de cultivo tisular por muchas citocinas.

Los STAT se activan para translocar del citoplasma al núcleo tras fosforilación de tirosina por un conjunto de quinasas conocidas como la familia de quinasas de Janus ("Jaks"). Jaks representa una familia particular de tirosina quinasa soluble e incluye Tyk2, Jak1 Jak2 y Jak3. Estas quinasas presentan una similitud de secuencia significativa y generalmente están catalíticamente inactivas en células en reposo.

Las Jaks se activan por una amplia serie de receptores resumidos en la Tabla 3 posteriormente. (Adaptada de la revisión por Schidler y Darnell, *Ann. Rev. Biochem.* 64: 621-51 (1995)). Una familia del receptor de citocinas, capaz de activar Jaks, se divide en dos grupos: (a) la Clase 1 incluye receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, Epo, PRL, GH, G-CSF, GM-CSF, LIF, CNTF y trombopoyetina; y (b) la Clase 2 incluye IFN-a, IFN-g e IL-10. Los receptores de Clase 1 comparten un motivo de cisteína conservado (un conjunto de cuatro cisteínas conservadas y un triptófano) y un motivo WSXWS (una región proximal a membrana que codifica Trp-Ser-Xxx-Trp-Ser (SEC ID N°: 11)).

De este modo, al unirse un ligando a un receptor, se activan Jaks, que a su vez activan STAT, que se translocan después y se unen a elementos GAS. Este procedimiento completo está abarcado en la ruta de transducción de

señal Jaks-STAT.

Por lo tanto, la activación de la ruta Jaks-STAT, reflejada por la unión del elemento GAS o el ISRE, puede usarse para indicar proteínas implicadas en la proliferación y diferenciación de células. Por ejemplo, se sabe que los factores de crecimiento y las citocinas activan la ruta Jaks-STAT (Véase Tabla 3 a continuación). Por lo tanto, mediante el uso de elementos GAS unidos a moléculas informadoras, pueden identificarse activadores de la ruta Jaks-STAT.

5

Tabla 3

	JAK		STATS		GAS(elementos) o ISRE
Ligando	tyk2	Jak1	Jak2	Jak3	
<hr/>					
<u>Familia IFN</u>					
IFN-a/B	+	+	-	-	1, 2, 3 ISRE
IFN-g	+	+	-	1	GAS (IRF1>Lys6>IFP)
II-10	+	?	?	-	1,3

Familia gp130

IL-6 (Pleiotrópico)	+	+	+	?	1,3	GAS (IRF1>Lys6>IFP)
---------------------	---	---	---	---	-----	---------------------

IL-11(Pleiotrópico)	?	+	?	?	1,3	
---------------------	---	---	---	---	-----	--

OnM(Pleiotrópico)	?	+	+	?	1,3	
-------------------	---	---	---	---	-----	--

LIF(Pleiotrópico)	?	+	+	?	1,3	
-------------------	---	---	---	---	-----	--

CNTF(Pleiotrópico)	/+	-	+	+	?	
--------------------	----	---	---	---	---	--

G-CSF(Pleiotrópico)	?	+	?	?	1,3	
---------------------	---	---	---	---	-----	--

IL-12(Pleiotrópico)	+	-	+	+	1,3	
---------------------	---	---	---	---	-----	--

Familia g-C

IL-2 (linfocitos)	-	+	-	+	1,3,5	GAS
-------------------	---	---	---	---	-------	-----

Ligando	JAK		STATS			GAS(elementos) o ISRE
	tyk2	Jak1	Jak2	Jak3		
IL-4 (linfo/mieloide)	-	+	-	+	6	GAS(IRF1=IFP >>Ly6)(IgH)
IL-7 (linfocitos)	-	+	-	+	5	GAS
IL-9 (linfocitos)	-	+	-	+	5	GAS
IL-13 (linfocito)	-	+	?	?	6	GAS
IL-15	?	+	?	+	5	GAS
<u>Familia gp 140</u>						
IL-3 (mieloide)	-	-	+	-	5	GAS (IRF1>IFP>>Ly6)
IL-5 (mieloide)	-	-	+	-	5	GAS
GM-CSF (mieloide)	-	-	+	-	5	GAS
<u>Familia de hormona del crecimiento</u>						
GH	?	-	+	-	5	
PRL	?	+/-	+	-	1,3,5	
EPO	?	-	+	-	5	GAS(B-CAS>IRF1=IFP>>Ly6)
<u>Tirosinas Quinasas Receptoras</u>						
EGF	?	+	+	-	1,3	GAS (IRF1)
PDGF	?	+	+	-	1,3	
CSF-1	?	+	+	-	1,3	GAS (no IRF1)

Para construir un GAS sintético que contiene elemento promotor, que se usa en el ensayo biológico descrito en los Ejemplos 18-19, se emplea una estrategia basada en PCR para generar una secuencia promotora de GAS-SV40. El cebador 5' contiene 4 cuatro copias en tándem del sitio de unión a GAS que se encuentra en el promotor IRF1 y que se ha demostrado previamente que se une a STAT tras inducción con una serie de citocinas (Rothman *et al.*, Immunity 1: 457-468 (1994), aunque pueden usarse otros elementos GAS o ISRE en su lugar. El cebador 5' también contiene 18 pb de secuencia complementaria a la secuencia promotora temprana de SV40 y está flanqueado con un sitio XhoI. La secuencia del cebador 5' es:

**5':GCGCCTCGAGATTTCCCCGAAATCTAGATTTCCCCGAAATGATTT  
CCCCGAAATGATTTCCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAG:3' (SEC  
ID N°: 12)**

El cebador cadena abajo es complementario al promotor de SV40 y está flanqueado con un sitio Hind III:  
5':GCGGCAAGCTTTTGTCAAAGCCTAGGC:3' (SEC ID N°: 13)

Se realiza amplificación por PCR usando el molde del promotor de SV40 presente en el plásmido B-gal:promotor obtenido de Clontech. El fragmento de PCR resultante se digiere con XhoI/Hind III y se subclona en BLSK2 (Stratagene). La secuenciación con cebadores directo e inverso confirma que el inserto contiene la siguiente secuencia:

5':CTCGAGATTTCCCCGAAATCTAGATTTCCCCGAAATGATTTCCCC  
 GAAATGATTTCCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACC  
 ATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCA  
 GTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTAT  
 GCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT  
 GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT:3'

(SEC ID Nº: 14)

Con este elemento promotor de GAS unido al promotor de SV40, se obtiene a continuación por ingeniería genética una construcción informadora de GAS:SEAP2. Aquí, la molécula informadora es una fosfatasa alcalina secretada o "SEAP". Claramente, sin embargo, puede usarse cualquier molécula informadora en lugar de SEAP, en este o en cualquiera de los otros ejemplos. Las moléculas informadoras bien conocidas que pueden usarse en lugar de SEAP incluyen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, fosfatasa alcalina, B-galactosidasa, proteína verde fluorescente (GFP) o cualquier proteína detectable por un anticuerpo.

El elemento promotor de GAS-SV40 sintético confirmado de la secuencia anterior se subclona en el vector pSEAP-Promotor obtenido de Clontech usando HindIII y XhoI, reemplazando de forma eficaz el promotor de SV40 con el elemento promotor de GAS:SV40 amplificado, para crear el vector GAS-SEAP. Sin embargo, este vector no contiene un gen de resistencia a neomicina y por lo tanto no se prefiere para sistemas de expresión de mamíferos.

Por lo tanto, para generar líneas celulares estables de mamíferos que expresen el informador GAS-SEAP, el casete GAS-SEAP se retira del vector GAS-SEAP usando Sall y NotI, y se inserta en un vector de cadena principal que contiene el gen de resistencia a neomicina, tal como pGFP-1 (Clontech), usando estos sitios de restricción en el sitio de clonación múltiple, para crear el vector GAS-SEAP/Neo. Una vez que este vector está transfectado en células de mamífero, este vector puede usarse después como una molécula informadora para unión a GAS como se describe en los Ejemplos 18-19.

Pueden prepararse otras construcciones usando la descripción anterior y reemplazando GAS con una secuencia promotora diferente. Por ejemplo, la construcción de moléculas informadoras que contienen las secuencias promotoras NFK-B y EGR se describe en los Ejemplos 20 y 21. Sin embargo, pueden sustituirse muchos otros promotores usando los protocolos descritos en estos Ejemplos. Por ejemplo, pueden sustituirse los promotores SRE, IL-2, NFAT o Osteocalcina, solos o en combinación (por ejemplo, GAS/NF-KB/EGR, GAS/NF-KB, IL-2/NFAT o NF-KB/GAS). De forma similar, pueden usarse otras líneas celulares para ensayar actividad de construcción informadora, tal como HELA (epitelial), HUVEC (endotelial), Reh (linfocitos B), Saos-2 (osteoblasto), HUVAC (aórtica) o Cardiomiocitos.

### **Ejemplo 18**

#### **Ensayo de Exploración de Alto Rendimiento para Actividad de Linfocitos T.**

Se usa el siguiente protocolo para evaluar actividad de linfocitos T mediante la identificación de factores y la determinación de si el sobrenadante que contiene un polipéptido o un ligando del mismo prolifera y/o diferencia linfocitos T. La actividad de linfocitos T se evalúa usando la construcción GAS/SEAP/Neo producida en el Ejemplo 17. Por lo tanto, los factores que aumentan la actividad de SEAP indican la capacidad de activar la ruta de transducción de señal Jaks-STAT. Los linfocitos T usados en este ensayo son linfocitos T Jurkat (Nº de Acceso de ATCC TIB-152), aunque también pueden usarse células Molt-3 (Nº de Acceso de ATCC CRL-1552) y células Molt-4 (Nº de Acceso de ATCC CRL-1582).

Los linfocitos T Jurkat son linfocitos Th1 auxiliares CD4+ linfoblásticos. Para generar líneas celulares estables, se transfectan aproximadamente 2 millones de células Jurkat con el vector GAS-SEAP/neo usando DMRIE-C (Life Technologies) (procedimiento de transfección descrito posteriormente). Las células transfectadas se siembran a una densidad de aproximadamente 20.000 células por pocillo y se seleccionan transfectantes resistentes a denticina 1 mg/ml. Las colonias resistentes se expanden y se ensayan después con respecto a su respuesta a concentraciones crecientes de interferón gamma. Se demuestra la respuesta a dosis de un clon seleccionado.

Específicamente, el siguiente protocolo producirá suficientes células para 75 pocillos que contienen 200 µl de células. De este modo, se amplía la escala o se realiza múltiples veces para generar suficientes células para múltiples placas de 96 pocillos. Las células Jurkat se mantienen en RPMI + suero 10% con Pen-Strep 1%. Combinar 2,5 ml de OPTI-MEM (Life Technologies) con 10 µg de ADN plasmídico en un matraz T25. Añadir 2,5 ml de OPTI-MEM que contienen 50 µl de DMRIE-C e incubar a temperatura ambiente durante 15-45 minutos.

Durante el periodo de incubación, contar la concentración de células, centrifugar el número requerido de células ( $10^7$  por transfección) y resuspender OPTI-MEM hasta una concentración final de  $10^7$  células/ml. Después añadir 1 ml de  $1 \times 10^7$  células en OPTI-MEM a un matraz T25 e incubar a 37 grados C durante 6 horas. Después de la incubación, añadir 10 ml de RPMI más suero 15%.

- 5 Las líneas informadoras estables Jurkat:GAS-SEAP se mantienen en RPMI + suero 10%, Gentamicina 1 mg/ml y Pen-Strep 1%. Estas células se tratan con sobrenadantes que contienen polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o polipéptidos inducidos por Receptor de Quimiocina de Proteína G (CCR5) como se producen por el protocolo descrito en el Ejemplo 16.

- 10 El día del tratamiento con el sobrenadante, las células deberían lavarse y resuspenderse en RPMI fresco + suero 10% hasta una densidad de 500.000 células por ml. El número exacto de células requeridas dependerá del número de sobrenadantes a explorar. Para una placa de 96 pocillos, se requieren aproximadamente 10 millones de células (para 10 placas, 100 millones de células).

- 15 Transferir las células a un bote de depósito triangular, para distribuir las células en una placa de 96 pocillos, usando una pipeta de 12 canales. Usando una pipeta de 12 canales, transferir 200  $\mu$ l de células a cada pocillo (añadiendo por lo tanto 100.000 células por pocillo).

Después de que se haya sembrado todas las placas, se transfieren 50  $\mu$ l de los sobrenadantes directamente de la placa de 96 pocillos que contienen los sobrenadantes a cada pocillo usando una pipeta de 12 canales. Además, se añade una dosis de interferón gamma exógeno (0,1, 1,0, 10 ng) a los pocillos H9, H10 y H11 para servir como controles positivos adicionales para el ensayo.

- 20 Las placas de 96 pocillos que contienen células Jurkat preparadas con sobrenadantes se colocan en un incubador durante 48 horas (obsérvese: este tiempo es variable entre 48-72 horas). Se transfieren después muestras de 35  $\mu$ l de cada pocillo a una placa de 96 pocillos opaca usando una pipeta de 12 canales. Las placas opacas deberían cubrirse (usando cubiertas de selofeno) y almacenarse a -20°C hasta que se realicen los ensayos de SEAP de acuerdo con el Ejemplo 18. Las placas que contienen las células tratadas restantes se colocan a 4 grados C y sirven como una fuente de material para repetir el ensayo en un pocillo específico si se desea.

- 25 Como control positivo, puede usarse interferón gamma 100 Unidades/ml que se sabe que activa los linfocitos T Jurkat. Típicamente se observa una inducción de más de 30 veces en los pocillos de control positivo.

El protocolo anterior puede usarse en la generación de células transfectadas de forma transitoria, así como estables, lo que resultaría evidente para los expertos en la materia.

### 30 **Ejemplo 19**

#### **Ensayo de Exploración de Alto Rendimiento que Identifica Actividad Mieloide**

- 35 El siguiente protocolo se usa para evaluar la actividad mieloide del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mediante la determinación de si el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) prolifera y/o diferencia células mieloides. La actividad de células mieloides se evalúa usando la construcción GAS/SEAP/Neo producida en el Ejemplo 17. De este modo, los factores que aumentan la actividad de SEAP indican la capacidad para activar la ruta de transducción de señal Jaks-STATS. La célula mieloide usada en este ensayo es U937, una línea celular de premonocitos, aunque puede usarse TF-1, HL60 o KG1.

- 40 Para transfectar de forma transitoria células U937 con la construcción GAS/SEAP/Neo producida en el Ejemplo 17, se usa un método de DEAE-Dextrano (Kharbanda *et al.*, 1994, Cell Growth & Differentiation, 5: 259-265). Primero, recolectar  $2 \times 10^7$  células U937 y lavar con PBS. Las células U937 normalmente se cultivan en medio RPMI 1640 que contiene suero bovino fetal inactivado por calor 10% (FBS) complementado con penicilina 100 unidades/ml y estreptomycin 100 mg/ml.

- 45 A continuación, suspender las células en 1 ml de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) que contiene DEAE-Dextrano 0,5 mg/ml, 8  $\mu$ g de ADN plasmídico de GAS-SEAP2, NaCl 140 mM, KCl 5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  375  $\mu$ M,  $\text{MgCl}_2$  1 mM y  $\text{CaCl}_2$  675  $\mu$ M. Incubar a 37 grados C durante 45 minutos.

Lavar las células con medio RPMI 1640 que contiene FBS 10% y resuspender después en 10 ml de medio completo e incubar a 37 grados C durante 36 horas.

- 50 Las células estables GAS-SEAP/U937 se obtienen dejando crecer las células en G418 400  $\mu$ g/ml. El medio sin G418 se usa para crecimiento rutinario pero cada uno a dos meses, las células deberían volver a dejarse crecer en G418 400  $\mu$ g/ml durante un par de pases.

Estas células se ensayan recolectando  $1 \times 10^8$  células (esto es suficiente para un ensayo en diez placas de 96 pocillos) y se lavan con PBS. Suspender las células en 200 ml del medio de crecimiento anteriormente descrito, con

una densidad final de  $5 \times 10^5$  células/ml. Sembrar en placas 200  $\mu$ l de células por pocillo en la placa de 96 pocillos (o  $1 \times 10^5$  células/pocillo).

- 5 Añadir 50  $\mu$ l de sobrenadante preparado por el protocolo descrito en el Ejemplo 16. Incubar a 37 grados C durante 48 a 72 horas. Como un control positivo, puede usarse interferón gamma 100 Unidades/ml que se sabe que activa las células U937. Típicamente se observa una inducción de más de 30 veces en los pocillos de control positivo. Ensayar por SEAP el sobrenadante de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 22.

### **Ejemplo 20**

#### **Ensayo de Exploración de Alto Rendimiento que Identifica Actividad Neuronal**

- 10 Cuando las células experimentan diferenciación y proliferación, se activa un grupo de genes a través de muchas rutas de transducción de señal diferentes. Uno de estos genes, EGR1 (gen de respuesta a crecimiento temprano 1), se induce en diversos tejidos y tipos celulares tras la activación. El promotor de EGR1 es responsable de dicha inducción. Usando el promotor de EGR1 ligado a moléculas informadoras, puede evaluarse la activación de células por Receptor de Quimiocina de Proteína G (CCR5) o un ligando del mismo.

- 15 Particularmente, el siguiente protocolo se usa para evaluar actividad neuronal en líneas celulares PC12. Se sabe que las células PC12 (células de fenocromocitoma de rata) proliferan y/o se diferencian por activación con varios mitógenos, tales como TPA (tetradecanoil forbol acetato), NGF (factor de crecimiento neuronal) y EGF (factor de crecimiento epidérmico). La expresión del gen EGR1 se activa durante este tratamiento. De este modo, transfectando de forma estable células PC12 con una construcción que contiene un promotor de EGR ligado a un informador SEAP, se puede evaluar la activación de células PC12 por Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un ligando del mismo.

La construcción de EGR/informador SEAP puede ensamblarse por el siguiente protocolo. La secuencia promotora de EGR-1 (-633 a +1) (Sakamoto K *et al.*, Oncogene 6: 867-871 (1991)) puede amplificarse por PCR a partir de ADN genómico humano usando los siguientes cebadores:

5' GCGCTCGAGGGATGACAGCGATAGAACCCCGG -3' (SEC ID N°: 15)

- 25 5' GCGAAGCTTCGCGACTCCCCGGATCCGCCTC-3' (SEC ID N°: 16)

Usando el vector GAS:SEAP/Neo producido en el Ejemplo 17, puede insertarse después producto amplificado de EGR1 en este vector. Linealizar el vector GAS:SEAP/Neo usando enzimas de restricción XhoI/HindIII, retirando el relleno de GAS/SV40. Restringir el producto amplificado de EGR1 con estas mismas enzimas. Ligar el vector y el promotor de EGR1.

- 30 Para preparar placas de 96 pocillos para cultivo celular, se añaden 2 ml de una solución de recubrimiento (dilución 1:30 de colágeno tipo I (Upstate Biotech Inc. Cat. N° 08-115) en etanol 30% (esterilizado por filtración)) por placa de 10 cm o 50 ml por pocillo de la placa de 96 pocillos y se permite que se sequen al aire durante 2 horas.

- 35 Las células PC12 se dejan crecer rutinariamente en medio RPMI-1640 (Bio Whittaker) que contiene suero de caballo 10% (JRH BIOSCIENCES, Cat. N° 12449-78P), suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor 5% complementado con penicilina 100 Unidades/ml y estreptomina 100  $\mu$ g/ml en una placa de cultivo tisular de 10 cm previamente recubierta. Cada tres o cuatro días se realiza una dilución de uno a cuatro. Las células se retiran de las placas por raspado y se resuspenden pipeteando arriba y abajo más de 15 veces.

- 40 Transfectar PC12 con la construcción EGR/SEAP/Neo usando el protocolo de lipofectamine descrito en el Ejemplo 16. Se obtienen células estables EGR-SEAP/PC12 cultivando las células en G418 300  $\mu$ g/ml. El medio sin G418 se usa para crecimiento rutinario pero cada uno a dos meses, las células deberían volver a cultivarse en G418 300  $\mu$ g/ml durante un par de pases.

- 45 Para ensayar con respecto a actividad neuronal, se explora una placa de 10 cm con células a una confluencia de aproximadamente 70 a 80% retirando el medio viejo. Lavar las células una vez con PBS (solución salina tamponada con Fosfato). Después de privar a las células de alimento en medio de suero bajo (RPMI-1640 que contiene suero de caballo 1% y FBS 0,5% con antibióticos) durante una noche.

La siguiente mañana, retirar el medio y lavar las células con PBS. Retirar por raspado las células de la placa, suspender las células en 2 ml de medio de suero bajo. Contar el número de células y añadir más medio de suero bajo para conseguir una densidad de células final de  $5 \times 10^5$  células/ml.

- 50 Añadir 200  $\mu$ l de la suspensión celular a cada pocillo de la placa de 96 pocillos (equivalente a  $1 \times 10^5$  células/pocillo). Añadir 50  $\mu$ l de sobrenadante producido por el Ejemplo 12, 37 grados C durante 48 a 72 horas. Como control positivo, puede usarse un factor de crecimiento que se sabe que activa células PC12 a través de EGR, tal como Factor de Crecimiento Neuronal (EGF) 50 ng/ $\mu$ l. Típicamente se ve una inducción de más de cincuenta veces de SEAP en los pocillos de control positivo. Ensayar con SEAP el sobrenadante de acuerdo con el Ejemplo 22.

**Ejemplo 21****Exploración de Alto Rendimiento para Actividad de Linfocitos T**

NF-KB (Factor Nuclear KB) es un factor de transcripción activado por una amplia diversidad de agentes que incluye las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF, CD30 y CD40, linfotóxina-alfa y linfotóxina-beta, por exposición a LPS o trombina y por expresión de ciertos productos génicos virales. Como factor de transcripción, NF-KB regular la expresión de genes implicados en la activación de células inmunes, control de la apoptosis (NF-KB parece proteger a las células de la apoptosis), desarrollo de linfocitos B y T, respuestas antivirales y antimicrobianas y múltiples respuestas a estrés.

En condiciones no estimuladas, NF- KB se conserva en el citoplasma con I-KB (Inhibidor KB). Sin embargo, tras la estimulación, I- KB se fosforila y se degrada, haciendo que NF- KB se transporte al núcleo, activando de este modo la transición de genes diana. Los genes diana activados por NF- KB incluyen IL-2, IL-6, GM-CSF, ICAM-1 y MHC de clase 1.

Debido a su papel principal y capacidad para responder a una serie de estímulos, se usan construcciones informadoras que utilizan el elemento promotor de NF-KB para explorar los sobrenadantes producidos en el Ejemplo 16. Serían útiles activadores o inhibidores de NF-KB en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de enfermedades. Por ejemplo, podrían usarse inhibidores de NF-KB para tratar las enfermedades relacionadas con la activación aguda o crónica de NF-KB, tales como artritis reumatoide.

Para construir un vector que contiene el elemento promotor de NF-KB, se emplea una estrategia basada en PCR. El cebador cadena arriba contiene cuatro copias en tándem del sitio de unión a NF-KB (GGGGACTTTCCC) (SEC ID N°: 17), 18 pb de la secuencia complementaria al extremo 5' de la secuencia promotora temprana de SV40 y está flanqueado con un sitio XhoI:

**5':GCGGCCTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC  
GGGACTTTCCATCCTGCCATCTCAATTAG:3' (SEC ID N°: 18)**

El cebador cadena abajo es complementario al extremo 3' del promotor de SV40 y está flanqueado con un sitio Hind III:

**5':GCGGCAAGCTTTTTGCAAAGCCTAGGC:3' (SEC ID N°: 19)**

Se realiza amplificación por PCR usando el molde de promotor de SV40 presente en el plásmido pB-gal:promotor obtenido de Clontech. El fragmento de PCR resultante se digiere con XhoI y Hind III y se subclona en BLSK2- (Stratagene). La secuenciación con los cebadores T7 y T3 confirma que el inserto contiene la siguiente secuencia:

**5':CTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGAC  
TTTCCATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTA  
ACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCC  
GCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCC  
GCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTG  
GAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT:3' (SEC ID N°: 20)**

A continuación, reemplazar el elemento promotor mínimo de SV40 presente en el plásmido pSEAP2-promotor (Clontech) con este fragmento de NF-KB/SV40 usando XhoI y HindIII. Sin embargo, este vector no contiene un gen de resistencia a neomicina y por lo tanto no se prefiere para sistemas de expresión de mamíferos.

Para generar líneas celulares de mamífero estables, el casete NF-KB/SV40/SEAP se retira del vector anterior NF-KB/SEAP usando enzimas de restricción Sall y NotI y se inserta en un vector que contiene resistencia a neomicina. Particularmente, el casete NF-KB/SV40/SEAP se inserta en pGFP-1 (Clontech), reemplazando el gen de GFP, después de restringir pGFP-1 con Sall y NotI.

Una vez que se crea el vector NF-KB/SV40/SEAP/Neo, se crean linfocitos T Jurkat estables y se mantienen de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 18. De forma similar, el método para ensayar sobrenadantes con estos linfocitos T Jurkat estables también se describe en el Ejemplo 18. Como control positivo, se añade TNF alfa exógeno (0,1, 1, 10 ng) a los pocillos H9, H10 y H11, observándose típicamente una activación de 5-10 veces.

**Ejemplo 22****Ensayo para Actividad de SEAP**

5 Como una molécula informadora para los ensayos descritos en los Ejemplos 18-21, se ensaya la actividad de SEAP usando el Kit Tropix Phospho-light (Cat. BP-400) de acuerdo con el siguiente procedimiento general. El Kit Tropix Phospho-light proporciona los Tampones de Dilución, Ensayo y Reacción usados posteriormente.

Preparar un dispensador con el Tampón de Dilución 2,5x y distribuir 15 µl de tampón de dilución 2,5x en placas Optiplate que contienen 35 µl de un sobrenadante. Sellar las placas con un sellador plástico e incubar a 65 grados C durante 30 minutos. Separar las placas Optiplate para evitar calentamiento desigual.

10 Enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos. Vaciar el dispensador y preparar con el tampón de ensayo. Añadir 50 µl de tampón de ensayo e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Vaciar el dispensador y preparar con el tampón de reacción (véase la tabla posterior). Añadir 50 µl de tampón de reacción e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Puesto que la intensidad de la señal quimioluminiscente depende del tiempo y se tardan aproximadamente 10 minutos en leer 5 placas en el luminómetro, deberían tratarse 5 placas cada vez y comenzar el segundo conjunto 10 minutos después.

15 Leer la unidad de luz relativa en el luminómetro. Establecer H12 como el blanco e imprimir los resultados. Un aumento en quimioluminiscencia indica actividad informadora.

**Formulación de Tampón de Reacción:**

Nº de placas	Diluyente de tampón Rxn (ml)	CSPD (ml)
10	60	3
11	65	3,25
12	70	3,5
13	75	3,75
14	80	4
15	85	4,25
16	90	4,5
17	95	4,75
18	100	5
19	105	5,25
20	110	5,5
21	115	5,75
22	120	6
23	125	6,25
24	130	6,5
25	135	6,75
26	140	7
27	145	7,25
28	150	7,5
29	155	7,75
30	160	8



Nº de placas	Diluyente de tampón Rxn (ml)	CSPD (ml)
31	165	8,25
32	170	8,5
33	175	8,75
34	180	9
35	185	9,25
36	190	9,5
37	195	9,75
38	200	10
39	205	10,25
40	210	10,5
41	215	10,75
42	220	11
43	225	11,25
44	230	11,5
45	235	11,75
46	240	12
47	245	12,25
48	250	12,5
49	255	12,75
50	260	13

**Ejemplo 23****Ensayo de Exploración de Alto Rendimiento que Identifica Cambios en Concentración de Moléculas Pequeñas y Permeabilidad de Membrana**

- 5 Se sabe que la unión de un ligando con un receptor altera los niveles intracelulares de moléculas pequeñas, tales como calcio, potasio, sodio y el pH, así como altera el potencial de membrana. Estas alteraciones pueden medirse en un ensayo para identificar sobrenadantes que se unen a receptores de una célula particular. Aunque el siguiente protocolo describe un ensayo para calcio, este protocolo puede modificarse fácilmente para detectar cambios en potasio, sodio, pH, potencial de membrana o cualquier otra molécula pequeña que sea detectable por una sonda fluorescente.

10 El siguiente ensayo usa Lector de Placas de Formación de Imágenes Fluorométricas ("FLIPR") para medir cambios en moléculas fluorescentes (Molecular Probes) que se unen a moléculas pequeñas. Claramente, cualquier molécula fluorescente que detecte una molécula pequeña puede usarse en lugar de la molécula fluorescente de calcio, fluo-4 (Molecular Probes, Inc.; catálogo Nº F-14202), usada en la presente memoria.

- 15 Para células adherentes, sembrar las células a 10.000-20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos negra Costar con fondo transparente. La placa se incuba en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 20 horas. Las células adherentes se lavan dos veces en lavador Biotek con 200 µl de HBSS (Solución Salina Equilibrada de Hank) dejando 100 µl del tampón después del lavado final.

- 20 Se prepara una solución madre de fluo-4 1 mg/ml en DMSO de ácido plurónico 10%. Para recargar las células con fluo-4, se añaden 50 µl de fluo-4 12 µg/ml a cada pocillo. La placa se incuba a 37 grados C en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 60 minutos. La placa se lava cuatro veces en el lavador Biotek con HBSS dejando 100 µl de tampón.

Para células no adherentes, las células se centrifugan a partir de medio de cultivo. Las células se resuspenden a  $2 \times 10^6$  células/ml con HBSS en un tubo cónico de 50 ml. Se añaden 4  $\mu$ l de solución de fluo-4 1 mg/ml en DMSO de ácido plurónico 10% a cada ml de suspensión celular. El tubo se coloca después en un baño de agua a 37 grados C durante 30-60 minutos. Las células se lavan dos veces con HBSS, se resuspenden a  $1 \times 10^6$  células/ml y se distribuyen en una microplaca, 100  $\mu$ l/pocillo. La placa se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. La placa se lava una vez después en Lavado Celular de Denley con 200  $\mu$ l, seguido de una etapa de aspiración hasta un volumen final de 100  $\mu$ l.

Para un ensayo no basado en células, cada pocillo contiene una molécula fluorescente, tal como fluo-4. El sobrenadante se añade al pocillo y se detecta un cambio en la fluorescencia.

Para medir la fluorescencia de calcio intracelular, se ajusta el FLIPR para los siguientes parámetros: (1) La ganancia del sistema es 300-800 mW; (2) El tiempo de exposición es 0,4 segundos; (3) Cámara F/parada es F/2; (4) La excitación es 488 nm; (5) La emisión es 530 nm; y (6) La adición de muestra es 50  $\mu$ l. Un aumento de emisión a 530 nm indica un acontecimiento de señalización extracelular causado por una molécula, tal como Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), o un ligando del mismo, o una molécula inducida por Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), que ha dado como resultado un aumento en la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular.

#### **Ejemplo 24**

##### **Ensayo de Exploración de Alto Rendimiento que Identifica Actividad de Tirosina Quinasa**

Las Proteínas Tirosina Quinasas (PTK) representan un grupo diverso de quinasas transmembranas y citoplásmicas. Dentro del grupo de Proteína de Tirosina Quinasa Receptora (RPTK) hay receptores para una serie de factores de crecimiento metabólicos y mitógenos incluyendo las subfamilias del receptor de insulina y PDGF, FGF, EGF, NGF, HGF. Además, existe una gran familia de RPTK para las que se desconoce el ligando correspondiente. Los ligandos para RPTK incluyen principalmente proteínas pequeñas secretadas pero también proteínas de matriz extracelular y unidas a membrana.

La activación de RPTK por ligandos implica dimerización de receptor mediada por ligando, dando como resultado transfosforilación de las subunidades del receptor y activación de las tirosina quinasas citoplásmicas. Las tirosina quinasas citoplásmicas incluyen tirosina quinasa asociada a receptor de la familia src (por ejemplo, src, yes, lck, lyn, fyn) y proteína tirosina quinasa citosólica y no ligada a receptor, tal como la familia Jak, miembros de la cual median la transducción de señal desencadenada por la superfamilia de citocinas de los receptores (por ejemplo, las interleucinas, Interferones, GM-CSF y Leptina).

Debido a la amplia serie de factores conocidos capaces de estimular actividad tirosina quinasa, resulta de interés identificar si el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un ligando del mismo o una molécula inducida por Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) es capaz de activar rutas de transducción de señal de tirosina quinasa. Por lo tanto, el siguiente protocolo se diseña para identificar tales moléculas capaces de activar las rutas de transducción de señal tirosina quinasa.

Sembrar células diana (por ejemplo, queratinocitos primarios) a una densidad de aproximadamente 25.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de Exploración Silenciosa Loprodyne obtenida de Nalge Nunc (Naperville, IL). Las placas se esterilizan con dos aclarados de 30 minutos con etanol 100%, se aclaran con agua y se secan durante una noche. Algunas placas se recubren durante 2 horas con 100 ml de colágeno tipo I de uso en cultivo celular (50 mg/ml), gelatina (2%) o polilisina (50 mg/ml), todos los cuales pueden obtenerse de Sigma Chemicals (St. Louis, MO) o Matrigel 10% obtenido de Becton Dickinson (Bedford, MA), o suero de ternero, aclarado con PBS y almacenado a 4 grados C. El crecimiento celular de estas placas se ensaya sembrando 5.000 células/pocillo en medio de crecimiento y por cuantificación indirecta del número de células a través del uso de alamarBlue como se describe por el fabricante Alamar Biosciences, Inc. (Sacramento, CA) después de 48 horas. Se usan cubiertas de placas Falcon Nº 3071 de Becton Dickinson (Bedford, MA) para cubrir las Placas de Exploración Silenciosa de Loprodyne. También pueden usarse placas de cultivo celular Falcon Microtest III en algunos experimentos de proliferación.

Para preparar los extractos, se siembran células A431 en las membranas de nylon de placas de Loprodyne (20.000/200 ml/pocillo) y se cultivan durante una noche en medio completo. Las células se estabilizan por incubación en medio basal sin suero durante 24 horas. Después de 5-20 minutos de tratamiento con EGF (60 ng/ml) o 50  $\mu$ l del sobrenadante producido en el Ejemplo 16, se retira el medio y se añaden 100 ml de tampón de extracción ((HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 0,15 M, Triton X-100 1%, SDS 0,1%,  $Na_3VO_4$  2 mM,  $Na_4P_2O_7$  2 mM y un cóctel de inhibidores de proteasa (Nº 1836170) obtenidos de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) a cada pocillo y la placa se agita en un agitador rotatorio durante 5 minutos a 4°C. La placa se coloca después en un colector de transferencia de vacío y el extracto se filtra a través de los fondos de membrana de 0,45 mm de cada pocillo usando vacío doméstico. Se recogen extractos en una placa de captura/ensayo de 96 pocillos en el fondo del colector de vacío y se colocan inmediatamente en hielo. Para obtener extractos clarificados por centrifugación, el contenido de cada pocillo, después de solubilización con detergente durante 5 minutos, se retira y se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 16.000 x g.

Ensayar los extractos filtrados con respecto a niveles de actividad tirosina quinasa. Aunque se conocen muchos métodos para detectar actividad tirosina quinasa, se describe un método en la presente memoria.

Generalmente, la actividad tirosina quinasa de un sobrenadante se evalúa determinando su capacidad para fosforilar un resto de tirosina en un sustrato específico (un péptido biotinilado). Los péptidos biotinilados que pueden usarse para este propósito incluyen PSK1 (correspondiente a los aminoácidos 6-20 de la quinasa de división celular cdc2-p34) y PSK2 (correspondiente a los aminoácidos 1-17 de gastrina). Ambos péptidos son sustratos para una serie de tirosina quinasas y están disponibles de Boehringer Mannheim.

La reacción de tirosina quinasa se establece añadiendo los siguientes componentes en orden. Primero, añadir 10 µl de Péptido Biotinilado 5 µM, después 10 µl de ATP/Mg<sub>2+</sub> (ATP 5 mM/MgCl<sub>2</sub> 50 mM), después 10 µl de Tampón de Ensayo 5x (hidrocloruro de imidazol 40 mM, pH 7,3, beta-glicerofosfato 40 mM, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,5 mg/ml), después 5 µl de Vanadato Sódico (1 mM) y después 5 µl de agua. Mezclar los componentes suavemente y preincubar la mezcla de reacción a 30°C durante 2 minutos. Iniciar la reacción añadiendo 10 µl de la enzima de control o el sobrenadante filtrado.

La reacción del ensayo de tirosina quinasa se detiene después añadiendo 10 µl de EDTA 120 mM y se colocan las reacciones en hielo.

La actividad tirosina quinasa se determina transfiriendo alícuotas de 50 µl de mezcla de reacción a un módulo de placas de microtitulación (MTP) e incubando a 37 grados C durante 20 minutos. Esto permite que la placa de 96 pocillos recubierta con estreptavidina se asocie con el péptido biotinilado. Lavar el módulo de MTP con PBS 300 µl/pocillo cuatro veces. A continuación añadir 75 µl de anticuerpo anti-fosfotirosina conjuntado con peroxidasa de rábano rusticano (anti-P-Tyr-POD (0,5 u/ml)) a cada pocillo e incubar a 37 grados C durante una hora. Lavar el pocillo como anteriormente.

Después añadir 1000 µl de solución de sustrato de peroxidasa (Boehringer Mannheim) e incubar a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos (hasta 30 minutos). Medir la absorbancia de la muestra a 405 nm usando lector de ELISA. El nivel de actividad peroxidasa unida se cuantifica usando un lector de ELISA y refleja el nivel de actividad tirosina quinasa.

### **Ejemplo 25**

#### **Ensayo de Exploración de Alto Rendimiento que Identifica Actividad de Fosforilación**

Como una alternativa potencial y/o complemento para el ensayo de actividad de proteína tirosina quinasa descrito en el Ejemplo 24, también puede usarse un ensayo que detecta la activación (fosforilación) de intermediarios de transducción de señal intracelular principales. Por ejemplo, como se describe posteriormente, un ensayo particular puede detectar fosforilación de tirosina de las quinasas Erk-1 y Erk-2. Sin embargo, puede detectarse fosforilación de otras moléculas, tales como Raf, JNK, MAP p38, Map quinasa quinasa (MEK), MEK quinasa, Src, quinasa específica de Músculo (MuSK), IRAK, Tec y Janus, así como cualquier otra molécula de fosfoserina, fosfotirosina o fosfotreonina, sustituyendo estas moléculas a Erk-1 o Erk-2 en el siguiente ensayo.

Específicamente, se preparan placas de ensayo recubriendo los pocillos de una placa de ELISA de 96 pocillos con 0,1 ml de proteína G (1 µg/ml) durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Las placas se aclaran después con PBS y se bloquean con BSA/PBS 3% durante 1 hora a TA. Las placas de proteína G se tratan después con 2 anticuerpos monoclonales comerciales (100 ng/pocillo) contra Erk-1 y Erk-2 (1 hora a TA) (Santa Cruz Biotechnology). (Para detectar otras moléculas, esta etapa puede modificarse fácilmente sustituyendo un anticuerpo monoclonal que detecta cualquiera de las moléculas anteriormente descritas). Después de 3-5 aclarados con PBS, las placas se almacenan a 4 grados C hasta su uso.

Se siembran células A431 a 20.000/pocillo en una placa de filtro de Loprodyne de 96 pocillos y se cultivan durante una noche en medio de crecimiento. Las células se deprivan de alimento después durante 48 horas en medio basal (DMEM) y después se tratan con EGF (6 ng/pocillo) o 50 µl de los sobrenadantes obtenidos en el Ejemplo 16 durante 5-20 minutos. Las células se solubilizan después y se filtran los extractos directamente en la placa de ensayo.

Después de la incubación con el extracto durante 1 hora a TA, se aclaran de nuevo los pocillos. Como un control positivo, se usa una preparación comercial de MAP quinasa (10 ng/pocillo) en lugar de extracto de A431. Las placas se tratan después con un anticuerpo policlonal comercial (de conejo) (1 µg/ml) que reconoce específicamente el epítipo fosforilado de las quinasas Erk-1 y Erk-2 (1 hora a TA). Este anticuerpo se biotinila por procedimientos convencionales. El anticuerpo policlonal unido se cuantifica después por incubaciones sucesivas con Europio-estreptavidina y reactivo potenciador de fluorescencia de Europio en el instrumento DELFIA de Wallac (fluorescencia resuelta en el tiempo). Una señal fluorescente aumentada sobre el fondo indica una fosforilación por Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un ligando del mismo o una molécula inducida por Receptor de Quimiocina de proteína G.

**Ejemplo 26****Método para Determinar Alteraciones en el Gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

Se aísla ARN aislado de familias enteras o pacientes individuales que presentan un fenotipo de interés (tal como una enfermedad). Se genera después ADNc de estas muestras de ARN usando protocolos conocidos en la técnica (véase, Sambrook). El ADNc se usa después como un molde para PCR, empleando cebadores que rodean regiones de interés en SEC ID N°: 1. Las condiciones de PCR sugeridas consisten en 35 ciclos a 95 grados C durante 30 segundos; 60-120 segundos a 52-58 grados C; y 60-120 segundos a 70 grados C, usando soluciones de tampón descritas en Sidransky, D., *et al.*, Science 252: 706 (1991).

Los productos de PCR se secuencian después usando cebadores marcados en su extremo 5' con polinucleótido quinasa T4, empleando Polimerasa SequiTherm (Epicentre Technologies). Los extremos intrón-exón de exones seleccionados del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también se determinan y los productos de PCR genómicos se analizan para confirmar los resultados. Los productos de PCR que albergan mutaciones sospechosas en el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se clonan y secuencian después para validar los resultados de la secuenciación directa.

Los productos de PCR del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se clonan en vectores con cola de T como se describe en Holton, T. A. y Graham, M. W., Nucleic Acids Research, 19: 1156 (1991) y se secuencian con polimerasa T7 (United States Biochemical). Los individuos afectados se identifican por mutaciones en el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) no presentes en individuos no afectados.

También se observan reordenamientos genómicos como un método para determinar alteraciones en un gen que corresponde al Receptor de Quimiocina de proteína G. Los clones genómicos aislados de acuerdo con el Ejemplo 6 se someten a traslación por muescas con digoxigenindesoxiuridin 5'-trifosfato (Boehringer Mannheim) y se realiza FISH como se describe en Johnson, Cg. *et al.*, Methods Cell Biol. 35: 73-99 (1991). Se lleva a cabo hibridación con la sonda marcada usando un amplio exceso de ADN de cot-1 humano para hibridación específica con el locus genómico del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Los cromosomas se contratiñen con 4,6-diamino-2-fenilidol y yoduro de propidio, produciendo una combinación de bandas C y R. Se obtienen imágenes alineadas para mapeo preciso usando un conjunto de filtros de triple banda (Chroma Technology, Brattleboro, VT) en combinación con una cámara de dispositivo acoplado a carga enfriada (Photometrics, Tucson, AZ) y filtros de longitud de onda de excitación variable. (Johnson, Cv. *et al.*, Genet. Anal. Tech. Appl., 8: 75 (1991). La recogida de imágenes, análisis y mediciones de la longitud fraccional cromosómica se realizan usando el ISee Graphical Program System. (Inovision Corporation, Durham, NC.). Se identifican alteraciones cromosómicas de la región genómica del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (hibridada por la sonda) como inserciones, deleciones y translocaciones. Estas alteraciones del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se usan como un marcador de diagnóstico para una enfermedad asociada.

**Ejemplo 27****Método para Detectar Niveles Anómalos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una Muestra Biológica**

Pueden detectarse polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una muestra biológica y si se detecta un aumento o disminución del nivel del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), este polipéptido es un marcador para un fenotipo particular. Los métodos de detección son numerosos y por lo tanto, se entiende que un experto en la materia puede modificar el siguiente ensayo para ajustarse a sus necesidades particulares.

Por ejemplo, se usan ELISA de tipo sándwich de anticuerpos para detectar Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una muestra, preferiblemente una muestra biológica. Los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con anticuerpos específicos para el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) a una concentración final de 0,2 a 10 µg/ml. Los anticuerpos son monoclonales o policlonales y se producen por el método descrito en el Ejemplo 15. Los pocillos se bloquean de modo que se reduce a unión no específica del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) al pocillo.

Los pocillos recubiertos se incuban después durante > 2 horas a TA con una muestra que contiene Receptor de Quimiocina de proteína G. Preferiblemente, deberían usarse diluciones en serie de la muestra para validar los resultados. Las placas se lavan después tres veces con agua desionizada o destilada para retirar Receptor de Quimiocina de proteína G no unido.

A continuación, se añaden 50 µl de conjugado de fosfatasa alcalina de anticuerpo específico, a una concentración de 25-400 ng, y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan de nuevo tres veces con agua desionizada o destilada para retirar el conjugado no unido.

Añadir 75 µl de solución de sustrato 4-metilumbeliferil fosfato (MUP) o p-nitrofenil fosfato (NPP) a cada pocillo e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Medir la reacción por un lector de placa de microtitulación. Preparar

una curva patrón, usando diluciones en serie de una muestra control y representar la concentración del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en el eje de las X (escala logarítmica) y la fluorescencia o absorbancia en el eje de las Y (escala lineal). Interpolar la concentración del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en la muestra usando la curva patrón.

## 5 **Ejemplo 28**

### **Formulación**

La invención también proporciona métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos y/o afecciones (tales como, por ejemplo, una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos y/o afecciones descritas en la presente memoria) mediante administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un agente terapéutico. Por agente terapéutico se entiende polinucleótidos o polipéptidos de la invención (incluyendo fragmentos y variantes), agonistas o antagonistas de los mismos y/o anticuerpos para los mismos, en combinación con un tipo de vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un vehículo estéril).

El agente Terapéutico se formulará y dosificará de una manera coherente con la buena práctica médica, teniendo en consideración la condición clínica del paciente individual (especialmente los efectos secundarios del tratamiento con el agente terapéutico solo), el sitio de suministro, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los facultativos. La "cantidad eficaz" para los fines de la presente memoria se determina de este modo por tales consideraciones.

Como una proposición general, la cantidad farmacéuticamente eficaz total del agente terapéutico administrado por vía parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día del peso corporal del paciente, aunque, como se ha observado anteriormente, esto estará sujeto a descripción terapéutica. Más preferiblemente, esta dosis es de al menos 0,01 mg/kg/día y más preferiblemente para seres humanos entre aproximadamente 0,01 y 1 mg/kg/día para la hormona. Si se proporciona de forma continua, el agente terapéutico típicamente se administra a una tasa de dosis de aproximadamente 1 µg/kg/hora a aproximadamente 50 µg/kg/hora, por 1-4 inyecciones por día o por infusiones subcutáneas continuas, por ejemplo, usando una minibomba. También puede emplearse una solución de bolsa intravenosa. La longitud del tratamiento necesaria para observar cambios y el intervalo después del tratamiento para que se produzcan respuestas parece variar dependiendo del efecto deseado.

Los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como por polvos, pomadas, geles, gotas o parches transdérmicos), bucal o como una pulverización oral o nasal. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante o adyuvante de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo. El término "parenteral" como se usa en la presente memoria se refiere a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

Los agentes terapéuticos de la invención también se administran de forma adecuada por sistemas de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de agentes terapéuticos de liberación prolongada se administran por vía oral, vía rectal, vía parenteral, vía intracisternal, vía intravaginal, vía intraperitoneal, vía tópica (como por polvos, pomadas, geles, gotas o parches transdérmicos), vía bucal o como una pulverización oral o nasal. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante o adyuvante de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo. El término "parenteral" como se usa en la presente memoria se refiere a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

Los agentes terapéuticos de la invención también se administran de forma adecuada por sistemas de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de agentes terapéuticos de liberación prolongada incluyen materiales poliméricos adecuados (tales como, por ejemplo, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas), materiales hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico y derivados poco solubles (tales como, por ejemplo, una sal poco soluble).

Las matrices de liberación prolongada incluyen polilactidas (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, Biopolymers 22: 547-556 (1983)), poli (2- hidroxietil metacrilato) (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981), y Langer, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982)), etileno vinil acetato (Langer *et al.*, Igual que la referencia anterior) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988).

Los agentes terapéuticos de liberación prolongada también incluyen agentes terapéuticos atrapados en liposomas de la invención (véase generalmente, Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pág. 317 -327 y 353-365 (1989)). Los liposomas que contienen el agente terapéutico se preparan por métodos conocidos por sí mismos: documento DE 3.218.121; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 77: 4030-4034 (1980); documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641;

Solicitud de Patente Japonesa 83-118008; Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. Habitualmente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en el que el contenido lipídico es mayor de aproximadamente 30 por ciento mol. de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para el agente Terapéutico óptimo.

- 5 En una realización adicional más, los agentes terapéuticos de la invención se suministran por medio de una bomba (véase Langer, mencionado anteriormente; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald *et al.*, Surgery 88: 507 (1980); Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989)).

Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (Science 249: 1527-1533 (1990)).

- 10 Para administración parenteral, en una realización, el agente terapéutico se formula generalmente mediante su mezcla al grado deseado de pureza, en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión o emulsión) con un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que no es tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, la formulación preferiblemente no incluye agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son deletéreos para el agente terapéutico.

- 15 Generalmente, las formulaciones se preparan poniendo en contacto el agente terapéutico de forma uniforme e íntima con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos. Después, si es necesario, el producto se moldea en la formulación deseada. Preferiblemente el vehículo es un vehículo parenteral, más preferiblemente una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de tales vehículos adyuvantes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tales como aceites fijos y etil oleato también son útiles en la presente memoria, así como liposomas.

- 20 El vehículo contiene de forma adecuada cantidades menores de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Tales materiales son no tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez restos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como, albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbato, poloxámeros o PEG.

El agente terapéutico típicamente se formula en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente 1-10 mg/ml, a un pH de aproximadamente 3 a 8. Se entenderá que el uso de algunos de los excipientes, vehículos o estabilizadores anteriores dará como resultado la formación de sales polipeptídicas.

- 35 Cualquier agente farmacéutico usado para la administración terapéutica puede ser estéril. La esterilidad se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril (por ejemplo, membranas de 0,2 micrómetros). Los agentes terapéuticos generalmente se colocan en un envase que tiene un agujero de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o frasco que tiene un tapón que puede atravesarse con una aguja de inyección hipodérmica.

- 40 Los agentes terapéuticos habitualmente se almacenarán en envases unitarios o multidosis, por ejemplo, ampollas o frascos sellados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para reconstitución. Como ejemplo de una formulación liofilizada, se llenan frascos de 10 ml con 5 ml de solución terapéutica acuosa 1% (p/v) esterilizada por filtración y la mezcla resultante se liofiliza. La solución de infusión se prepara reconstituyendo el agente terapéutico liofilizado usando agua para inyección bacterioestática.

- 45 La invención también proporciona un kit o envase farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de los agentes terapéuticos de la invención. Asociado con tal recipiente o tales recipientes puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana. Además, los agentes terapéuticos pueden emplearse junto con otros compuestos terapéuticos.

- 50 Los agentes Terapéuticos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con adyuvantes. Los adyuvantes que pueden administrarse con los agentes terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, alumbre, alumbre más desoxicolato (ImmunoAg), MTP-PE (Biocine Corp.), QS21 (Genentech, Inc.), BCG y MPL. En una realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con alumbre. En otra realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con QS-21. Los adyuvantes adicionales que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, inmunomodulador lipídico de Monofosforilo, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, sales de Aluminio, MF-59 y tecnología de adyuvante Virosómico. Las vacunas que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, vacunas dirigidas hacia la protección contra SPR (sarampión, papera,

rubéola), polio, varicela, tétanos/difteria, hepatitis A, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* B, tosferina, neumonía, gripe, Enfermedad de Lyme, rotavirus, cólera, fiebre amarilla, encefalitis Japonesa, poliomyelitis, rabia, fiebre tifoidea y pertussis. Pueden administrarse combinaciones conjuntamente, por ejemplo, como una mezcla, de forma separada pero simultáneamente o a la vez; o secuencialmente. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos como una mezcla terapéutica y también procedimientos en los que los agentes combinados se administran separadamente pero simultáneamente, por ejemplo, como a través de líneas intravenosas separadas en el mismo individuo. La administración "en combinación" incluye adicionalmente la administración separada de uno de los compuestos o agentes proporcionado primero, seguido del segundo.

Los agentes terapéuticos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con los agentes terapéuticos de la invención, incluyen pero sin limitación, otros miembros de la familia de TNF, agentes quimioterapéuticos, antibióticos, antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes inmunoterapéuticos convencionales, citocinas y/o factores de crecimiento. Las combinaciones pueden administrarse conjuntamente, por ejemplo, como una mezcla, de forma separada pero simultáneamente o a la vez; o secuencialmente. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos como una mezcla terapéutica y también procedimientos en los que los agentes combinados se administran de forma separada pero simultáneamente, por ejemplo, como a través de líneas intravenosas separadas en el mismo individuo. La administración "en combinación" incluye adicionalmente la administración separada de uno de los compuestos o agentes proporcionado primero, seguido del segundo.

En una realización, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con miembros de la familia de TNF. TNF, moléculas relacionadas con TNF o de tipo TNF que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, formas solubles de TNF-alfa, linfotoxina-alfa (LT-alfa, también conocida como TNF-beta), LT-beta (encontrada en complejo heterotrimérico LT-alfa2-beta), OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF-gamma (Publicación Internacional N° WO 96/14328), AIM-I (Publicación Internacional N° No. WO 97/33899), endocina-alfa (Publicación Internacional N° WO 98/07880), TR6 (Publicación Internacional N° WO 98/30694), OPG y neutrocina-alfa (Publicación Internacional N° WO 98/18921, OX40 y factor de crecimiento neuronal (NGF) y formas solubles de Fas, CD30, CD27, CD40 y 4-1BB, TR2 (Publicación Internacional N° WO 96/34095), DR3 (Publicación Internacional N° WO 97/33904), DR4 (Publicación Internacional N° WO 98/32856), TR5 (Publicación Internacional N° WO 98/30693), TR6 (Publicación Internacional N° WO 98/30694), TR7 (Publicación Internacional N° WO 98/41629), TRANK, TR9 (Publicación Internacional N° WO 98/56892), TR10 (Publicación Internacional N° WO 98/54202), 312C2 (Publicación Internacional N° WO 98/06842) y TR12 y las formas solubles CD154, CD70 y CD153.

En ciertas realizaciones, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con agentes antirretrovirales, inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósidos/nucleótidos (NRTI), inhibidores de transcriptasa inversa no de nucleósidos (NNRTI), y/o inhibidores de proteasa (PI). Los NRTI que pueden administrarse en combinación con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, RETROVIR™ (zidovudina/AZT), VIDEX™ (didanosina/ddI), HIVID™ (zalcitabina/ddC), ZERIT™ (estavudina/d4T), EPIVIR™ (lamivudina/3TC) y COMBIVIR™ (zidovudina/lamivudina). Los NNRTI que pueden administrarse en combinación con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, VIRAMUNE™ (nevirapina), RESCRIPTOR™ (delavirdina), y SUSTIVA™ (efavirenz). Los inhibidores de proteasa que pueden administrarse en combinación con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, CRIVAN™ (indinavir), NORVIR™ (ritonavir), INVIRASE™ (saquinavir), y VIRACEPT™ (nelfinavir). En una realización específica, pueden usarse agentes antirretrovirales, inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósidos, inhibidores de transcriptasa inversa no de nucleósidos y/o inhibidores de proteasa en cualquier combinación con agentes Terapéuticos de la invención para tratar SIDA y/o prevenir o tratar infección por VIH.

Los NRTI adicionales incluyen LODENOSINE™ (F-ddA; un NRTI de adenosina estable en ácido; Triangle/Abbott; COVIRACIL™ (emtricitabina/FTC; relacionado estructuralmente con lamivudina (3TC) pero con una actividad de 3 a 10 veces mayor *in vitro*; Triangle/ Abbott); dOTC (BCH-10652, también relacionada estructuralmente con lamivudina pero que conserva actividad frente a una proporción sustancial de aislados resistentes a lamivudina; Biochem Pharma); Adefovir (aprobación rechazada para terapia anti-VIH por la FDA; Gilead Sciences); PREVEON® (Adefovir Dipivoxil, el profármaco activo de adefovir; su forma activa es PMEAPp); TENOFOVIR™ (bis-POC PMPA, un fármaco de PMPA; Gilead); DAPD/DXG (metabolito activo de DAPD; Triangle/Abbott); D-D4FC (relacionado con 3TC, con actividad contra virus resistente a AZT/3TC); GW420867X (Glaxo Wellcome); ZIAGEN™ (abacavir/159U89; Glaxo Wellcome Inc.); CS-87 (3'-azido-2',3'-didesoxiuridina; documento WO 99/66936); y formas farmacológicas que portan S-acil-2-tioetilo (SATE) de  $\beta$ -L-FD4C y  $\beta$ -L-FddC (documento WO 98/17281).

Los NNRTI adicionales incluyen COACTINON™ (Emivirina/MKC-442, NNRTI potente de la clase HEPT; Triangle/ Abbott); CAPRAVIRINE™ (AG-1549/S-1153, un NNRTI de la siguiente generación con actividad contra virus que contienen la mutación K103N; Agouron); PNU-142721 (tiene actividad de 20 a 50 veces mayor que su predecesor delavirdina y es activo contra mutantes K103N; Pharmacia & Upjohn); DPC-961 y DPC-963 (derivados de segunda generación de efavirenz, diseñados para ser activos contra virus con la mutación K103N; DuPont); GW-420867X (tiene actividad 25 veces mayor que HBY097 y es activo contra mutantes K103N; Glaxo Wellcome); CALANOLIDE A (agente de origen natural del árbol de látex; activo contra virus que contienen una de las mutaciones Y181C y K103N o ambas); y Propolis (documento WO 99/49830).

Los inhibidores de proteasa adicionales incluyen LOPINAVIR™ (ABT378/r; Abbott Laboratories); BMS-232632 (un azapéptido; Bristol-Myers Squibb); TIPRANAVIR™ (PNU-140690, una dihidropirona no peptídica; Pharmacia & Upjohn); PD-178390 (una dihidropirona no peptídica; Parke-Davis); BMS 232632 (un azapéptido; Bristol-Myers Squibb); L-756.423 (un análogo de indinavir; Merck); DMP-450 (un compuesto de urea cíclico; Avid & DuPont); AG-1776 (un peptidomimético con actividad *in vitro* contra virus resistentes a inhibidor de proteasa; Agouron); VX-175/GW-433908 (profármaco de fosfato de amprenavir; Vertex & Glaxo Wellcome); CGP61755 (Ciba); y AGENERASE™ (amprenavir; Glaxo Wellcome Inc.).

Los agentes antiretrovirales adicionales incluyen inhibidores de fusión/agentes de unión de gp41. Los inhibidores de fusión/agentes de unión de gp41 incluyen T-20 (un péptido de los restos 643-678 del ectodominio de proteína transmembrana gp41 de VIH que se une a gp41 en su estado en reposo y evita la transformación al estado fusogénico; Trimeris) y T-1249 (un inhibidor de fusión de segunda generación; Trimeris).

Los agentes antiretrovirales adicionales incluyen inhibidores de fusión/antagonistas del receptor de quimiocina. Los inhibidores de fusión/antagonistas del receptor de quimiocina incluyen antagonistas de CXCR4 tales como AMD 3100 (un biciclám), SDF-1 y sus análogos y ALX40-4C (un péptido catiónico), T22 (un péptido de 18 aminoácidos; Trimeris) y los análogos de T22 T134 y T140; antagonistas de CCR5 tales como RANTES (9-68), AOP-RANTES, NNY-RANTES y TAK-779; y antagonistas de CCR5/CXCR4 tales como NSC 651016 (un análogos de distamicina). También se incluyen antagonistas de CCR2B, CCR3 y CCR6. Los agonistas del receptor de quimiocina tales como RANTES, SDF-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , etc., también pueden inhibir fusión.

Los agentes antirretrovirales adicionales incluyen inhibidores de integrasa. Los inhibidores de integrasa incluyen ácidos dicafeoilquinícos (DFQA); ácido L-chicórico (un ácido dicafeoiltartárico (DCTA); quinalizarin (QLC) y antraquinonas relacionadas; ZINTEVIR™ (AR 177, un oligonucleótido que probablemente actúa en la superficie celular en lugar de ser un verdadero inhibidor de integrasa; Arondex); y naftoles tales como los descritos en el documento WO 98/50347.

Los agentes antiretrovirales adicionales incluyen compuestos de tipo hidroxurea tales como BCX-34 (un inhibidor de fosforilasa de nucleósido de purina; Biocryst); inhibidores de ribonucleótido reductasa, tales como DIDOX™ (Molecules for Health); inhibidores de inosin monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) tales como VX-497 (Vertex); y ácidos mivofólicos tales como CellCept (mofetilo de micofenolato; Roche).

Los agentes antiretrovirales adicionales incluyen inhibidores de integrasa viral, inhibidores de translocación nuclear genómica viral tales como compuestos de arileno bis(metilcetona); inhibidores de entrada de VIH tales como proteína de fusión AOP-RANTES, NNY-RANTES, RANTES-IgG, complejos solubles de RANTES y glucosaminoglucanos (GAG) y AMD-3100; inhibidores de dedos de cinc de núcleo-cápsida tales como compuestos de ditiano; dianas de VIH Tat y Rev; y farmacopotenciadores tales como ABT-378.

Otras terapias antiretrovirales y terapias adjuntas incluyen citocinas y linfocinas tales como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , IL-2, PROLEUKIN™ (aldesleukina/L2-7001; Chiron), IL-4, IL-10, IL-12, e IL-13; interferones tales como IFN- $\alpha$ 2a; antagonistas de TNF, NF $\kappa$ B, GM-CSF, M-CSF e IL-10; agentes que modulan la activación inmune tales como ciclosporina y prednisona; vacunas tales como Remune™ (Inmunógeno de VIH), APL 400-003 (Apollon), fragmentos y gp120 recombinante, glucoproteína de la envoltura recombinante bivalente (B/E), rgp120CM235, MN rgp120, SF-2 rgp120, complejo de CD4 soluble/gp120, proteína Delta JR-FL, péptido sintético ramificado derivado de dominio C3/C4 de gp120 discontinuo, inmunógenos competentes para fusión y vacunas de Gag, Pol, Nef y Tat; terapias basadas en gen tales como elementos supresores genéticos (GSE; documento WO 98/54366) e intracinas (quimiocinas CC modificada genéticamente dirigidas al RE para bloquear expresión en superficie de CCR5 de nueva síntesis (Yang *et al.*, PNAS 94: 11567-72 (1997); Chen *et al.*, Nat. Med. 3: 1110-16 (1997)); anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-CXCR4 tales como el anticuerpo anti-CXCR4 12G5, anticuerpos anti-CCR5 tales como los anticuerpos anti-CCR5 2D7, 5C7, PA8, PA9, PA10, PA11, PA12 y PA14, anticuerpos anti-CD4 tales como los anticuerpos anti-CD4 Q4120 y RPA-T4, anticuerpos anti-CCR3 tales como el anticuerpo anti-CCR3 7B11, anticuerpos anti-gp120 tales como los anticuerpos anti-gp120 17b, 48d, 447-52D, 257-D, 268-D y 50.1, anticuerpos anti-Tat, anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  y anticuerpo monoclonal 33A); agonistas y antagonistas del receptor de hidrocarburo de arilo (AH) tales como TCDD, 3,3',4,4',5-pentaclorobifenil, 3,3',4,4'-tetraclorobifenil y  $\alpha$ -naftoflavona (documento WO 98/30213); y antioxidantes tales como  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteína etil éster ( $\gamma$ -GCE; documento WO 99/56764).

Los agentes adicionales que pueden usarse con agentes Terapéuticos de la presente invención con o sin los agentes anteriores incluyen agentes anti-linfoproliferativos tales como ácido transretinoico (trans-RA), IFN- $\gamma$ , EPOCH y Cidofovir; los inhibidores de angiogénesis tales como talidomida; agentes quimioterapéuticos citostáticos tales como hidroxurea; agentes antiinfecciosos tales como Rifabutina, Isoniazida y Rifampina; y agentes antidemencia tales como LU 02-584 (CPI-1189; Centuar Pharmaceuticals Inc.).

Las dosificaciones de estos diversos agentes se conocen en la técnica y pueden hallarse, por ejemplo, en The Physician's Desk Reference y en la bibliografía científica.

El virus muta muy rápidamente debido a una transcriptasa inversa (RT) propensa a errores, desarrollando de este



modo resistencia a múltiples agentes Terapéuticos. Al dirigirse a múltiples puntos en la ruta viral (RT, proteasa, entrada viral y neutralización viral) usando terapia de combinación, la tasa de mutación debería contrarrestarse eficazmente. De este modo, los agentes Terapéuticos de la invención pueden usarse con combinaciones de agentes antiretrovirales, incluyendo combinaciones de dos fármacos, tres fármacos, cuatro fármacos, cinco fármacos, seis fármacos, siete fármacos, ocho fármacos, nueve fármacos y mayores. Tales combinaciones de agentes antiretrovirales pueden denominarse en la bibliografía terapia antirretroviral activa (ART), terapia antirretroviral altamente activa (HAART), HAART continua, HAART intermitente, "mega" HAART (más de 4, 5, 6, 7 u 8 y preferiblemente más de 9 agentes), terapia de multi-fármaco de dosis alta intensiva, intensificación de tratamiento temprano (ETI), terapia asistida máxima (MAT), terapia autoadministrada (SAT), IL-2 humana recombinante subcutánea en pacientes infectados con VIH con cuentas de CD4+ bajas en terapia antirretroviral activa (SILCAAT) y terapia de mantenimiento. Preferiblemente, los agentes Terapéuticos de la invención se usan en combinación con terapia antirretroviral altamente activa. Los agentes Terapéuticos de la invención también pueden usarse en combinación con agentes adjuntos, tales como los descritos anteriormente en la presente memoria y de otro modo y los que se conocen bien en la técnica, solos o junto con agentes antirretrovirales.

Cuando se combinan agentes Terapéuticos de la invención con cualquiera de los agentes anteriores o combinaciones de agentes, las dosis se ajustan según sea necesario. Los NRTI generalmente no requieren ajustes de dosis cuando se combinan, pero los NRTI y PI pueden afectar a sus niveles y potencias respectivas. Las directrices para tales ajustes de dosis y para inicio, continuación, tratamiento, alteración y mantenimiento de terapia antirretroviral en general se conocen bien por los facultativos y están fácilmente disponibles en, por ejemplo, Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents In HIV-Infected Adults and Adolescents, Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection, Dept. Health and Human Services y Henry J. Kaiser Foundation, 28 de enero del 2000, y <<<http://www.hivatis.org>>> y otra bibliografía científica.

En otras realizaciones, los agentes Terapéuticos de la invención pueden administrarse en combinación con agentes anti-infección oportunista. Los agentes anti-oportunistas que pueden administrarse en combinación con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, TRIMETHOPRIM-SULPAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™, ATOVAQUONE™, ISONIAZID™, RIFAMPIN™, PYRAZINAMIDE™, ETHAMBUTOL™, RIFABUTIN™, CLARITHROMYCIN™, AZITHROMYCIN™, GANCICLOVIR™, FOSCARNET™, CIDOFOVIR™, FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™, KETOCONAZOLE™, ACYCLOVIR™, FAMCICOLVIR™, PYRIMETHAMINE™, LEUCOVORIN™, NEUPO-GEN™ (filgrastim/G-CSF) y LEUKINE™ (sargramostim/GM-CSF). En una realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se usan en cualquier combinación con TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™, y/o ATOVAQUONE™ para tratar de forma profiláctica o prevenir una infección de neumonía por *Pneumocystis carinii* oportunista. En otra realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se usan en cualquier combinación con ISONIAZID™, RIFAMPIN™, PYRAZINAMIDE™, y/o ETHAMBLTOL™ para tratar de forma profiláctica o prevenir una infección compleja por *Mycobacterium avium* oportunista. En otra realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se usan en cualquier combinación con GANCICLOVIR™, FOSCARNET™ y/o CIDOFOVIR™ para tratar de forma profiláctica o prevenir una infección por citomegalovirus oportunista. En otra realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se usan en cualquier combinación con FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™ y/o KETOCONAZOLE™ para tratar de forma profiláctica o prevenir una infección fúngica oportunista. En otra realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se usan en cualquier combinación con ACYCLOVIR™ y/o FAMCICOLVIR™ para tratar de forma profiláctica o prevenir una infección por virus de herpes simple tipo I y/o tipo II oportunista. En otra realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se usan en cualquier combinación con PYRIMETHAMINE™ y/o LEUCOVORIN™ para tratar de forma profiláctica o prevenir una infección por *Toxoplasma gondii* oportunista. En otra realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se usan en cualquier combinación con LEUCOVORIN™ y/o NEUPOGEN™ para tratar de forma profiláctica o prevenir una infección bacteriana oportunista.

En una realización adicional, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con un agente antiviral. Los agentes antivirales que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, aciclovir, ribavirina, amantadina y remantidina.

En una realización adicional, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con un agente antibiótico. Los agentes antibióticos que pueden administrarse con los agentes terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, amoxicilina, beta-lactamasas, aminoglucósidos, beta-lactama (glucopéptido), beta-lactamasas, Clindamicina, cloranfenicol, cefalosporinas, ciprofloxacina, ciprofloxacina, eritromicina, fluoroquinolonas, macrólidos, metronidazol, penicilinas, quinolonas, rifampina, estreptomina, sulfonamida, tetraciclinas, trimetoprim, trimetoprim-sulfamtozaxol y vancomicina.

Los agentes inmunosupresores no específicos convencionales que pueden administrarse en combinación con los agentes terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, esteroides, ciclosporina, análogos de ciclosporina, ciclofosfamida, metilprednisona, prednisona, azatioprina, FK-506, 15-desoxispergualina y otros agentes inmunosupresores que actúan suprimiendo la función de linfocitos T de respuesta.

En realizaciones específicas, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con inmunosupresores. Las preparaciones inmunosupresoras que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, ORTHOCLONE™ (OKT3), SANDIMMUNE™/NEORAL™/SANGDYA™ (ciclosporina), PROGRAF™ (tacrolimus), CELLCEPT™ (micofenolato), Azatioprina, glucocorticosteroides y RAPAMUNE™ (sirolimus). En una realización específica, los inmunosupresores pueden usarse para prevenir el rechazo de trasplante de órganos o de médula ósea.

En una realización adicional, los agentes Terapéuticos de la invención se administran solos o en combinación con una o más preparaciones de inmunoglobulina intravenosas. Las preparaciones de inmunoglobulina intravenosas que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, GAMMAR™, IVEEGAM™, SANDOGLOBULIN™, GAMMAGARD S/D™ y GAMIMUNE™. En una realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con preparaciones de inmunoglobulina intravenosas en terapia de trasplantes (por ejemplo, trasplante de médula ósea).

En una realización adicional, los agentes Terapéuticos de la invención se administran solos o en combinación con un agente anti-inflamatorio. Los agentes anti-inflamatorios que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, glucocorticoides y los anti-inflamatorios no esteroideos, derivados de ácido aminoarilcarboxílico, derivados de ácido arilacético, derivados de ácido arilbutírico, ácidos arilcarboxílicos, derivados de ácido arilpropiónico, pirazoles, pirazolonas, derivados de ácido salicílico, tiacincarcboxamidas, ácido e-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxibutírico, amixetrina, bendazac, bencidamina, bucolome, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, nimesulide, orgoteína, oxaceprol, parnilina, perisoxal, pifoxime, procazona, proxazol y tenidap.

En otra realización, las composiciones de la invención se administran en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que pueden administrarse con los agentes terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, derivados de antibióticos (por ejemplo, doxorubicina, bleomicina, daunorrubicina y dactinomicina); antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno); antimetabolitos (por ejemplo, fluorouracilo, 5-FU, metotrexato, floxuridina, interferón alfa-2b, ácido glutámico, plicamicina, mercaptopurina y 6-tioguanina); agentes citotóxicos (por ejemplo, carmustina, BCNU, lomustina, CCNU, citosina arabinósido, ciclofosfamida, estramustina, hidroxiaurea, procarbina, mitomicina, busulfan, cisplatino y sulfato de vincristina); hormonas (por ejemplo, medroxiprogesterona, fosfato sódico de estramustina, etinilestradiol, estradiol, acetato de megestrol, metiltestosterona, dietilestilbestrol difosfato, clorotrianiseno y testolactona); derivados de mostaza de nitrógeno (por ejemplo, mefalen, clorambucilo, mecloretamina (mostaza de nitrógeno) y tiotepa); esteroides y combinaciones (por ejemplo, fosfato sódico de betametasona); y otros (por ejemplo, dicarbina, asparaginasa, mitotano, sulfato de vincristina, sulfato de vinblastina y etopósido).

En una realización específica, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) o cualquier combinación de los componentes de CHOP. En otra realización, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con Rituximab. En una realización adicional, los agentes terapéuticos de la invención se administran con Rituximab y CHOP, o Rituximab y cualquier combinación de los componentes de CHOP.

En una realización adicional, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con citocinas. Las citocinas que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, anti-CD40, CD40L, IFN-gamma y TNF-alfa. En otra realización, los agentes Terapéuticos de la invención pueden administrarse con cualquier interleucina, incluyendo, pero sin limitación, IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20 y IL-21.

En una realización adicional, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con proteínas angiogénicas. Las proteínas angiogénicas que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, Factor de Crecimiento Derivado de Glioma (GDGF), como se describe en la Patente Europea Número EP-399816; Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas A (PDGF-A), como se describe en la Patente Europea Número EP-682110; Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas B (PDGF-B), como se describe en la Patente Europea Número EP-282317; Factor de Crecimiento Placentario (P1GF), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 92/06194; Factor de Crecimiento Placentario 2 (PIGF-2), como se describe en Hauser *et al.*, Growth Factors, 4: 259-268 (1993); Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 90/13649; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A (VEGF-A), como se describe en la Patente Europea Número EP-506477; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular 2 (VEGF-2), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 96/39515; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular B (VEGF-3); Factor de Crecimiento Endotelial Vascular B-186 (VEGF-B186), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 96/26736; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular D (VEGF-D), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 98/02543; Factor de Crecimiento Endotelial Vascular D (VEGF-D), como se describe en la Publicación Internacional Número WO 98/07832; y Factor de Crecimiento Endotelial Vascular E (VEGF-E), como se describe en la Patente Alemana Número DE19639601. Las referencias anteriormente mencionadas se incorporan en la presente memoria por referencia.

En una realización adicional, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con Factor de Crecimiento hematopoyéticos. Los Factores de Crecimiento Hematopoyéticos que pueden administrarse con los agentes Terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, LEUKINE™ (SARGRAMOSTIM™) y NEUPOGEN™ (FILGRASTIM™).

- 5 En una realización adicional, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con Factores de Crecimiento de Fibroblastos. Los Factores de Crecimiento de Fibroblastos que pueden administrarse con los agentes terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitación, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14 y FGF-15.

- 10 En otras realizaciones, los agentes Terapéuticos de la invención pueden administrarse en combinación con insulina porcina o humana o mezclas de las mismas; análogos de insulina; insulina humana recombinante tal como HUMULIN™ y NOVOLIN™; agentes hipoglucémicos orales tales como ORAMIDE™ y ORINASE™ (tolbutamida), DIABINESE™ (clorpropamida), TOLAMIDE™ y TOLINASE™ (tolazamida), DYMELOS™ (acetohexamida), glibenclamida, MICRONASE™, DIBETA™ y GLYNASE™ (gliburida), GLUCOTROL™ (glipicida), y DIAMICRON™ (gliclacida), GLUCOPHAGE™ (metformina), PRECOSE™ (acarbose), AMARYL™ (glimepirida) y ciglitazona; tiiazolidinedionas (TZD) tales como rosiglitazona, AVANDIA™ (maleato de rosiglitazona) ACTOS™ (pioglitazona) y troglitazona; inhibidores de alfa-glucosidasa; glucagón bovino o porcino; somatostatinas tales como SANDOSTATIN™ (octreotida); y diazóxidos tales como PROGLYCEM™ (diazóxido). En otras realizaciones más, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con uno o más de los siguientes: un agente antidiabético de biguanida, un agente antidiabético de glitazona y un agente antidiabético de sulfonilurea.

- 20 En realizaciones adicionales, los agentes Terapéuticos de la invención se administran en combinación con otros regímenes terapéuticos o profilácticos, tales como, por ejemplo, radioterapia.

#### **Ejemplo 29**

##### **Método para el Tratamiento de Niveles Reducidos de Receptor de Quimiocina de proteína G**

- 25 La presente invención se refiere a un método para tratar a un individuo que necesite un aumento del nivel de un polipéptido de la invención en el cuerpo que comprende administrar a dicho individuo una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de la invención (incluyendo polinucleótidos de la invención). Además, se apreciará que las afecciones causadas por una disminución en el nivel de expresión convencional o normal del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un individuo pueden tratarse mediante administración de un agonista del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), preferiblemente en la forma secretada. De este modo, la invención también proporciona un método de tratamiento de un individuo que necesite
- 30 un nivel aumentado de polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende administrar a un individuo tal un agente Terapéutico que comprende una cantidad de agonista del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para aumentar el nivel de la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un individuo tal.
- 35 Por ejemplo, un paciente con niveles disminuidos de polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) recibe una dosis diaria de 0,1-100 µg/kg del agonista durante seis días consecutivos. Los detalles exactos del programa de dosificación, basándose en administración y formulación, se proporcionan en el Ejemplo 28.

#### **Ejemplo 30**

##### **Método para Tratar Niveles Aumentados del Receptor de Quimiocina de proteína G**

- 40 La presente invención también se refiere a un método para tratar a un individuo que necesite un nivel reducido de un polipéptido de la invención en el cuerpo que comprende administrar a dicho individuo una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de la invención (incluyendo polipéptidos y anticuerpos de la invención).

- 45 En un ejemplo, se usa tecnología antisentido para inhibir la producción del Receptor de Quimiocina de proteína G. Esta tecnología es un ejemplo de un método para reducir los niveles de polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), preferiblemente una forma soluble, debido a una diversidad de etiologías, tales como cáncer.

- 50 Por ejemplo, a un paciente diagnosticado con niveles aumentados de forma anómala de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se administran por vía intravenosa polinucleótidos antisentido a 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 3,0 mg/kg día durante 21 días. Este tratamiento se repite después de un periodo de descanso de 7 días si el tratamiento se toleró bien. La formulación del polinucleótido antisentido se proporciona en el Ejemplo 28.

Otros métodos para disminuir el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o para inhibir su actividad se describen en la presente memoria (tales como en el Ejemplo 57).

#### **Ejemplo 31**

##### **Método de Tratamiento Usando Terapia Génica – Ex Vivo**

Un método de terapia génica trasplanta fibroblastos, que son capaces de expresar polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) a un paciente. Generalmente, se obtienen fibroblastos de un sujeto por biopsia de la piel. El tejido resultante se coloca en medio de cultivo tisular y se separa en pequeñas partes. Pequeños trozos del tejido se sitúan en una superficie húmeda de un matraz de cultivo tisular, se sitúan aproximadamente diez partes en cada matraz. El matraz se voltea, se cierra ajustado y se deja a temperatura ambiente durante una noche. Después de 24 horas a temperatura ambiente, el matraz se invierte y los trozos de tejido permanecen fijados al fondo del matraz y se añade medio fresco (por ejemplo medio F12 de Ham, con FBS 10%, penicilina y estreptomycin). Los matraces se incuban después a 37°C durante aproximadamente una semana.

En este momento, se añade medio fresco y se cambia posteriormente cada varios días. Después de dos semana adicionales en cultivo, emerge una monocapa de fibroblastos. La monocapa se tripsiniza y se aumenta a matraces mayores.

pMV-7 (Kirschmeier, P. T. *et al.*, DNA, 7: 219-25 (1988)), flanqueado por las repeticiones terminales largas del virus del sarcoma murino de Moloney, se digiere con EcoRI y HindIII y se trata posteriormente con fosfatasa intestinal de ternero. El vector lineal se fracciona en gel de agarosa y se purifica, usando perlas de vidrio.

El ADN que codifica el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede amplificarse usando cebadores de PCR que corresponden a las secuencias de los extremos 5' y 3' respectivamente como se exponen en el Ejemplo 5. Preferiblemente, el cebador 5' contiene un sitio de EcoRI y el cebador 3' incluye un sitio de HindIII. Cantidades iguales de la cadena principal lineal del virus de sarcoma murino de Moloney y el fragmento modificado de EcoRI y HindIII se añaden juntos, en presencia de ADN ligasa T4. La mezcla resultante se mantiene en condiciones apropiadas para la ligación de los dos fragmentos. La mezcla de ligación se usa después para transformar bacterias HB101, que se siembran en placas después en agar que contiene kanamicina con el fin de confirmar que el vector contiene el Receptor de Quimiocina de proteína G insertado de forma apropiada.

Se dejan crecer las células de empaquetamiento GP+am12 o pA317 anfotrópicas en cultivo tisular hasta densidad de confluencia en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con suero de ternero 10% (CS), penicilina y estreptomycin. El vector de MSV que contiene el gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se añade después al medio y las células de empaquetamiento se transducen con el vector. Las células de empaquetamiento producen ahora partículas virales infecciosas que contienen el gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (las células de empaquetamiento se denominan ahora células productoras).

Se añade medio fresco a las células productoras transducidas y, posteriormente, el medio se recolecta de una placa de 10 cm de células productoras en confluencia. El medio empleado, que contiene las partículas virales infecciosas, se filtra a través de un filtro de membrana para retirar células productoras separadas y este medio se usa después para infectar células fibroblásticas. El medio se retira de una placa subconfluente de fibroblastos y se reemplaza rápidamente con el medio de las células productoras. Este medio se retira y se reemplaza con medio fresco. Si la titulación del virus es alta, entonces virtualmente todos los fibroblastos estarán infectados y no se necesita selección. Si la titulación es muy baja, entonces es necesario usar un vector retroviral que tiene un marcador seleccionable, tal como neo o his. Una vez que los fibroblastos se han infectado de forma eficaz, los fibroblastos se analizan para determinar si se produce proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Los fibroblastos modificados por ingeniería genética se trasplantan después en el hospedador, solos o después de haberse cultivado hasta la confluencia en perlas microvehículo citodex 3.

## **Ejemplo 32**

### **Terapia Génica Usando Gen del Receptor de Quimiocina de proteína G Endógeno (CCR5)**

Otro método de terapia génica de acuerdo con la presente invención implica asociar de forma operativa la secuencia del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) endógena con un promotor mediante recombinación homóloga como se ha descrito, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.641.670, expedida el 24 de junio de 1997; Publicación Internacional N° WO 96/29411, publicada el 26 de septiembre de 1996; Publicación Internacional N° WO 94/12650, publicada el 4 de agosto de 1994; Koller *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); y Zijlstra *et al.*, Nature 342: 435-438 (1989). Este método implica la activación de un gen que está presente en las células diana, pero que no se expresa en las células o se expresa a un nivel menor del deseado.

Se preparan construcciones polinucleotídicas que contienen un promotor y secuencias de dirección, que son homólogas a la secuencia no codificante 5' del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) endógeno, que flanquean el promotor. La secuencia de dirección estará suficientemente cerca del extremo 5' del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de modo que el promotor estará unido operativamente a la secuencia endógena tras la recombinación homóloga. El promotor y las secuencias de dirección pueden amplificarse usando PCR. Preferiblemente, el promotor amplificado contiene sitios de enzima de restricción específicos en los extremos 5' y 3'. Preferiblemente, el extremo 3' de la primera secuencia de dirección contiene el mismo sitio de enzima de restricción que el extremo 5' del promotor amplificado y el extremo 5' de la segunda secuencia de dirección contiene el mismo sitio de restricción que el extremo 3' del promotor amplificado.

El promotor amplificado y las secuencias de dirección amplificadas se digieren con las enzimas de restricción apropiadas y se tratan posteriormente con fosfatasa intestinal de ternero. El promotor digerido y las secuencias de dirección digeridas se añaden juntas en presencia de ADN ligasa T4. La mezcla resultante se mantiene en condiciones apropiadas para la ligación de los dos fragmentos. La construcción se fracciona por tamaño en un gel de agarosa y después se purifica por extracción de fenol y precipitación de etanol.

En este Ejemplo, las construcciones polinucleótidas se administran como polinucleótidos desnudos mediante electroporación. Sin embargo, las construcciones polinucleótidas también pueden administrarse con agentes facilitadores de la transfección, tales como liposomas, secuencias virales, partículas virales, agentes de precipitación, etc. Tales métodos de suministro se conocen en la técnica.

Una vez que las células se transfectan, tendrá lugar recombinación homóloga que dará como resultado que el promotor se una operativamente a la secuencia del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) endógena. Esto da como resultado la expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en la célula. La expresión puede detectarse por tinción inmunológica o cualquier otro método conocido en la técnica.

Se obtienen fibroblastos de un sujeto mediante biopsia de piel. El tejido resultante se coloca en DMEM + suero de ternero fetal 10%. Los fibroblastos en crecimiento exponencial o en fase estacionaria temprana se tripsinizan y se aclaran de la superficie plástica con medio nutriente. Una alícuota de la suspensión celular se retira para conteo y las células restantes se someten a centrifugación. El sobrenadante se aspira y el sedimento se resuspende en 5 ml de tampón de electroporación (HEPES 20mM pH 7,3, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 0,7 mM, dextrosa 6 mM). Las células se recentrifugan, se aspira el sobrenadante y las células se resuspenden en tampón de electroporación que contiene albúmina de suero bovino acetilada 1 mg/ml. La suspensión celular final contiene aproximadamente 3X10<sup>6</sup> células/ml. La electroporación debería realizarse inmediatamente después de resuspensión.

Se prepara ADN plasmídico de acuerdo con técnicas convencionales. Por ejemplo, para construir un plásmido para dirigir al locus del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), se digiere plásmido pUC18 (MBI Fermentas, Amherst, NY) con HindIII. El promotor CMV se amplifica mediante PCR con un sitio de XbaI en el extremo 5' y un sitio de BamHI en el extremo 3'. Se amplifican dos secuencias no codificantes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mediante PCR: una secuencia no codificante del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (fragmento de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) 1) se amplifica con un sitio HindIII en el extremo 5' y un sitio XbaI en el extremo 3'; la otra secuencia no codificante del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (fragmento del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) 2) se amplifica con un sitio BamHI en el extremo 5' y un sitio Hind III en el extremo 3'. El promotor de CMV y fragmentos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (1 y 2) se digieren con las enzimas apropiadas (promotor de CMV - XbaI y BamHI; fragmentos de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) 1 - XbaI; fragmentos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) 2 - BamHI) y se ligan juntos. El producto de ligación resultante se digiere con HindIII y se ligan con el plásmido pUC18 digerido con HindIII.

Se añade ADN plasmídico a una cubeta estéril con un hueco entre electrodos de 0,4 cm (Bio-Rad). La concentración de ADN final es generalmente al menos 120 µg/ml. Se añaden después 0,5 ml de la suspensión celular (que contiene aproximadamente 1,5X10<sup>6</sup> células) a la cubeta y la suspensión celular y las soluciones de ADN se mezclan suavemente. Se realiza electroporación con un aparato Gene-Pulser (Bio-Rad). La capacitación y la tensión se ajustan a 960 µF y 250-300 V, respectivamente. A medida que aumenta la tensión, disminuye la supervivencia celular, pero el porcentaje de células sobrevivientes que incorporan de forma estable el ADN introducido en el genoma aumenta dramáticamente. Dados estos parámetros, debería observarse un tiempo de pulso de aproximadamente 14-20 ms.

Las células electroporadas se mantienen a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos y los contenidos de la cubeta se retiran suavemente después con una pipeta de transferencia estéril. Las células se añaden directamente a 10 ml de medio nutriente precalentado (DMEM con suero de ternero 15%) en una placa de 10 cm y se incuban a 37 grados C. Al día siguiente, el medio se aspira y se reemplaza con 10 ml de medio fresco y se incuba durante 16-24 horas adicionales.

Los fibroblastos modificados por ingeniería genética se inyectan después en el hospedador, solos o después de haberse cultivado hasta confluencia en perlas microvehículo citodex 3. Los fibroblastos ahora producen el producto proteico. Los fibroblastos pueden introducirse después en un paciente como se ha descrito anteriormente.

### **Ejemplo33**

#### **Método de Tratamiento Usando Terapia Génica - In Vivo**

También se describe el uso de métodos de terapia génica *in vivo* para tratar enfermedades, trastornos y afecciones. El método de terapia génica se refiere a la introducción de secuencias del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de ácido nucleico desnudo (ADN, ARN y ADN o ARN antisentido) en un animal para aumentar o reducir la expresión del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). El polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede estar unido operativamente a un promotor o cualquier otro elemento genético necesario para la expresión del polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) por el tejido

diana. Dicha terapia génica y técnicas y métodos de suministro se conocen en la materia, véase, por ejemplo, documentos WO90/11092, WO98/11779; Patente de Estados Unidos Nº 5693622, 5705151, 5580859; Tabata H. *et al.* (1997) Cardiovasc. Res. 35(3): 470-479, Chao J *et al.* (1997) Pharmacol. Res. 35(6): 517-522, Wolff J. A. (1997) Neuromuscul. Disord. 7(5): 314-318, Schwartz B. *et al.* (1996) Gene Ther. 3(5): 405-411, Tsurumi Y. *et al.* (1996) Circulation 94(12): 3281-3290 (incorporadas en la presente memoria por referencia).

Las construcciones del polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden suministrarse por cualquier método que suministre materiales inyectables a las células de un animal, tal como inyección en el espacio intersticial de tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, intestino y similares). Las construcciones polinucleótidas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden suministrarse en un vehículo líquido o acuosos farmacéuticamente aceptable.

La expresión polinucleótido, ADN o ARN "desnudo" se refiere a secuencias que están sin ningún vehículo de suministro que actúe para asistir, promover o facilitar la entrada en la células, incluyendo secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes de precipitación y similares. Sin embargo, los polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden también suministrarse en formulaciones de liposoma (tales como las enseñadas en Felgner P. L. *et al.* (1995) Ann. NY Acad. Sci. 772: 126-139 y Abdallah B. *et al.* (1995) Biol. Cell 85(1): 1-7) que pueden prepararse por métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

Las construcciones de vector de polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) usadas en el método de terapia génica son preferiblemente construcciones que no se integrarán en el genoma del hospedador ni contendrán secuencias que permitan replicación. Cualquier promotor fuerte conocido por los expertos en la materia puede usarse para conducir la expresión del ADN. A diferencia de otras terapias génicas, una ventaja principal de introducir secuencias de ácido nucleico desnudo en células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis de polinucleótidos en las células. Los estudios han mostrado que pueden introducirse secuencias de ADN no replicante en células para proporcionar producción del polipéptido deseado durante periodos de hasta seis meses.

La construcción polinucleotídica del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede suministrarse al espacio intersticial de tejidos dentro del animal, incluyendo de músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículo, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándula y tejido conectivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende el fluido intercelular, matriz de mucopolisacáridos entre las fibras reticulares de los tejidos de órganos, fibras elásticas en las paredes de vasos o cámaras, fibras de colágeno de tejidos fibrosos o esa la misma matriz dentro de tejido conectivo que envuelve células musculares o en las lagunas del hueso. Es de forma similar el espacio ocupado por el plasma de la circulación y el fluido linfático de los canales linfáticos. El suministro al espacio intersticial de tejido muscular se prefiere por las razones analizadas posteriormente. Pueden suministrarse convenientemente por inyección en los tejidos que comprenden estas células. Preferentemente se suministran y se expresan en células persistentes no en división que están diferenciadas aunque el suministro y expresión puede conseguirse en células no diferenciadas o menos diferenciadas completamente, tales como, por ejemplo, células madre de sangre o fibroblastos de la piel. Las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad para captar y expresar polinucleótidos.

Para la inyección de polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) desnudo, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN está en el intervalo de aproximadamente 0,05 g/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Preferiblemente la dosificación será de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg y más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. Por supuesto, como el experto habitual en la materia apreciará, esta dosificación variará de acuerdo con el sitio tisular de la inyección. La dosificación apropiada y eficaz de la secuencia de ácido nucleico puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia y puede depender de la afección a tratar y la vía de administración. La vía preferida de administración es por la vía parenteral de inyección en el espacio intersticial de tejidos. Sin embargo, también pueden usarse otras vías parenterales, tales como, inhalación de una formulación de aerosol particularmente para suministro a los pulmones o tejidos bronquiales, garganta o membranas mucosas de la nariz. Además, las construcciones del polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) desnudas pueden suministrarse a arterias durante angioplastia por el catéter usado en el procedimiento.

Los efectos de respuesta a dosis del polinucleótido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) inyectado en músculo *in vivo* se determina como sigue. El ADN molde del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) adecuado para la producción de ARNm que codifica el polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se prepara de acuerdo con una metodología de ADN recombinante convencional. El ADN molde, que puede ser circular o lineal, se usa como ADN desnudo o formando complejo con liposomas. Los músculos del cuádriceps de ratones se inyectan después con diversas cantidades del ADN molde.

Se anestesian ratones macho y hembra Balb/C de cinco a seis semanas de edad por inyección intraperitoneal con 0,3 ml de Avertin 2,5%. Se realiza una incisión de 1,5 cm en el muslo anterior y se visualiza directamente el músculo cuádriceps. El ADN molde del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se inyecta en 0,1 ml de vehículo en una jeringa de 1 cc a través de una aguja de calibre 27 durante un minuto, aproximadamente a 0,5 cm del sitio de inserción distal del músculo en la rodilla y aproximadamente a 0,2 cm de profundidad. Se situaron suturas sobre el

sitio de inyección para localización futura y la piel se cierra con grapas de acero inoxidable.

Después de un tiempo de incubación apropiado (por ejemplo, 7 días) se preparan extractos de músculo escindiendo el cuádriceps completo. Cada quinta sección transversal de 15 µm de los músculos cuádriceps individuales se tiñe histoquímicamente con respecto a expresión de proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Puede realizarse una secuencia temporal para expresión de proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de una manera similar excepto que los cuádriceps de diferentes ratones se recogen a diferentes tiempos. La persistencia de ADN del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en músculo después de la inyección puede determinarse por análisis de transferencia de Southern después de preparar sobrenadantes de HIRT y ADN celular total de ratones inyectados y de control. Los resultados de la experimentación anterior en ratones pueden usarse para extrapolar dosificaciones apropiadas y otros parámetros de tratamiento en seres humanos y otros animales usando ADN desnudo del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 34**

##### **Animales Transgénicos para el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

Los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) también pueden expresarse en animales transgénicos. Los animales de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitación, ratones, ratas, conejos, hámsteres, cobayas, cerdos, cerdos miniaturizados, cabras, ovejas, vacas y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés pueden usarse para generar animales transgénicos. Las técnicas descritas en la presente memoria o conocidas de otra manera en la materia, se usan para expresar polipéptidos de la invención en seres humanos, como parte de un protocolo de terapia génica.

Puede usarse cualquier técnica conocida en la materia para introducir el transgén (es decir, polinucleótidos de la invención) en animales para producir las líneas fundadoras de animales transgénicos. Tales técnicas incluyen, pero sin limitación, microinyección pronuclear (Paterson *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 691-698 (1994); Carver *et al.*, Biotechnology (NY) 11: 1263-1270 (1993); Wright *et al.*, Biotechnology (NY) 9: 830-834 (1991); y Hoppe *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 4.873.191 (1989)); transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148-6152 (1985)), blastocistos o embriones; dirección génica en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell 56: 313-321 (1989)); electroporación de células o embriones (Lo, 1983, Mol Cell. Biol. 3: 1803-1814 (1983)); introducción de los polinucleótidos usando una pistola génica (véase, por ejemplo, Ulmer *et al.*, Science 259: 1745 (1993); introducir construcciones de ácido nucleico en células madre pluripotenciales embrionarias y transferir las células madre de nuevo al blastocisto; y transferencia génica mediada por esperma (Lavitrano *et al.*, Cell 57: 717-723 (1989)); etc. Para una revisión de tales técnicas, véase Gordon, "Transgenic Animals," Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229 (1989).

Puede usarse cualquier técnica conocida en la materia para producir clones transgénicos que contienen polinucleótidos, por ejemplo, transparencia nuclear en oocitos enucleados de núcleos de células embrionarias, fetales o adultas cultivadas inducidas a reposo (Campell *et al.*, Nature 380: 64-66 (1996); Wilmut *et al.*, Nature 385: 810-813 (1997)).

La presente invención proporciona animales transgénicos que portan el transgén en todas sus células, así como animales que portan el transgén en algunas, pero no en todas sus células, es decir, animales mosaico o quiméricos. El transgén puede integrarse como un transgén único o como múltiples copias tales como en concatámeros, por ejemplo, tándems de cabeza a cabeza o de cabeza a cola. El transgén también puede introducirse selectivamente y activarse en un tipo celular particular siguiendo, por ejemplo, las enseñanzas de Lasko *et al.* (Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236 (1992)). Las secuencias reguladoras requeridas para una activación específica de un tipo celular tal dependerán del tipo celular particular de interés y resultarán evidentes para los expertos en la materia. Cuando se desea que el transgén del polinucleótido se integre en el sitio cromosómico del gen endógeno, se prefiere dirección génica.

Brevemente, cuando se va a utilizar una técnica tal, se diseñan vectores que contienen algunas secuencias de nucleótidos homólogas para el gen endógeno con el fin de integrar, mediante recombinación homóloga consecuencias cromosómicas, y alterar la función de la secuencia de nucleótidos del gen endógeno. El transgén puede también introducirse selectivamente en un tipo celular particular, inactivando de este modo el gen endógeno solamente en ese tipo celular, siguiendo, por ejemplo, las enseñanzas de Gu *et al.* (Gu *et al.*, Science 265: 103-106 (1994)). Las secuencias reguladoras requeridas para una activación específica de tipo celular tal dependerán del tipo celular particular de interés y resultarán evidentes para los expertos en la materia.

Además de expresar el polipéptido de una manera ubicua o específica de tejido en animales transgénicos, también sería rutinario para un experto en la materia generar construcciones que regulan la expresión del polipéptido por una diversidad de otros medios (por ejemplo, expresión regulada por desarrollo o químicamente).

Una vez que se han generado animales transgénicos, la expresión del gen recombinante puede ensayarse utilizando técnicas convencionales. La exploración inicial puede conseguirse por análisis de transferencia de Southern o técnicas de PCR para analizar tejidos animales para verificar que ha tenido lugar la integración del transgén. El nivel de expresión de ARNm del transgén en los tejidos de los animales transgénicos también puede evaluarse usando

técnicas que incluyen, pero sin limitación, análisis de transferencia de Northern de muestras de tejido obtenidas del animal, análisis de hibridación *in situ* y PCR de transcriptasa inversa (rt-PCR). También pueden evaluarse muestras de tejido que expresa gen transgénico inmunocitoquímicamente o inmunohistoquímicamente usando anticuerpos específicos para el producto transgénico.

- 5 Una vez que se han producido los animales fundadores, estos pueden criarse, generarse por endogamia, generarse por exogamia o cruzarse para producir colonias del animal particular. Los ejemplos de tales estrategias de reproducción incluyen, pero sin limitación: exogamia de animales fundadores con más de un sitio de integración para establecer líneas separadas; endogamia de líneas separadas para producir transgénicos compuestos que expresan el transgén a niveles mayores debido a los efectos de la expresión aditiva de cada transgén; cruce de animales transgénicos heterocigotos para producir animales homocigotos para un sitio de integración dado para aumentar la expresión y eliminar la necesidad de explorar animales mediante análisis de ADN; cruce de líneas homocigotas separadas para producir líneas homocigotas o heterocigotas compuestas; y cría para situar el transgén en un fondo distinto que es apropiado para un modelo experimental de interés.

- 15 Los animales transgénicos tienen usos que incluyen, pero sin limitación, sistemas de modelos animales útiles para elaborar la función biológica de polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), estudiar enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con expresión aberrante del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y para explorar con respecto a compuestos eficaces en el alivio de tales enfermedades, trastornos y/o afecciones.

### **Ejemplo 35**

#### **20 Animales Knock-Out para Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).**

- La expresión del gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) endógeno también puede reducirse inactivando o realizando "knocking out" con el gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y/o su promotor usando recombinación homóloga dirigida (por ejemplo, véase Smithies *et al.*, Nature 317: 230-234 (1985); Thomas & Capecchi, Cell 51: 503-512 (1987); Thompson *et al.*, Cell 5: 313-321 (1989). Por ejemplo, puede usarse un polinucleótido no funcional mutante de la invención (o una secuencia de ADN no relacionada en absoluto) flanqueado por ADN homólogo a la secuencia polinucleotídica endógena (las regiones codificantes o regiones reguladoras del gen), con o sin un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable negativo, para transfectar células que expresan polipéptidos de la invención *in vivo*. Se usan técnicas conocidas en la materia para generar knock out en células que contienen, pero no expresan el gen de interés. La inserción de la construcción de ADN, mediante recombinación homóloga dirigida, da como resultado inactivación del gen diana. Tales enfoques son particularmente adecuados en investigación y campos de la agricultura en los que las modificaciones a células madre embrionarias pueden usarse para generar descendencia animal con un gen diana inactivo (por ejemplo, véase Thomas & Capecchi 1987 y Thompson 1989, mencionado anteriormente). Sin embargo este enfoque puede adaptarse rutinariamente para su uso en seres humanos siempre que las construcciones de ADN recombinante se administren directamente o se dirijan al sitio requerido *in vivo* usando vectores virales apropiados que resultarán evidentes para los expertos en la materia.

- Las células que se modifican por ingeniería genética para expresar los polipéptidos de CCR5 o, como alternativa, que se modifican por ingeniería genética para no expresar los polipéptidos de CCR5 (por ejemplo, knockouts) se administran a un paciente *in vivo*. Tales células pueden obtenerse del paciente (es decir, animal, incluyendo ser humano) o un donante de MHC compatible y pueden incluir, pero sin limitación, fibroblastos, células de la médula ósea, células sanguíneas (por ejemplo, linfocitos), adipocitos, células musculares, células endoteliales, etc. Las células se modifican por ingeniería genética *in vitro* usando técnicas de ADN recombinante para introducir la secuencia codificante de polipéptidos en las células o, como alternativa, alterar la secuencia codificante y/o secuencia reguladora endógena asociada con los polipéptidos de CCR5, por ejemplo, por transducción (usando vectores virales y preferiblemente vectores que integran el transgén en el genoma celular) o procedimientos de transfección, incluyendo, pero sin limitación, el uso de plásmidos, cósmicos, YAC, ADN desnudo, electroporación, liposomas, etc. La secuencia codificante de los polipéptidos de CCR5 puede situarse bajo el control de un promotor inducible o constitutivo fuerte o promotor/potenciador para conseguir expresión, y preferiblemente secreción, de los polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Las células modificadas por ingeniería genética que expresan y secretan los polipéptidos de CCR5 pueden introducirse en el paciente sistémicamente, por ejemplo, en la circulación o por vía intraperitoneal.

- Como alternativa, las células pueden incorporarse en una matriz e implantarse en el cuerpo, por ejemplo, fibroblastos modificados por ingeniería genética pueden implantarse como parte de un injerto de piel; células endoteliales modificadas por ingeniería genética pueden implantarse como parte de un injerto linfático o vascular (véase, por ejemplo, Anderson *et al.* Patente de Estados Unidos N° 5.399.349; y Mulligan & Wilson, Patente de Estados Unidos N° 5.460.959).

Cuando las células a administrar son células no compatibles con MHC o no autólogas, estas pueden administrarse usando técnicas bien conocidas que evitan el desarrollo de una respuesta inmune del hospedador contra las células introducidas. Por ejemplo, las células pueden introducirse en una forma encapsulada que, aunque permite un



intercambio de componentes con el ambiente extracelular inmediato, no permiten que las células introducidas se reconozcan por el sistema inmune del hospedador.

Los animales knock-out tienen usos que incluyen, pero sin limitación, sistemas de modelo animal útiles para elaborar la función biológica de polipéptidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), estudiar enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con expresión aberrante de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y para explorar con respecto a compuestos eficaces para aliviar tales enfermedades, trastornos y/o afecciones.

### **Ejemplo 36**

#### **Ensayos que Detectan Estimulación o Inhibición de Proliferación y Diferenciación de Linfocitos B**

La generación de respuestas inmunes humorales funcionales requiere señalización soluble y afín entre linfocitos de linaje B y su microambiente. Las señales pueden proporcionar un estímulo positivo que permite a un linfocito de linaje B continuar su desarrollo programado o un estímulo negativo que induce a la célula a detener su ruta de desarrollo actual. Hasta la fecha, se ha descubierto que numerosas señales estimuladoras e inhibitoras influyen en las respuestas de linfocitos B incluyendo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-14 e IL-15. De forma interesante, estas señales son por sí mismas efectores débiles pero pueden, en combinación con diversas proteínas co-estimuladoras, inducir la activación, proliferación, diferenciación, dirección, tolerancia y muerte entre poblaciones de linfocitos B.

Una de las clases mejor estudiadas de proteínas co-estimuladoras de linfocitos B es la superfamilia TNF. Dentro de esta familia se ha descubierto que CD40, CD27 y CD30 junto con sus respectivos ligandos CD154, CD70 y CD153 regulan una diversidad de respuestas inmunes. Los ensayos que permiten la detección y/u observación de la proliferación de diferenciación de estas poblaciones de linfocitos B y sus precursores son herramientas valiosas para determinar los efectos que diversas proteínas pueden tener en estas poblaciones de linfocitos B en términos de proliferación y diferenciación. A continuación se enumeran dos ensayos diseñados para permitir la detección de la diferenciación, proliferación o inhibición de poblaciones de linfocitos B y sus precursores.

**Ensayo In Vitro:** Proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) purificada, o formas truncadas de la misma, o ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) purificado se evalúa con respecto a su capacidad para inducir activación, proliferación, diferenciación o inhibición y/o muerte en poblaciones de linfocitos B y sus precursores. La actividad de la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en linfocitos B de amígdalas humanas, medida cualitativamente en el intervalo de dosis de 0,1 a 10.000 ng/ml, se evalúa en un ensayo de coestimulación de linfocitos B convencional en el que se cultivan linfocitos B de amígdalas purificados en presencia de Cowan I de *Staphylococcus aureus* (SAC) fijado con formalina o anticuerpo anti-IgM humano inmovilizado como el agente de sensibilización. Segundas señales tales como IL-2 e IL-15 actúan de forma sinérgica con SAC e IgM entrecruzando para inducir proliferación de linfocitos B según se mide por incorporación de timidina tritiada. Puede identificarse fácilmente agentes de actuación sinérgica nuevos usando este ensayo. El ensayo implica aislar linfocitos B de amígdalas humanas mediante agotamiento con perlas magnéticas (MACS) de células positivas para CDR. La población celular resultante es mayor de 95% de linfocitos B según se evalúa por expresión de CD45R(B220).

Se colocan diversas diluciones de cada muestra en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos a la que se añaden  $10^5$  linfocitos B suspendidos en medio de cultivo (RPMI 1640 que contiene FBS 10%, 2ME  $5 \times 10^{-5}$  M, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 10 µg/ml y dilución  $10^{-5}$  de SAC) en un volumen total de 150 µl. La proliferación o inhibición se cuantifica mediante un pulso de 20 horas (1 µCi/pocillo con 3H-timidina (6,7 Ci/mM) comenzando 72 horas después de la adición del factor. Los controles positivo y negativo son IL2 y medio respectivamente.

**Ensayo In Vivo:** Se inyectan ratones BALB/c (i.p.) dos veces por día con tampón solamente o proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) 2 mg/Kg o formas truncadas de la misma o ligando del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Los ratones reciben este tratamiento durante 4 días consecutivos, momento en el cual se sacrifican y se recogen diversos tejidos y suero para análisis. La comparación de las secciones con hematoxilina y eosina de bazo tratados con proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y normales identifica los resultados de la actividad de la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en células del bazo, tal como la difusión de envolturas linfáticas periaxiales y/o aumentos significativos en la celularidad nucleada de las regiones de pulpa roja, lo que puede indicar la activación de la diferenciación y proliferación de poblaciones de linfocitos B. Se usan estudios inmunohistoquímicos que emplean un marcador de linfocitos B, anti-CD45R(B220), para determinar si algún cambio fisiológico de las células del bazo, tales como desorganización del bazo, se debe a un aumento de la representación de linfocitos B dentro de zonas de linfocitos B ligeramente definidas que infiltran regiones de linfocitos T establecidas.

Se usan análisis citométricos de flujo de los bazo de ratones tratados con proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para indicar si la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) aumenta específicamente la proporción de linfocitos B ThB+, sin CD45R(B220) frente a la que se observa en ratones control.

De forma similar, una consecuencia predicha de aumento de la representación de linfocitos B maduros *in vivo* es un aumento relativo en las titulaciones de Ig en suero. En consecuencia, los niveles de IgM e IgA en suero se comparan

entre tampón y ratones tratados con proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan la actividad en la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G.

### **Ejemplo 37**

#### **Ensayo de Proliferación de Linfocitos T**

Se realiza un ensayo de proliferación inducido por CD3 en PBMC y se mide por la captación de  $^3\text{H}$ -timidina. El ensayo se realiza como sigue. Se recubren placas de 96 pocillos con mAb para CD3 100  $\mu\text{l}$ /pocillo (HIT3a, Pharmingen) o mAb control de isotipo coincidente (B33.1) durante una noche a  $4^\circ\text{C}$  (1  $\mu\text{g/ml}$  en tampón bicarbonato 0,05 M, pH 9,5), después se lavan tres veces con PBS. Se aíslan las PBMC mediante centrifugación en gradiente F/H de sangre periférica humana y se añaden a pocillos por cuadruplicado ( $5 \times 10^4$ /pocillo) de placas recubiertas con mAb en RPMI que contiene FCS 10% y P/S en presencia de diversas concentraciones de proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (volumen total 200  $\mu\text{l}$ ). El tampón de proteína relevante y el medio solo son controles. Después de 48 horas de cultivo a  $37^\circ\text{C}$ , se centrifugan las placas durante 2 minutos a 1000 rpm y se retiran 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se almacena a  $-20^\circ\text{C}$  para medición de IL-2 (u otras citocinas) si se observa efecto sobre la proliferación. Los pocillos se complementan con 100  $\mu\text{l}$  de medio que contiene 0,5  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -timidina y se cultivan a  $37^\circ\text{C}$  durante 18-24 horas. Los pocillos se recolectan y se usa la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina como una medida de proliferación. Anti-CD3 solo es el control positivo para la proliferación. También se usa IL-2 (100 U/ml) como un control que potencia la proliferación. Se usa anticuerpo control que no induce proliferación de linfocitos T como el control negativo para los efectos de proteínas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan la actividad en la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G.

### **Ejemplo 38**

#### **Efecto del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) sobre la Expresión de MHC Clase II, Moléculas Coestimuladoras y de Adhesión y Diferenciación Celular de Monocitos y Células Dendríticas Humanas Derivadas de Monocitos**

Se generan células dendríticas por la expansión de precursores proliferativos hallados en la sangre periférica: PBMC adherentes o fracciones monocíticas elutriadas se cultivan durante 7-10 días con GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (20 ng/ml). Estas células dendríticas tienen el fenotipo característico de células inmaduras (expresión de CD1, CD80, CD86, CD40 y antígenos de MHC de clase II). El tratamiento con factores de activación, tales como  $\text{TNF-}\alpha$  causa un cambio rápido en el fenotipo de superficie (expresión aumentada de MHC clase I y II, moléculas coestimuladoras y de adhesión, regulación negativa de  $\text{FC}\gamma\text{RII}$ , regulación positiva de CD83). Estos cambios se correlacionan con una capacidad de presentación de antígenos aumentada y con maduración funcional de las células dendríticas.

El análisis de FACS de antígenos de superficie se realiza como sigue. Las células se tratan 1-3 días con concentraciones crecientes de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un ligando del mismo o LPS (control positivo), se lavan con PBS que contiene BSA 1% y azida sódica 0,02 mM y después se incuban con dilución 1:20 de anticuerpos monoclonales marcados con FITC o PE apropiados durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Después de un lavado adicional, las células marcadas se analizan por citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson).

**Efecto sobre la producción de citocinas.** Las citocinas generadas por células dendríticas, en particular IL-12, son importantes en el inicio de las respuestas inmunes dependientes de linfocitos T. IL-12 influye de forma importante en el desarrollo de la respuesta inmune de linfocitos T auxiliares Th1 e induce función de células NK y linfocitos T citotóxicos. Se usa un ELISA para medir la liberación de IL-12 como sigue. Se tratan células dendríticas ( $10^6/\text{ml}$ ) con concentraciones crecientes de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) durante 24 horas. Se añade LPS (100 ng/ml) al cultivo celular como control positivo. Se recogen después sobrenadantes de los cultivos celulares y se analizan con respecto al contenido de IL-12 usando kit de ELISA comercial (por ejemplo, R & D Systems (Minneapolis, MN)). Se usan los protocolos convencionales proporcionados con los kits.

**Efecto sobre la expresión de MHC de Clase II, moléculas coestimuladoras y de adhesión.** Pueden identificarse tres familias principales de antígenos de superficie celular en los monocitos: moléculas de adhesión, moléculas implicadas en presentación de antígenos y receptor de Fc. La modulación de la expresión de antígenos del MHC clase II y otras moléculas coestimuladoras, tales como B7 e ICAM-1, puede dar como resultado cambios en la capacidad de presentación de antígenos de monocitos y capacidad para inducir activación de linfocitos T. El aumento de la expresión de receptores de Fc puede correlacionarse con mejora de la actividad citotóxica de monocitos, liberación de citocinas y fagocitosis.

Se usa análisis de FACS para examinar los antígenos de superficie como sigue. Se tratan monocitos 1-5 días con concentraciones crecientes de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o LPS (control positivo), se lavan con PBS que contiene BSA 1% y azida sódica 0,02 mM y después se incuban con dilución 1:20 de anticuerpos monoclonales marcados con FITC o PE apropiados durante 30 minutos a 4°C. Después de un lavado adicional, las células marcadas se analizan mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson).

**Activación de monocitos y/o aumento de la supervivencia.** Se conocen en la técnica ensayos para moléculas que activan (o como alternativa, inactivan) monocitos y/o aumentan la supervivencia de los monocitos (o como alternativa, disminuyen la supervivencia de los monocitos) y pueden aplicarse rutinariamente para determinar si una molécula de la invención actúa como un inhibidor o activador de monocitos. Pueden explorarse Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), agonistas o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) usando los tres ensayos descritos posteriormente. Para cada uno de estos ensayos, se purifican células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de paquetes leucocitarios de donantes únicos (American Red Cross, Baltimore, MD) por centrifugación a través de un gradiente de Histopaque (Sigma). Se aíslan monocitos de PBMC por elutriación de centrifugación a contracorriente.

**Ensayo de Supervivencia de Monocitos.** Los monocitos de sangre periférica humana pierden viabilidad progresivamente cuando se cultivan en ausencia de suero u otros estímulos. Su muerte resulta de un procedimiento regulado internamente (apoptosis). La adición al cultivo de factores activadores, tales como TNF-alfa mejora dramáticamente la supervivencia celular y evita fragmentación de ADN. Se usa tinción con yoduro de propidio (PI) para medir apoptosis como sigue. Se cultivan los monocitos durante 48 horas en tubos de polipropileno en medio sin suero (control positivo), en presencia de TNF-alfa 100 ng/ml (control negativo) y en presencia de diversas concentraciones del compuesto a ensayar. Las células se suspenden a una concentración de  $2 \times 10^6$ /ml en PBS que contiene PI a una concentración final de 5 µg/ml y después se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos antes del análisis con FACScan. Se ha demostrado que la captación de PI se correlaciona con fragmentación de ADN en este paradigma experimental.

**Efecto sobre la liberación de citocinas.** Una función importante de monocitos/macrófagos es su actividad reguladora sobre otras poblaciones celulares del sistema inmune a través de la liberación de citocinas después de la estimulación. Se realiza un ELISA para medir liberación de citocinas como sigue. Se incuban monocitos humanos a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml con concentraciones crecientes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) y en las mismas condiciones, pero en ausencia de Receptor de Quimiocina de proteína G. Para producción de IL-12, las células se estimulan durante una noche con IFN (100 U/ml) en presencia de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Se añade después LPS (10 ng/ml). Se recogen medios condicionados después de 24 horas y se mantienen congelados hasta su uso. Se realiza después medición de TNF-alfa, IL-10, MCP-1 e IL-8 usando un kit de ELISA disponible en el mercado (por ejemplo, R & D Systems (Minneapolis, MN)) y aplicando los protocolos convencionales proporcionados con el kit.

**Explosión oxidativa.** Se siembran monocitos purificados en placas de 96 pocillos a  $2 \times 10^5$  células/pocillo. Se añaden concentraciones crecientes del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) a los pocillos en un volumen total de 0,2 ml de medio de cultivo (RPMI 1640 + FCS 10%, glutamina y antibióticos). Después de 3 días de incubación, las placas se centrifugan y el medio se retira de los pocillos. A las monocapas de macrófagos, se añaden 0,2 ml por pocillo de solución de rojo fenol (NaCl 140 mM, tampón de fosfato potásico 10 mM pH 7,0, dextrosa 5,5 mM, rojo fenol 0,56 mM y HRPO 19 U/ml) junto con el estimulador (PMA 200 nM). Las placas se incuban a 37°C durante 2 horas y la reacción se detiene mediante la adición de 20 µl de NaOH 1 N por pocillo. La absorbancia se lee a 610 nM. Para calcular la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por los macrófagos, se realiza una curva patrón de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de molaridad conocida para cada experimento.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan la actividad en la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G.

### **Ejemplo 39**

#### **Efectos Biológicos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

##### **Ensayos Neuronales y Astrocitos**

Puede ensayarse el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) recombinante, expresado en *Escherichia coli* y purificado como se ha descrito anteriormente con respecto a actividad en la promoción de la supervivencia, crecimiento de neurita o diferenciación fenotípica de células neuronales corticales y con respecto a inducir la proliferación de células inmunopositivas para proteínas ácidas fibrilares gliales, astrocitos. La selección de células corticales para el bioensayo se basa en la expresión prevalente de FGF-1 y FGF-2 en estructuras corticales y en el aumento anteriormente indicado de supervivencia neuronal cortical resultante de tratamiento con FGF-2. Un ensayo de incorporación de timidina, por ejemplo, puede usarse para elucidar la actividad del Receptor de Quimiocina de proteína G en estas células.

Además, informes previos que describen los métodos biológicos de FGF-2 (FGF básico) en neuronas corticales o del hipocampo *in vitro* han demostrado aumentos en supervivencia neuronal y crecimiento de neurita (Walicke, P. *et al.*, "Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3012-3016. (1986)). Sin embargo, informes de experimentos realizados sobre células PC-12 sugieren que estas dos respuestas no son necesariamente sinónimas y pueden depender no solamente de que FGF se ensaya sino también de que receptor o receptores se expresan en las células diana. Usando el paradigma de cultivo neuronal cortical primario, la capacidad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para inducir crecimiento de neurita puede compararse con la respuesta conseguida con FGF-2 usando, por ejemplo, un ensayo de incorporación de timidina.

#### **Ensayos de células endoteliales y fibroblastos**

Se obtienen fibroblastos de pulmón humano de Clonetics (San Diego, CA) y se mantienen en medio de crecimiento de Clonetics. Se obtienen células microvasculares dérmicas de Cell Applications (San Diego, CA). Para ensayos de proliferación, pueden cultivarse los fibroblastos de pulmón humano y células endoteliales microvasculares dérmicas a 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un día en medio de crecimiento. Las células se incuban después durante un día en medio basal BSA 0,1%. Después de reemplazar el medio con medio BSA fresco 0,1%, las células se incuban con las proteínas de ensayo durante 3 días. Se añade Azul de Alamar (Alamar Biosciences, Sacramento, CA) a cada pocillo hasta una concentración final de 10%. Las células se incuban durante 4 horas. La viabilidad celular se mide leyendo en un lector de fluorescencia CytoFluor. Para los ensayos de PGE<sub>2</sub>, se cultivan los fibroblastos de pulmón humano a 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un día. Después de un cambio de medio a medio basal BSA 0,1%, las células se incuban con FGF-2 o Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con o sin IL-1 $\alpha$  durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogen y se ensayan con respecto a PGE<sub>2</sub> mediante kit EIA (Cayman, Ann Arbor, MI). Para los ensayos de IL-6, se cultivan los fibroblastos de pulmón humano a 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un día. Después de un cambio de medio a medio basal BSA 0,1%, las células se incuban con FGF-2 o Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con o sin IL-1 $\alpha$  durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogen y se ensayan con respecto a IL-6 mediante kit de ELISA (Endogen, Cambridge, MA).

Se cultivan fibroblastos de pulmón humanos con FGF-2 o Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) durante 3 días en medio basal antes de la adición de Azul de Alamar para evaluar efectos sobre el crecimiento de los fibroblastos. FGF-2 debería mostrar una estimulación a 10 – 2500 ng/ml que puede usarse para comparar la estimulación con Receptor de Quimiocina de proteína G.

#### **Modelos de Parkinson.**

La pérdida de función motora en enfermedad de Parkinson se atribuye a una deficiencia de dopamina estriada resultante de la degeneración de las neuronas de proyección dopaminérgica nigroestriada. Un modelo animal para Parkinson que se ha caracterizado exhaustivamente implica la administración sistémica de 1-metil-4 fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). En el SNC, MPTP se capta por astrocitos y se cataboliza por monamina oxidasa B a 1-metil-4-fenil piridina (MPP<sup>+</sup>) y se libera. Posteriormente, MPP<sup>+</sup> se acumula de forma activa en neuronas dopaminérgicas por el transportador de recaptación de alta afinidad para dopamina. MPP<sup>+</sup> se concentra después en mitocondrias por el gradiente electroquímico e inhibe selectivamente nicotidamida adenina difosfato: ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), interfiriendo de este modo con el transporte de electrones y generando eventualmente radicales de oxígeno.

Se ha demostrado en paradigmas de cultivo tisular que FGF-2 (FGF básico) tiene actividad trófica hacia neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Ferrari *et al.*, Dev. Biol. 1989). Recientemente, el grupo del Dr. Unsicker ha demostrado que la administración de FGF-2 en implantes de espuma de gel en el cuerpo estriado da como resultado la protección casi completa de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la toxicidad asociada con exposición a MPTP (Otto y Unsicker, J. Neuroscience, 1990).

Basándose en los datos con FGF-2, puede evaluarse el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para determinar si tiene una acción similar a la de FGF-2 en el aumento de supervivencia de neuronas dopaminérgicas *in vitro* y también puede ensayarse *in vivo* con respecto a protección de neuronas dopaminérgicas en el cuerpo estriado del daño asociado con tratamiento con MPTP. El efecto potencial del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se examina primero *in vitro* en un paradigma de cultivo celular de neuronas dopaminérgicas. Los cultivos se preparan por disección de la placa basal del cerebro medio de embriones de rata Wistar de día 14 de gestación. El tejido se disocia con tripsina y se siembra a una densidad de 200.000 células/cm<sup>2</sup> en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poliortinina-laminina. Las células se mantienen en medio de Eagle Modificado por Dulbecco y medio F12 que contiene complementos hormonales (N1). Los cultivos se fijan con paraformaldehído después de 8 días *in vitro* y se procesan con respecto a tirosina hidroxilasa, un marcador específico para neuronas dopaminérgicas, tinción inmunohistoquímica. Se cultivan cultivos celulares disociados de ratas embrionarias. Los medios de cultivo se cambian cada tres días y los factores también se añaden en ese momento.

Puesto que se aíslan las neuronas dopaminérgicas de animales el día de gestación 14, un tiempo de desarrollo que es posterior a la etapa en la que las células precursoras dopaminérgicas están proliferando, un aumento en el

número de neuronas inmunopositivas para tirosina hidroxilasa representaría un aumento en el número de neuronas dopaminérgicas que sobreviven *in vitro*. Por lo tanto, si el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) actúa para prolongar la supervivencia de neuronas dopaminérgicas, se sugeriría que el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede estar implicado en Enfermedad de Parkinson.

- 5 Los estudios descritos en este ejemplo ensayan actividad en la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 40**

#### **10 El Efecto del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) sobre el Crecimiento de Células Endoteliales Vasculares**

El día 1, se siembran células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células/placa de 35 mm en medio M199 que contiene suero bovino fetal (FBS) 4%, heparina 16 unidades/ml y complementos de crecimiento celular endotelial 50 unidades/ml (ECGS, Biotechnology, Inc.). El día 2, el medio se reemplaza con M199 que contiene FBS 10%, heparina 8 unidades/ml. Se añade proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 22, y controles positivos, tales como VEGF y FGF básico (bFGF), a diferentes concentraciones. Los días 4 y 6 se reemplaza el medio. El día 8, se determina el número de células con un Contador Coulter.

Un aumento en el número de células HUVEC indica que el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede hacer proliferar células endoteliales vasculares.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan la actividad en la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **25 Ejemplo 41**

#### **Efectos Estimulador del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) sobre la Proliferación de Células Endoteliales Vasculares**

Para la evaluación de actividad mitogénica de factores de crecimiento, se realiza el ensayo colorimétrico de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)2H-tetrazolio) con el reactivo de acoplamiento de electrones PMS (fenacin metosulfato) (CellTiter 96 AQ, Promega). Se siembran las células en una placa de 96 pocillos (5.000 células/pocillo) en 0,1 ml de medio complementado con suero y se permite que se unan durante una noche. Después de privación de suero durante 12 horas en FBS 0,5%, las condiciones (bFGF, VEGF<sub>165</sub> o Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en FBS 0,5%) con o sin Heparina (8 U/ml) se añaden a los pocillos durante 48 horas. Se añaden 20 mg de mezcla MTS/PMS (1:0,05) por pocillo y se permite que incuben durante 1 hora a 37°C antes de medir la absorbancia a 490 nm en un lector de placa de ELISA. Se resta la absorbancia de fondo de los pocillos control (algo de medio, sin células) y se realizan siete pocillos en paralelo para cada condición. Véase, Leak *et al.* In Vitro Cell. Dev. Biol. 30A: 512-518 (1994).

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan actividad en la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 42**

#### **Estimulación de Migración Endotelial**

Este ejemplo se usará para explorar la posibilidad de que el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueda estimular migración de células endoteliales linfáticas.

Los ensayos de migración de células endoteliales se realizan usando una cámara de microquimiotaxis de 48 pocillos (Neuroprobe Inc., Cabin John, MD; Falk, W., *et al.*, J. Immunological Methods 1980;33: 239-247). Se recubre filtros de policarbonato sin polivinilpirrolidona con un tamaño de poro de 8 µm (Nucleopore Corp. Cambridge, MA) con gelatina 0,1% durante al menos 6 horas a temperatura ambiente y se secan en aire estéril. Se diluyen sustancias de ensayo a concentraciones apropiadas en M199 complementado con albúmina de suero bovino (BSA) 0,25% y se colocan 25 µl de la dilución final en la cámara inferior del aparato modificado de Boyden. Se lavan y tripsinizan cultivos de HUVEC o BMEC de pase temprano (2-6) subconfluentes durante el tiempo mínimo requerido para conseguir separación de las células. Después de colocar el filtro entre la cámara superior y la inferior,  $2,5 \times 10^5$  células suspendidas en 50 µl de M199 que contiene FBS 1% se siembran en el compartimento superior. El aparato

se incuba después durante 5 horas a 37°C en una cámara humidificada con CO<sub>2</sub> 5% para permitir la migración celular. Después del periodo de incubación, se retira el filtro y se raspa la cara superior del filtro con las células no migradas con una varilla de punta de goma. Los filtros se fijan con metanol y se tiñen con una solución de Giemsa (Diff-Quick, Baxter, McGraw Park, IL). La migración se cuantifica mediante conteo de células de tres campos de alta potencia aleatorios (40x) en cada pocillo y todos los grupos se realizan por cuadruplicado.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan la actividad en proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 43**

##### **Efecto del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) sobre la Formación de Tubos en Angiogénesis**

Otra etapa en la angiogénesis es la formación de tubos, marcada por la diferenciación de células endoteliales. Este bioensayo mide la capacidad de células endoteliales microvasculares para formar estructuras de tipo capilares (estructuras huecas) cuando se cultivan *in vitro*.

Las CADMEC (células endoteliales microvasculares) se obtienen de Cell Applications, Inc. como células proliferativas (pase 2) y se cultivan en medio de crecimiento CADMEC de Cell Applications y se usan en el pase 5. Para el ensayo de angiogénesis *in vitro*, los pocillos de una placa de cultivo celular de 48 pocillos se recubre con Medio de Factor de unión de Cell Applications (200 ml/pocillo) durante 30 minutos a 37°C. Se siembran las CADMEC en las placas recubiertas a 7500 células/pocillo y se cultivan durante una noche en medio de crecimiento. El medio de crecimiento se reemplaza después con 300 mg de Medio de Formación de tubos de Cell Applications que contiene tampón de control o Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (0,1 a 100 ng/ml) y las células se cultivan durante 48 horas adicionales. Los números y longitudes de los tubos de tipo capilar se cuantifican a través del uso del analizador de imágenes de video Boeckeler VIA-170. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

Se usa VEGF (50 ng/ml) comercial (R&D) como un control positivo. Se usa b-esteradiol (1 ng/ml) como un control negativo. El tampón apropiado (sin proteína) también se utiliza como un control.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan la actividad en proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 44**

##### **Efecto Angiogénico sobre la Membrana Corioalantoidea de Pollo**

La membrana corioalantoidea de pollo (CAM) es un sistema bien establecido para examinar la angiogénesis. La formación de vasos sanguíneos en CAM es fácilmente visible y cuantificable. La capacidad del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o un ligando del mismo para estimular la angiogénesis en CAM puede examinarse.

Se incuban huevos fertilizados del pollo Leghorn (*Gallus gallus*) y codorniz Japonesa (*Coturnix coturnix*) a 37,8°C y 80% de humedad. Se estudian CAM diferenciadas de embriones de pollo de 16 días y codorniz de 13 días con los siguientes métodos.

El día 4 de desarrollo, se realiza una ventana en la cáscara del huevo de huevos de pollo. Se comprueban los embriones con respecto al desarrollo normal y los huevos se sellan con cinta adhesiva. Se incuban adicionalmente hasta el día 13. Se cortan cubreobjetos Thermanox (Nunc, Naperville, IL) en discos de aproximadamente 5 mm de diámetro. Se disuelven factores de crecimiento sin sal y estériles en agua destilada y se pipetea aproximadamente 3,3 mg/5 ml en los discos. Después de secar al aire, los discos invertidos se aplican en CAM. Después de 3 días, las muestras de ensayo se fijan en glutaraldehído 3% y formaldehído 2% y se aclaran en tampón de cacodilato sódico 0,12 M. Se fotografían con un microscopio estereó [Wild M8] y se incluyen para seccionamiento semi y ultrafino como se ha descrito anteriormente. Se realizan controles con discos de soporte solamente.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan actividad en proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 45**

##### **Ensayo de Angiogénesis Usando un Implante de Matrigel en Ratón**

El ensayo de angiogénesis *in vivo* del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mide la capacidad de una red

capilar existente para formar nuevos vasos en una cápsula implantada de material de matriz extracelular murina (Matrigel). La proteína se mezcla con el Matrigel líquido a 4 grados C y la mezcla se inyecta después por vía subcutánea en ratones, en los que solidifica. Después de 7 días, el “tapón” sólido de Matrigel se retira y se examina con respecto a la presencia de nuevos vasos sanguíneos. El Matrigel se obtiene de Becton Dickinson Labware/Collaborative Biomedical Products.

Cuando se descongela a 4 grados C el material de Matrigel es un líquido. El Matrigel se mezcla con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) a 150 ng/ml a 4 grados C y se introduce en jeringas de 3 ml frías. Se inyecta a ratones hembra C57B1/6 de aproximadamente 8 semanas de edad la mezcla de Matrigel y proteína experimental en dos sitios en el aspecto mesoventral del abdomen (0,5 ml/sitio). Después de 7 días los ratones se sacrifican por dislocación cervical, se retiran los tapones de Matrigel y se limpian (es decir, se retira todo el tejido fibroso y membranas colgantes). Se fijan tapones completos replicados en formaldehído 10% tamponado neutro, se incluyen en parafina y se usan para producir secciones para examen histológico después de teñir con Tricromo de Masson. Se procesan secciones transversales de 3 diferentes regiones de cada tapón. Las secciones seleccionadas se tiñen con respecto a la presencia de vWF. El control positivo para este ensayo es FGF básico bovino (150 ng/ml). Se usa Matrigel solamente para determinar niveles basales de angiogénesis.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan actividad en proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 46**

##### ***Rescata de Isquemia en Modelo de Extremidades Inferiores de Conejo***

Para estudiar los efectos *in vivo* del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en isquemia, se crea un modelo de isquemia de extremidades posteriores de conejo mediante retirada quirúrgica de una arteria femoral como se ha descrito anteriormente (Takeshita, S. *et al.*, Am J. Pathol 147: 1649-1660 (1995)). La escisión de la arteria femoral da como resultado una propagación retrógrada de trombos y oclusión de la arteria iliaca externa. En consecuencia, el flujo sanguíneo al miembro isquémico es dependiente de vasos colaterales que se originan de la arteria iliaca interna (Takeshita, S. *et al.* Am J. Pathol 147: 1649-1660 (1995)). Se permite un intervalo de 10 días para recuperación postoperatoria de conejos y desarrollo de vasos colaterales endógenos. El día 10 después de la operación (día 0), después de realizar un angiograma de medida basal, la arteria iliaca interna de la extremidad isquémica se transfecta con 500 mg de plásmido de expresión de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) desnudo por tecnología de transferencia génica arterial usando un catéter de globo recubierto de hidrogel como se ha descrito (Riessen, R. *et al.* Hum Gene Ther. 4: 749-758 (1993); Leclerc, G. *et al.* J. Clin. Invest. 90: 936-944 (1992)). Cuando se usa Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en el tratamiento, se suministra una embolada simple de 500 mg de proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o control en la arteria iliaca interna de la extremidad isquémica durante un periodo de 1 minuto a través de un catéter de infusión. El día 30, se miden diversos parámetros en estos conejos: (a) relación BP – La relación de presión sanguínea de presión sistólica de la extremidad isquémica con la de extremidad normal; (b) Flujo Sanguíneo y Reserva de Flujo – FL en reposo: el flujo sanguíneo durante condición no dilatada y FL Máxima: el flujo sanguíneo durante condición completamente dilatada (también una medida indirecta de la cantidad de vasos sanguíneos) y la reserva de flujo se refleja por la relación de FL máxima:FL en reposo; (c) Puntuación Angiográfica - esta se mide por el angiograma de vasos colaterales. Se determina una puntuación por el porcentaje de círculos en una rejilla superpuesta con arterias opacificadas que atraviesan dividido por el número total en el muslo del conejo; (d) Densidad Capilar- el número de capilares colaterales determinados en secciones microscópicas ligeras tomadas de las extremidades posteriores.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan actividad en proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 47**

##### ***Modelo de Enfermedad Arterial Periférica***

La terapia angiogénica que emplea Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) es una estrategia terapéutica nueva para obtener restauración del flujo sanguíneo alrededor de la isquemia en caso de enfermedades arteriales periféricas. El protocolo experimental incluye:

a) Se liga un lateral de la arteria femoral para crear músculo isquémico de la extremidad posterior, el otro lateral de la extremidad posterior sirve como un control.

b) Se suministra proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un intervalo de dosificación de 20 mg – 500 mg por vía intravenosa y/o por vía intramuscular 3 veces (quizás más) por semana durante 2-3 semanas.

c) Se recoge el tejido muscular isquémico después de ligación de la arteria femoral a 1, 2 y 3 semanas para el análisis de expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) e histología. También se realiza biopsia en el otro lateral del músculo normal de la extremidad posterior contralateral.

- 5 Los estudios descritos en este ejemplo ensayan actividad en proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 48**

##### **Modelo de Enfermedad Miocárdica Isquémica**

- 10 Se evalúa Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) como un mitógeno potente capaz de estimular el desarrollo de vasos colaterales y reestructurar nuevos vasos después de oclusión de arteria coronaria. La alteración de la expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se investiga *in situ*. El protocolo experimental incluye:

- 15 a) El corazón se expone a través de una toracotomía del lado izquierdo en la rata. Inmediatamente, la arteria coronaria izquierda se ocluye con una sutura fina (6-0) y se cierra el tórax.

b) Se suministra proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), en un intervalo de dosificación de 20 mg – 500 mg, por vía intravenosa y/o vía intramuscular 3 veces (quizás más) por semana durante 2-4 semanas.

- 20 c) Treinta días después de la cirugía, se retira el corazón y se realiza una sección transversal para análisis morfométricos e *in situ*.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan actividad en proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

#### **Ejemplo 49**

##### **Supresión de la expresión de la molécula de adhesión inducida por TNF alfa mediante Receptor de Quimiocina de proteína G**

- 30 El reclutamiento de linfocitos a áreas de inflamación y angiogénesis implica interacciones ligando-receptor específicas entre moléculas de adhesión de superficie celular (CAM) en linfocitos y el endotelio vascular. El proceso de adhesión, en situaciones normales y patológicas, sigue una cascada multietapa que implica la expresión de molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y moléculas de adhesión de leucocitos endoteliales 1 (E-selectina) en células endoteliales (EC). La expresión de estas moléculas y otras en el endotelio vascular determina la eficacia con la que los leucocitos pueden adherirse a la vasculatura local y extravasar al tejido local durante el desarrollo de una respuesta inflamatoria. La concentración local de citocinas y factor de crecimiento participa en la modulación de la expresión de estas CAM.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), un citosina proinflamatoria potente, es un estimulador de las tres CAM en células endoteliales y puede estar implicado en una amplia diversidad de respuestas inflamatorias, dando como resultado con frecuencia un resultado patológico.

- 40 Puede examinarse el potencial del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para mediar una supresión de la expresión de CAM inducida por TNF- $\alpha$ . Se emplea un ensayo ELISA modificado que usa EC como un absorbente de fase sólida para medir la cantidad de expresión de CAM en EC tratadas con TNF- $\alpha$  cuando se coestimula con un miembro de la familia FGF de proteínas.

- 45 Para realizar el experimento, se obtienen cultivos de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) de recolecciones de cordón agrupadas y se mantienen en medio de crecimiento (EGM-2; Clonetics, San Diego, CA) complementado con FCS 10% y penicilina/estreptomicina 1% en un incubador humidificado a 37°C que contiene CO<sub>2</sub> 5%. Se siembran HUVEC en placas de 96 pocillos a concentraciones de  $1 \times 10^4$  células/pocillo en medio EGM a 37 grados C durante 18-24 horas o hasta confluencia. Las monocapas se lavan posteriormente 3 veces con una solución sin suero de RPMI-1640 complementado con penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 mg/ml y se tratan con una citocina dada y/o factor o factores de crecimiento durante 24 horas a 37 grados C. Después de la incubación, las células se evalúan después con respecto a expresión de CAM.

Se dejan crecer células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana (HUVEC) en una placa de 96 pocillos convencional hasta la confluencia. El medio de crecimiento se retira de las células y se reemplaza con 90  $\mu$ l de Medio 199 (FBS 10%). Se añaden muestras para ensayo y controles positivos o negativos a la placa por triplicado



(volúmenes de 10  $\mu$ l). Se incuban las placas a 37 grados C durante 5 horas (expresión de selectina e integrina) o 24 horas (expresión de integrina solamente). Se aspiran las placas para retirar medio y se añaden 100  $\mu$ l de paraformaldehído-PBS 0,1% (con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ) a cada pocillo. Las placas se mantienen a 4°C durante 30 minutos.

Después se retira el fijador de los pocillos y los pocillos se lavan 1X con PBS (+Ca, Mg) +BSA 0,5% y se vacían. No permitir a los pocillos secarse. Añadir 10  $\mu$ l de anticuerpo primario diluido a los pocillos de ensayo y control. Se usan anti-ICAM-1-Biotina, Anti-VCAM-1-Biotina y Anti-E-selectina-Biotina a una concentración de 10  $\mu$ g/ml (dilución 1:10 de anticuerpo de reserva 0,1 mg/ml). Se incuban las células a 37°C durante 30 minutos en un ambiente humidificado. Se lavan los pocillos X3 con PBS(+Ca, Mg)+BSA 0,5%.

Después se añaden 20  $\mu$ l de Fosfatasa Alcalina-ExtrAvidin diluida (dilución 1:5.000) a cada pocillo y se incuban a 37°C durante 30 minutos. Se lavan los pocillos X3 con PBS(+Ca,Mg)+BSA 0,5%. Se disuelve 1 comprimido de p-Nitrofenol Fosfato pNPP en 5 ml de tampón de glicina (pH 10,4). Se añaden 100  $\mu$ l de sustrato de pNPP en tampón de glicina a cada pocillo de ensayo. Se preparan pocillos convencionales por triplicado a partir de la dilución de trabajo de la Fosfatasa Alcalina-ExtrAvidin en tampón de glicina: 1:5.000 ( $10^0 > 10^{-0,5} > 10^{-1} > 10^{-1,5}$ ). Se añaden 5  $\mu$ l de cada dilución a pocillos por triplicado y el contenido de AP resultante en cada pocillo es 5,50 ng, 1,74 ng, 0,55 ng, 0,18 ng. Debe añadirse después 100  $\mu$ l de reactivo pNPP a cada uno de los pocillos convencionales. La placa debe incubarse a 37°C durante 4 horas. Se añade un volumen de 50  $\mu$ l de NaOH 3 M a todos los pocillos. Los resultados se cuantifican en un lector de placa a 405 nm. Se usa la opción de restar el fondo en pocillos blancos rellenos con tampón de glicina solamente. El molde se establece para indicar la concentración de conjugado de AP en cada pocillo convencional [5,50 ng; 1,74 ng; 0,55 ng; 0,18 ng]. Los resultados se indican como cantidad de conjugado de AP unido en cada muestra.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan actividad en proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría fácilmente modificar los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

## 50 **Ejemplo 50**

### **Métodos para Inhibir la Actividad del Receptor Acoplado a proteína G Usando Fragmentos Transmembrana**

El documento WO 94/05695 y la Patente de Estados Unidos Nº 5.508.384 exponen secuencias de regiones transmembrana para 74 GPCR. La publicación de patente WO 94/05695 describe y reivindica polipéptidos que corresponden a fragmentos o secuencias homólogas de GPCR que pueden unirse a un ligando de GPCR o que pueden modular la unión a ligando. Ambas referencias describen que un fragmento que atraviesa la membrana del tercer dominio TM del receptor de dopamina D2 se unió específicamente a un ligando del receptor intacto en un modelo de vesícula unilamellar pequeño simple. El fragmento usado se terminó con una lisina (que está cargada positivamente a pH fisiológico) en un extremo y con un ácido aspártico (que está cargado negativamente a pH fisiológico) en el otro. No se esperaría que este péptido se inserte fácilmente en una membrana biológica.

Por el contrario, este ejemplo se refiere a modulación, especialmente inhibición, de actividades biológicas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) mediante su exposición a moléculas que interfieren con el ensamblaje correcto del receptor. En particular, péptidos, fragmentos y/o péptidos consenso recombinantes, sintéticos y/o aislados del dominio transmembrana del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) inhiben transducción de señal mediada por Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Pueden añadirse restos cargados en un extremo para promover la orientación correcta del péptido en la membrana. En particular, la adición de dos restos cargados negativamente, tales como Asp, en el extremo extracelular del fragmento mejora la actividad antagonista.

Pueden sintetizarse fragmentos del dominio transmembrana mediante síntesis peptídica de fase sólida de flujo continuo en sintetizador peptídico 432A de Applied Biosystems utilizando derivados aminoácidos Fmoc. Para superar la agregación que puede producirse durante la síntesis de los péptidos y que puede conducir a bloqueo de la cadena peptídica creciente, se introducen derivados FmocHmb de Ala, Val y Leu. Se añaden restos cargados al extremo del péptido para asegurar una orientación apropiada de los péptidos durante la penetración en la membrana celular y para mejorar la solubilidad de los péptidos hidrófobos. La pureza de los péptidos se evalúa por HPLC de fase inversa y las estructuras se confirman por espectrometría de masas del tiempo de vuelo de desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) (Tarasova *et al.*, Ad. Exp. Med. Biol., Plenum Press, NY, pág. 201-206 (1998).

El efecto antagonista de los fragmentos se ensaya en células de carcinoma de riñón humano (HEK) que expresan de forma estable el Receptor de Quimiocina de proteína G. Se usa RANTES como el agonista. Se incuban células crecidas en portaobjetos de cámara con cubreobjetos Nunc con AM/Fura-2 1  $\mu$ M durante 20 minutos en un incubador de CO<sub>2</sub>, se aclaran con PBS y se montan en la plataforma de un microscopio invertido Zeiss Axiovert. Se realizan mediciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  usando un sistema de formación de imágenes digital Attofluor (Atto Instruments). Se controla la fluorescencia mediante una cámara CCD intensificada usando un filtro de corte 505. Se realizan calibraciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  usando patrones de  $\text{Ca}^{2+}$  que contienen Fura 1  $\mu$ M. La actividad antagonista de los fragmentos se optimiza adicionalmente como se describe en los Ejemplos 1-4 del documento WO 99/43711.

La actividad antagonista de los fragmentos también se ensaya por la capacidad para inhibir fusión celular de VIH-Receptor de Quimiocina de proteína G y la capacidad para inhibir la unión de un ligando marcado del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) por métodos bien conocidos en la técnica como se describe para CXCR4 en el documento WO 99/43711.

## 5 **Ejemplo 51**

### ***Linfocitos T Inmortalizados Con Virus del Herpes que Expresan el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)***

La construcción de una línea celular de linfocitos T inmortalizada con Virus del Herpes que expresa el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se describe en Vella, *et al.*, J. Virol. Methods 79: 51-63 (1999). Esta o una línea celular similar es útil para ensayar agonistas y antagonistas en los métodos descritos en la presente memoria.

## **Ejemplo 52**

### ***Aislamiento de ligandos de CCR5 y Anticuerpos anti-CCR5***

Un método general para solubilizar CCR5 en su estado nativo que puede usarse en ensayos de exploración de ligando y anticuerpo se describe en Mirzabekov *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 28745-50 (1999). Un método para seleccionar anticuerpo de CCR5 de una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos humanos se describe en Osbourn *et al.*, Nat. Biotechnol. 16: 778-81 (1998). Lee *et al.* describe que el epítipo reconocido por el anticuerpo específico de CCR5 2D7 es una diana preferida para anticuerpos para inhibir la entrada de VIH. Lee *et al.* J. Biol. Chem. 274: 9617-26 (1999). Otros métodos de exploración para ligandos y anticuerpos se conocen bien en la técnica y se describen en la presente memoria.

## 20 **Ejemplo 53**

### ***Ensayos para Neutralización de Anticuerpos***

Un ensayo basado en línea celular para medir neutralización de VIH-1 por anticuerpo se describe en Trkola *et al.*, J. Virol. 73: 8966-74 (1999). Un ensayo para anticuerpos que neutralizan VIH y explorar con respecto a una molécula que inhibe unión o entrada de VIH en cualquier etapa se describe en Boritz *et al.*, J. Virol. 73: 6937-45 (1999). Un método para analizar inhibición del correceptor se describe en Klasse *et al.*, J. Virol. 73: 7453-66 (1999). Métodos adicionales para ensayar neutralización de entrada, fusión, replicación, etc. de VIH se conocen bien en la técnica y se describen en la presente memoria.

## **Ejemplo 54**

### ***Generación de anticuerpos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) usando Cepas de Xenomouse™.***

Las cepas de ratón Xenomouse™ obtenidas por ingeniería genética para expresar un repertorio de anticuerpos kappa/IgG2 o Kappa/IgM humanos se obtuvieron de Abgenix, Inc, (Fremont, CA). Se inmunizaron grupos de ratones de acuerdo con los siguientes programas:

Programa de inmunización 1 (fusión de XF3):

35 Se inyectaron inicialmente a ratones Xenomouse™ (n=5) en la base de la cola 100 microgramos en PBS de un vector de expresión plasmídico de ADN que codifica el gen del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de longitud completa (CCR5 pcDNA3T). Esto se siguió de tres inyecciones subcutáneas proporcionadas a intervalos de dos semanas, consistiendo cada una en 10 millones de células CHO transfectadas con un vector de expresión de CCR5 (en lo sucesivo en la presente memoria "células CCR5 CHO") en adyuvante incompleto de Freund. Se permitió descansar a los animales durante 12 semanas y después se suministraron dos inyecciones subcutáneas más, separadas por dos semanas, consistiendo cada una en 10 millones de células NSO transfectadas con un vector de expresión de CCR5 (en lo sucesivo en la presente memoria "células CCR5 NSO") en adyuvante incompleto de Freund. Tres días después de la última inyección se sacrificó a los ratones y se recogieron las células de ganglios linfáticos y/o bazo con el fin de generar hibridomas. Los hibridomas generados de esta fusión se denominan "XF3.----" (Tabla 4).

Programa de inmunización 2 (fusión de XF6):

Se inyectaron inicialmente a ratones Xenomouse™ (n=5) por vía intraperitoneal 7 millones de células CCR5 CHO en adyuvante completo de Freund. Esto se siguió de seis inyecciones intraperitoneales suministradas a intervalos de dos semanas, consistiendo cada una en 10 millones de células CCR5 CHO. Se permitió descansar a los animales durante 5 semanas y después se suministraron dos inyecciones intraperitoneales más, separadas por dos semanas, consistiendo cada una en 10 millones de células CCR5 NSO en adyuvante incompleto de Freund. Tres días después de la última inyección se sacrificó a los ratones y se recogieron células de ganglio linfático y/o bazo con el fin de generar hibridomas. Los hibridomas generados de esta fusión se denominan "XF6.---" (Tabla 4).

## Programa de inmunización 3 (fusión de XF7):

- Se inyectaron inicialmente a ratones Xenomouse™ (n=5) en la base de la cola 7 millones de células CCR5 CHO en adyuvante completo de Freund. Esto se siguió de seis inyecciones adicionales en la base de la cola suministradas a intervalos de dos semanas, consistiendo cada una en 10 millones de células CCR5 CHO. Se permitió descansar a los animales durante 5 semanas y después se suministraron dos inyecciones más en la base de la cola, separadas por dos semanas, consistiendo cada una en 10 millones de células CCR5 NSO en adyuvante incompleto de Freund. Tres días después de la última inyección se sacrificó a los ratones y se recogieron células de ganglio linfático y/o bazo con el fin de generar hibridomas. Los hibridomas generados de esta fusión se denominan "XF7.----" (Tabla 4).

## Programa de inmunización 4 (fusión de XF11):

- Se inmunizó a ratones Xenomouse™ (n=5) mediante inyección en las almohadillas plantares suministrada a intervalos de dos semanas. Cada inmunización consistió en un total de 10 millones de células CCR5 NSO en adyuvante de RIBI. Se administraron un total de ocho inmunizaciones tales. Tres días después de la última inyección se sacrificó a los ratones y se recogieron células de ganglio linfático y/o bazo con el fin de generar hibridomas. Los hibridomas generados de esta fusión se denominan "XF11.----" (Tabla 4).

## Programa de inmunización 5 (fusión de XF12):

- Se inmunizó inicialmente a ratones Xenomouse™ (n=5) con 10 millones de células CCR5 NSO en adyuvante completo de Freund administradas mediante una combinación de vías intraperitoneales y subcutáneas. Esto se siguió de seis inmunizaciones adicionales, suministradas a intervalos de dos semanas, consistiendo cada una en 10 millones de células CCR5 CHO en adyuvante incompleto de Freund, también administradas mediante una combinación de vías intraperitoneal y subcutánea. Se sacrificó un animal para fusión tres días después de la tercera inmunización de sensibilización en adyuvante incompleto de Freund. Tres días después de la última inyección los ratones restantes se sacrificaron y se recogieron células de ganglio linfático y/o bazo con el fin de generar hibridomas. Los hibridomas generados de esta fusión se denominan "XF12.----" (Tabla 4).

## Programa de inmunización 6 (fusión XF27/28):

Programa de inmunización de CCR5/XF27&28 FP					
Animales, 20 ratones					
Nº de Día	Acción	Antígeno	Cantidad	Volumen	Adyuvante
Día 1	Inyección	células CCR5 NSO	FP 5x10 <sup>6</sup> células/ms	50 µl	1:1 PBS/RIBI
Día 14	Inyección	células CCR5 NSO	FP 5x10 <sup>6</sup> células/ms	50 µl	1:1 PBS/RIBI
Día 28	Inyección	células CCR5 NSO	FP 5x10 <sup>6</sup> células/ms	50 µl	1:1 PBS/RIBI
Día 38	Inyección	células CCR5 NSO	FP 5x10 <sup>6</sup> células/ms	50 µl	PBS
Día 41	Fusión				

- Se generaron hibridomas de acuerdo con protocolos que se conocen habitualmente en la técnica. El compañero de fusión usado para generar estos hibridomas fue P3X63-AG8.653 obtenido de la ATCC, Lote F11545.

Los anticuerpos producidos por estos hibridomas se exploraron con respecto a la capacidad para unirse a CCR5 por exploración de FACS y ELISA.

### Exploración de ELISA de Membrana con Respecto a anticuerpos Específicos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)

- Preparación de Membrana Plasmática.* Se prepararon membranas plasmáticas de células CCR5 CHO y células CHO transfectadas con control del vector. Brevemente, se suspendieron entre 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> células CCR5 CHO o CHO en 40-50 mililitros de Tris 12 mM frío, pH 7,5, sacarosa 250 mM. Se lisaron las células en hielo, mediante homogenización usando un homogeneizador eléctrico de velocidad variable. Se confirmó la lisis celular por microscopía. El homogeneizado celular se centrifugó a 270 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante (que contenía las membranas plasmáticas) se recogió mientras que el sedimento (que contenía la fracción nuclear) se descartó. A continuación se centrifugó el sobrenadante a 8000 x g, durante 10 minutos a 4°C. De nuevo se recogió el sobrenadante (que contenía las membranas plasmáticas) mientras que se descartó el sedimento (que contenía las fracciones lisosomal y mitocondrial). Las membranas plasmáticas se separaron por centrifugación del sobrenadante en una ultracentrífuga a 100.000 x g durante 60 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante. Las membranas plasmáticas sedimentadas se resuspendieron en aproximadamente 1 ml de PBS. Después de la resuspensión el volumen de membranas plasmáticas se llevó a 5-10 ml con PBS adicional. La solución de membrana se mantuvo en

hielo y se sonicó (en hielo) hasta que se obtuvo una solución uniforme. Se tuvo cuidado de no sobrecalentar la solución durante la sonicación. La concentración de proteína de membrana plasmática se determinó usando el kit de determinación de proteínas BCA disponible de Pierce Chemical Company (Rockford Illinois). Las membranas plasmáticas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

- 5 **ELISA de Membrana.** Se recubrieron 4 placas Immulon (Dynex) con 50 microlitros de membranas plasmáticas de CHO transfectadas con control de vector o CCR5 CHO (las soluciones de membrana estaban a una concentración de 20 microgramos/mililitro) durante una noche a 4°C. La mañana siguiente, las placas se lavaron tres veces con PBST (PBST=PBS que contiene Tween20 0,01%). Las placas se bloquearon después durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 microlitros/pocillo de BSA/PBS 3%. La solución de bloqueo se retiró de las placas y se añadieron 10 50 microlitros/pocillo de muestras (sobrenadante de hibridoma) y controles a las placas y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4°C. Cada muestra/control se ensayó con respecto a unión con ambas membranas de CCR5 CHO así como membranas de CHO transfectadas con vector control. A continuación las placas se lavaron tres veces con PBST. Después del lavado, se añadieron 50 microlitros/pocillo de anticuerpo secundario (IgG anti Humano de Cabra de Vector (H+L) a 0,25 µg/ml en BSA/PBST 0,1% + suero de cabra 1%) a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Mientras se incubaban las placas, se preparó el reactivo ABC (Vector Laboratories). La placa se lavó después tres veces con PBST. A continuación se 15 añadieron 50 microlitros/pocillo de ABC diluido a las placas y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron después 6 veces con PBST. Se añadieron 100 microlitros/pocillo de reactivo TMB (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) a los pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La 20 reacción se detuvo después mediante la adición de 25 microlitros/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. La placa se leyó a 405 nm.

**Resultados.** 238 hibridomas mostraron unión a membranas de células CCR5 CHO, de las que aproximadamente la mitad mostró aumento de unión con membranas de CCR5 CHO en comparación con membranas de CHO transfectadas con control de vector. 217 (Tabla 4) de estos hibridomas se expandieron y se repitió el ELISA de membrana. Los resultados de la segunda exploración demostraron que los resultados de este procedimiento de 25 exploración eran reproducibles.

**Tabla 4: Hibridomas que secretan anticuerpos que se unen a membranas de CCR5 CHO**

Fusión de XF3	Fusión de XF6	Fusión de XF7	Fusión de XF11	Fusión de XF12
XF3.10B8	XF6.LNG9	XF7.1A10	XF11.1 E2	XF12.10B2
XF3.10C4	XF6.4D11	XF7.2 E10	XF11.1 E6	XF12.11F5
XF3.10G4	XF6.LNC6	XF7.2A2	XF11.1A11	XF12.12B11
XF3.10H12	XF6.LNF6	XF7.2C4	XF11.1A2	XF12.13H6
XF3.11B5	XF6.LNC11	XF7.3A5	XF11.1A8	XF12.15B11
XF3.13D3	XF6.LND9	XF7.3H1	XF11.1B10	XF12.1B8
XF3.14E12	XF6.LNF2	XF7.3H2	XF11.1B12	XF12.2E1
XF3.15C2		XF7.3H8	XF11.1B4	XF12.2E12
XF3.15F6		XF7.4 E8	XF11.1B7	XF12.2H5
XF3.2A3		XF7.4E9	XF11.1B9	XF12.2H8
XF3.2E5		XF7.4A6	XF11.1C1	XF12.3E2
XF3.3H1		XF7.4B2	XF11.1C7	XF12.3A9
XF3.4B6		XF7.4G3	XF11.1D10	XF12.3C2
XF3.4C5		XF7.4G7	XF11.1D8	XF12.3G11
XF3.5F1		XF7.4H4	XF11.1F8	XF12.4A8
XF3.6A1		XF7.4H7	XF11.1G11	XF12.4G7
XF3.6A2		XF7.5A1	XF11.1G8	XF12.5B10
XF3.6H11		XF7.5B8	XF11.1H7	XF12.5B11

Fusión de XF3	Fusión de XF6	Fusión de XF7	Fusión de XF11	Fusión de XF12
XF3.7C11		XF7.5B9	XF11.2 E4	XF12.5F1
XF3.8D5		XF7.5H8	XF11.2 E5	XF12.5H1
XF3.8G10		XF7.6B11	XF11.2B9	XF12.6B12
XF3.9G3		XF7.6B12	XF11.2C9	XF12.6H1
XF3.LNA2		XF7.6B3	XF11.2D1	XF12.6H7
XF3.LNB12		XF7.6D12	XF11.2D10	XF12.7F12
XF3.LNC10		XF7.6D3	XF11.2D11	XF12.LND11
XF3.LNC11		XF7.6D7	XF11.2D5	
XF3.LNC2		XF7.7A9	XF11.2D8	
XF3.LNC3		XF7.7B6	XF11.2F3	
XF3.LNC4		XF7.7C11	XF11.2F5	
XF3.LNC6		XF7.7C4	XF11.2F6	
XF3.LND9		XF7.7E8	XF11.2F7	
XF3.LNE7		XF7.7F8	XF11.2F8	
XF3.LNF1		XF7.7G4	XF11.2F9	
XF3.LNH5		XF7.LN1B1	XF11.2G11	
		XF7.LN1B7	XF11.2G4	
		XF7.LN1D10	XF11.2G6	
		XF7.LN1D11	XF11.2G8	
		XF7.LN1D9	XF11.2G9	
		XF7.LN1E10	XF11.2H10	
		XF7.LN1E11	XF11.2H2	
		XF7.LN1E12	XF11.2H4	
		XF7.LN2A11	XF11.2H8	
		XF7.LN2A7	XF11.3A3	
			XF11.3B10	
			XF11.3B9	
			XF11.3C3	
			XF11.3C6	
			XF11.3C7	
			XF11.3D1	
			XF11.3D12	
			XF11.3D2	

Fusión de XF3	Fusión de XF6	Fusión de XF7	Fusión de XF11	Fusión de XF12
			XF11.3D3	
			XF11.3F4	
			XF11.3G12	
			XF11.3G2	
			XF11.3G3	
			XF11.3H7	
			XF11.4E11	
			XF11.4A1	
			XF11.4A5	
			XF11.4B10	
			XF11.4B12	
			XF11.4B3	
			XF11.4B4	
			XF11.4C10	
			XF11.4C12	
			XF11.4C4	
			XF11.4D10	
			XF11.4D12	
			XF11.4D3	
			XF11.4D4	
			XF11.4D5	
			XF11.4F11	
			XF11.5 E2	
			XF11.5A2	
			XF11.5C10	
			XF11.5D12	
			XF11.5F2	
			XF11.5F3	
			XF11.5G10	
			XF11.5G11	
			XF11.5G4	
			XF11.5G5	
			XF11.5G6	

Fusión de XF3	Fusión de XF6	Fusión de XF7	Fusión de XF11	Fusión de XF12
			XF11.5H1	
			XF11.5H4	
			XF11.5H5	
			XF11.6E12	
			XF11.6E4	
			XF11.6E7	
			XF11.6A3	
			XF11.6A5	
			XF11.6B3	
			XF11.6B4	
			XF11.6B9	
			XF11.6C11	
			XF11.6C5	
			XF11.6D7	
			XF11.6D8	
			XF11.6D9	
			XF11.6F2	
			XF11.6F9	
			XF11.6G1	
			XF11.6G6	
			XF11.6H11	
			XF11.6H2	
			XF11.6H4	
			XF11.6H7	

#### Exploración de FACS con Respecto a Anticuerpos Específicos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)

Se recolectaron células CHO transfectadas con control de vector o transfectadas con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), se lavaron con tampón FACS (PBS con NaN<sub>3</sub> 0,1% y BSA 0,1%). Se distribuyeron un millón de células en 100 µl a tubos de FACS (Falcon 2052). Se añadieron 10 microlitros de sobrenadante de hibridoma a cada tubo y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Cada sobrenadante se analizó con respecto a unión con células CHO transfectadas con vector control y CCR5 CHO. Las células se lavaron y resuspendieron en 100 microlitros de tampón FACS y se añadieron 10 microlitros de IgG anti-Humano de Cabra biotinilado (H+L) (Vector) a 1 microgramo/mililitro en los tubos y se incubó durante 20 minutos a 4° C. Se lavaron las células, se resuspendieron en 100 microlitros de tampón de FACS y se añadieron 5 mililitros de estreptavidina PE (DAKO) seguido de una incubación durante 10 minutos a 4 grados C. Se lavaron las células, se resuspendieron en 200 microlitros de tampón de FACS que contiene yoduro de propidio 0,5 microgramos/mililitro y se analizaron en FACScan (Becton Dickinson).

**Resultados.** De los 217 sobrenadantes de hibridomas explorados por análisis de FACS, se identificó que XF11.1D8, XF11.4D10, XF11.4C4, XF11.5H1 y XF11.1G8 mostraban aumento significativo de la unión con CCR5 CHO en comparación con células CHO transfectadas con vector control.

Se produjeron hibridomas adicionales y sus sobrenadantes se exploraron con respecto a anticuerpos específicos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Se descubrió que varios de estos tenían un aumento significativo de la unión con CCR5 en comparación con controles. Se describen en la presente memoria como anticuerpos preferidos y se enumeran en la Tabla 2.

## 5 Ejemplo 55

### Identificación y Clonación de dominios VH y VL

- Un método para identificar y clonar dominios VH y VL de líneas celulares que expresan un anticuerpo particular es realizar PCR con cebadores específicos de VH y VL en ADNc preparado de las líneas celulares que expresan anticuerpo. Brevemente, se aísla ARN de las líneas celulares y se usa como un molde para RT-PCR diseñada para amplificar los dominios VH y VL de los anticuerpos expresados por las líneas celulares con VEB. Pueden lisarse células en el reactivo TRIzol® (Life Technologies, Rockville, MD) y extraerse con un volumen de cloroformo de un quinto. Después de la adición del cloroformo, se permite que la solución se incube a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifuga a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga de sobremesa. Se recoge el sobrenadante y se precipita ARN usando un volumen igual de isopropanol. El ARN precipitado se sedimenta por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga de sobremesa. Después de la centrifugación, se descarta el sobrenadante y se lava con etanol 75%. Después del lavado, el ARN se centrifuga de nuevo a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se descarta y se permite que el sedimento se seque al aire. El ARN se disuelve después en agua DEPC y se calienta a 60°C durante 10 minutos. Pueden determinarse las cantidades de ARN usando mediciones de densidad óptica.
- Puede sintetizarse ADNc, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, de 1,5-2,5 microgramos de ARN usando transcriptasa inversa y cebadores hexaméricos aleatorios. Se usa después ADNc como un molde para amplificación por PCR de dominios VH y VL. Los cebadores usados para amplificar genes de VH y VL se muestran en la Tabla 5. Típicamente una reacción de PCR hace uso de un cebador 5' sencillo y un cebador 3' sencillo. En ocasiones, cuando la cantidad de molde de ARN disponible es limitante, o para una mayor eficacia, pueden usarse grupos de cebadores 5' y/o 3'. Por ejemplo, en ocasiones se usan los cinco cebadores VH-5' y todos los cebadores JH3' en una única reacción de PCR. La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen de 50 microlitros que contiene tampón de PCR 1X, dNTP 2 mM cada uno, 0,7 unidades de Taq polimerasa de Alta Fidelidad, mezcla de cebadores 5', mezcla de cebadores 3' y 7,5 microlitros de ADNc. La mezcla de cebador 5' y 3' de tanto VH como VL puede prepararse agrupando 22 pmol y 28 pmol, respectivamente, de cada uno de los cebadores individuales. Las condiciones de PCR son: 96°C durante 5 minutos; seguido de 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto; seguido de un ciclo de extensión de 72°C durante 10 minutos. Después de que se complete la reacción, se almacenan los tubos de ensayo a 4°C.

Tabla 5: Secuencias de Cebadores Usadas para Amplificar dominios VH y VL

Nombre del cebador	SEC ID N°	Secuencia del cebador (5'-3')
Cebadores de VH		
Hu VH1-5'	23	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
Hu VH2-5'	24	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
Hu VH3-5'	25	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
Hu VH4-5'	26	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
Hu VH5-5'	27	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC
Hu VH6-5'	28	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
Hu JH1,2-5'	29	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
Hu JH3-5'	30	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
Hu JH4,5-5'	31	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
Hu JH6-5'	32	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC
Cebadores de VL		
Hu Vkappa1-5'	33	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
Hu Vkappa2a-5'	34	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC



Hu Vkappa2b-5'	35	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC
Hu Vkappa3-5'	36	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC
Hu Vkappa4-5'	37	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
Hu Vkappa5-5'	38	GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
Hu Vkappa6-5'	39	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
Hu Vlamba1-5'	40	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Vlamba2-5'	41	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Hu Vlamba3-5'	42	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Vlamba3b-5'	43	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Vlamba4-5'	44	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Vlamba5-5'	45	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Hu Vlamba6-5'	46	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA
Hu Jkappa1-3'	47	ACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa2-3'	48	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
Hu Jkappa3-3'	49	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC
Hu Jkappa4-3'	50	ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa5-3'	51	ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
Hu Jlamba1-3'	52	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Jlamba2-3'	53	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Hu Jlamba3--3'	54	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Jlamba3b-3'	55	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Jlamba4-3'	56	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Jlamba5-3'	57	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Hu Jlamba6-3'	58	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA

**Tabla 6: Anticuerpos Anti-CCR5 XF11.1D8, XF22.3C9 (por ejemplo, XF22.3C9.6) y XF22.9E6**

Línea Celular de Híbrido/Anticuerpo	ADN de VH SEC ID N°:	Proteína VH SEC ID N°:	Aminoácidos de VH CDR1	Aminoácidos de VH CDR2	Aminoácidos de VH CDR3	ADN de VL SEC ID N°:	Proteína VL SEC ID N°:	Aminoácidos de VL CDR1	Aminoácidos de VL CDR2	Aminoácidos de VL CDR3	Número de Depósito de ATCC	Fecha de Depósito en ATCC
XF11.1D8	59	60	31-35	50-65	98-110	61	62	24-35	51-57	90-98	PTA-3030	7 de febrero de 2001
XF22.3C9	63	64	31-35	50-68	102-115	65	66	24-34	50-56	89-97	PTA-3702	12 de septiembre de 2001
XF22.9E6	67	68	31-35	50-65	98-115	69	70	24-35	51-57	90-98	PTA-3859	14 de noviembre de 2001

Las muestras de PCR se someten después a electroforesis en un gel de agarosa 1,3%. Las bandas de ADN de los tamaños esperados (~506 pares de bases para dominios VH y 344 pares de bases para dominios VL) pueden cortarse del gel y purificarse métodos bien conocidos en la técnica. Los productos de PCR purificados pueden ligarse en un vector de clonación de PCR (vector TA de Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). Pueden aislarse productos de PCR clonados individuales después de transfección de *E. coli* y selección de color azul/blanco. Los productos de PCR clonados pueden secuenciarse después usando métodos conocidos de forma habitual en la técnica. Las secuencias polinucleótídicas y de aminoácidos de los dominios VH y VL de anticuerpos anti-CCR5 XF11.1D8, XF22.3C9.6 y XF22.9E6 se muestran en las FIGURAS 4, 5 y 6 (véase también, Tabla 6).

Las bandas de PCR que contienen el dominio VH y los dominios VL también pueden usarse para crear vectores de expresión de Ig de longitud completa. Los dominios VH y VL pueden clonarse en vectores que contienen las secuencias de nucleótidos de regiones constantes de una cadena pesada (por ejemplo, IgG1 humana o IgG4 humana) o ligera ( $\kappa$  humana o  $\lambda$  humana) de modo que podría expresarse una molécula de cadena pesada o ligera completa a partir de estos vectores cuando se transfectan en una célula hospedadora apropiada. Además, cuando las cadenas ligera y pesada clonadas se expresan ambas en una línea celular (a partir de uno o dos vectores), pueden ensamblarse en una molécula de anticuerpo funcional completa que se secreta en el medio de cultivo celular. Los métodos que usan polinucleótidos que codifican dominio de anticuerpo VH y VL para generar vectores de expresión que codifican moléculas de anticuerpo completas se conocen bien en la técnica.

### **Ejemplo 56**

#### **Ensayo de Inmunofluorescencia**

Puede usarse el siguiente protocolo de inmunofluorescencia, por ejemplo, para verificar expresión del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en células o para comprobar la presencia de uno o más anticuerpos que se unen al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) expresado en la superficie de células. Brevemente, se recubren portaobjetos de cámara Lab-Tek II a 4°C durante una noche con colágeno bovino de Tipo II 10 microgramos/mililitro en DPBS que contiene calcio y magnesio (DPBS++). Los portaobjetos se lavan después dos veces con DPBS++ frío y se siembran con 8000 células transfectadas con CHO-CCR5 o CHO pC4 en un volumen total de 125 microlitros y se incuban a 37°C en presencia de oxígeno 95%/dióxido de carbono 5%. El medio de cultivo se retira por aspiración suave y las células adheridas se lavan dos veces con DPBS++ a temperatura ambiente. Los portaobjetos se bloquean con DPBS++ que contiene BSA 0,2% (bloqueador) a 0-4°C durante una hora. La solución de bloqueo se retira por aspiración suave y 125 ml de solución que contiene anticuerpos (una solución que contiene anticuerpos puede ser, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo de hibridoma que habitualmente se usa no diluido o suero/plasma que habitualmente se usa diluido-aproximadamente una dilución 1/100). Los portaobjetos se incuban durante 1 hora a 0-4°C. Las soluciones de anticuerpo se retiran después por aspiración suave y las células se lavan 5 veces con 400 microlitros de solución de bloqueo helada. A continuación, se añaden 125 microlitros de un anticuerpo secundario marcado con rodamina 1 microgramo/mililitro (por ejemplo anti IgG humana) en el bloqueador a las células. De nuevo, las células se incuban durante 1 hora a 0-4°C. La solución de anticuerpo secundario se retira después por aspiración suavemente y las células se lavan 3 veces con 400  $\mu$ l de solución de bloqueo helada y 5 veces con DPBS++ frío. Las células se fijan después con 125  $\mu$ l de formaldehído 3,7% en DPBS++ durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavan 5 veces con 400  $\mu$ l de DPBS++ a temperatura ambiente. Finalmente, las células se montan en glicerol acuoso 50% y se observan en un microscopio de fluorescencia usando filtros de rodamina.

### **Ejemplo 57**

#### **Transferencia de Western para detectar unión al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) es una proteína incluida en membrana. Para realizar una transferencia de Western en proteínas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), primero deben solubilizarse las membranas celulares. El siguiente protocolo se desarrolló por Mirzabekov *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 28745 (1999) que se incorpora por la presente en su totalidad por referencia en la presente memoria. Una suspensión celular sencilla de células CHO con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o células pC4-CHO (CHO control transfectadas con vector), se sedimenta y resuspende en tampón de solubilización compuesto de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  100 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) y Cymal™-5 1% (p/v) (Anatrace Inc., Maumee, OH) y mezcla de inhibidor de proteasa (un comprimido de Complete™ (Roche Molecular Biochemicals) por 25 ml). Después de una incubación de 30 minutos a 4°C en una plataforma de balanceo, las muestras se centrifugan durante 30 minutos a 14.000 x g para retirar los residuos celulares. Se inmunoprecipita el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de la membrana solubilizada usando, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) 2D7 descrito en Wu *et al.*, J. Exp. Med. 186: 1373 (1997) conjugado con perlas de sefarosa. Después de inmunoprecipitación, las perlas se lavan exhaustivamente con tampón de solubilización y se resuspenden en tampón de muestra SDS 2X. Las muestras se incuban en tampón de muestra-SDS durante 1 hora a 55°C antes de electroforesis a través de un gel de poliacrilamida-SDS 11%. Después puede llevarse a cabo transferencia de Western en las muestras del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) de acuerdo con protocolos convencionales conocidos en la técnica.

**Ejemplo 58****Transferencia de Western, Inmunoprecipitación y Purificación del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).**

- 5 El protocolo de solubilización de membrana o Mirzabekov *et al* descrito en el Ejemplo 57 anterior también puede usarse para preparar muestras que contienen Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para transferencia de Western, inmunoprecipitación o purificación.

**Ejemplo 59****Análisis de BIAcore de la Afinidad de los Polipéptidos que se unen al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

- 10 La unión de anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), por ejemplo, puede analizarse por análisis de BIAcore. El Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (u otro antígeno para el que se desea conocer la afinidad de un anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)) o anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede inmovilizarse covalentemente con una microplaca sensora BIAcore (microplaca CM5) mediante grupos amino usando química de N-etil-N'-(dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida. Diversas diluciones de anticuerpos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) o Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (u otro antígeno para el que se desea conocer la afinidad de un anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)), se hacen fluir respectivamente sobre la microplaca de CM5 derivatizada en celdas de flujo a 15 microlitros/minuto para un volumen total de 50 microlitros. La cantidad de proteína unida se determina durante el lavado de la celda de flujo con tampón HBS (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, tensioactivo p20 0,005%). La especificidad de unión para la proteína de interés se determina por competición con competidor soluble en presencia de la proteína de interés.

- 25 La superficie de la celda de flujo puede regenerarse mediante el desplazamiento de proteína unida por lavado con 20 microlitros de glicina-HCl 10 mM, pH 2,3. Para análisis cinético, las células de flujo se ensayan a diferentes caudales y diferentes densidades polipeptídicas en la microplaca CM5. Las tasas de asociación y tasas de disociación pueden determinarse usando el programa de evaluación cinética en un software BIAevaluation 3.

**Ejemplo 60****Ensayo de Neutralización de Virus**

- 30 Pueden ensayarse anticuerpos de la invención con respecto a su capacidad para inhibir o reducir la capacidad de VIH-1 para infectar células (que expresan CCR5) usando un ensayo de neutralización de virus tal como el ensayo descrito en Zolla-Pazner y Sharpe, AIDS Res. Hum. Retrovir. 11: 1449 (1995) que se incorpora en su totalidad por referencia en la presente memoria. Brevemente, se añaden  $2 \times 10^5$  PBMC en reposo a dilución o diluciones apropiadas de anticuerpos de la invención. Después de una hora de incubación, las células se exponen a virus durante 2 horas, se lavan y se resuspenden en medio de cultivo que contiene PHA e IL-2. A diversos puntos temporales después de la infección, tales como los días 7 y 9, la cantidad de antígeno p24 de VIH en el sobrenadante de cultivo se mide usando ELISA. El porcentaje de neutralización se calculó en relación con un experimento control en el que se permitió que VIH infectara células en ausencia de anticuerpos de la invención o como alternativa (o además), en presencia de un anticuerpo control (de isotipo coincidente, si es necesario) con especificidad irrelevante.
- 40 Una variación de este ensayo es realizarlo en PBMC activadas, en lugar de en reposo. Esto puede conseguirse cultivando las PBMC en presencia de PHA e IL-2 durante dos días antes de realizar el ensayo de neutralización de virus.

**Ejemplo 61****Ensayo de Unión de MIP-1beta**

- 45 Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse con respecto a su capacidad para evitar que un ligando natural de CCR5, por ejemplo MP1-beta, se una al receptor CCR5.

El siguiente ensayo de unión de  $^{125}$ I-MIP1-beta es un ejemplo de un ensayo que podría realizarse para determinar la capacidad de un anticuerpo de la invención para evitar que un ligando natural de CCR5, MIP1-beta, se una al receptor CCR5.

- 50 Se disuelven veinticinco microCurios de  $^{125}$ I-MIP-1beta (Amersham Pharmacia Biotech, N° Cat. IM310, 25 microCurios, 2000 Ci/mmol) en 1 mililitro de agua destilada para preparar una solución madre de 12,5 nM. Si se usan células cultivadas, tales como células CCR5 CHO, en este experimento, estas se tripsinizan, se lavan y se resuspenden a  $10 \times 10^6$  células/mililitro en tampón de unión (CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Hops 50 mM, BSA 0,5%, NaN<sub>3</sub> 0,1%, pH 7,5). Si van a usarse células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en este ensayo, estas se

aíslan de donantes sanos y se resuspenden a  $2 \times 10^6$  células/mililitro en tampón de unión.

Para determinar que concentración o cantidad de MIP-1beta saturaría las células en este ensayo, se prepara una serie de diluciones de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta a cuatro veces la concentración final deseada (Por ejemplo, para concentraciones finales de 3 nM, debería prepararse una solución 12 nM). Típicamente, la concentración final deseada de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta varía de 3 nM hasta 0,05 nM. Adicionalmente, se prepara una solución de MIP-1beta frío (no radiactivo) a cuatro veces la concentración final deseada. Típicamente la concentración final deseada de MIP-1beta frío es 200 nM, de modo que se prepara una solución 800 nM.

Para medir la unión total de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta con células, se añaden 25 microlitros de tampón de unión, 25 microlitros de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta caliente y 50 microlitros de suspensión celular a una microplaca de 96 pocillos de fondo en U (Costa, Nº Cat. 3799). Las células siempre se añaden al final. Si la unión de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta no es específica, no se verá superada por competición de forma eficaz por MIP-1beta frío. Por lo tanto, para evaluar la especificidad de unión, se añaden 25 microlitros de MIP-1beta frío (800 nM), 25 microlitros de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta caliente (diversas diluciones) y 50 microlitros de suspensión celular a una microplaca de 96 pocillos de fondo en U. De nuevo las células siempre se añaden al final. Las mezclas se incuban después a temperatura ambiente en un agitador durante 1 hora. Después de la incubación, cada muestra se transfiere a la parte superior de tubos que contienen 200 microlitros de una mezcla oleosa (dibutil ftalato:dioctil ftalato 2:1). Los tubos se centrifugan a 12000 rpm durante 20 segundos usando una microcentrífuga. El fondo del tubo, que contiene el sedimento celular, se corta y se cuenta en un contador gamma. Si la unión de MIP-1beta es específica, se medirá menos radiactividad en el contador gamma en el ensayo de competición. Como control para asegurar que el MIT-1beta se une a Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), puede elegirse realizar el experimento en células adecuadas que no expresan CCR5, por ejemplo, células CHO transfectadas con vector.

Para realizar un ensayo de competición para determinar si una quimiocina o anticuerpo puede competir con MIP-1beta para unirse al mismo receptor acoplado a proteína G, se prepara una serie de diluciones de quimiocina fría o anticuerpo a cuatro veces las concentraciones finales deseadas. Adicionalmente, se prepara una solución de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta a cuatro veces la concentración final deseada. Para este tipo de ensayo de competición, se prepara una solución 2 nM de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta, que dará una concentración final de 0,5 nM.

Para medir la unión total de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta a las células, se añaden 25 microlitros de tampón de unión, 25 microlitros de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta caliente (2nM) y 50 microlitros de suspensión celular a una microplaca de 96 pocillos de fondo en U. Las células siempre se añaden al final. Si otra sustancia (por ejemplo, anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) u otra quimiocina) se une al receptor de MIP-1beta (es decir, Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)) la presencia de cantidades crecientes de sustancia fría (no radiactiva) (por ejemplo, anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) u otra quimiocina) competirá con respecto a unión con el receptor de MIP-1beta (es decir, Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)). Por lo tanto, para determinar si una sustancia se une al receptor de MIP-1beta (es decir, Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)) e inhibe la unión de MIP-1beta (marcado radiactivamente) con su receptor (es decir Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)), se añaden 25 microlitros de sustancia fría (por ejemplo, anticuerpo anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) a diversas diluciones), 25 microlitros de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1beta (2nM) caliente y 50 microlitros de suspensión celular a una microplaca de 96 pocillos de fondo en U. De nuevo las células siempre se añaden al final. Las mezclas se incuban después a temperatura ambiente en un agitador durante 1 hora. Después de la incubación, cada muestra se transfiere a la parte superior de tubos que contienen 200 microlitros de una mezcla oleosa (dibutil ftalato:dioctil ftalato 2:1). Los tubos se centrifugan a 12000 rpm durante 20 segundos usando una microcentrífuga. El fondo del tubo, que contiene el sedimento celular, se corta y se cuenta en un contador gamma. Si la unión de MIP-1beta es específica, se medirá menos radiactividad en el contador gamma en el ensayo de competición. Como control para asegurar que MIP-1beta se une al Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), puede elegirse realizar el experimento en células adecuadas que no expresan CCR5, por ejemplo, células CHO transfectadas con vector.

Un ensayo alternativo, pero similar, para determinar la capacidad de un anticuerpo de la invención para evitar que un ligando natural de CCR5, MIP-1beta, se una al receptor CCR5 se describe en Lopalco *et al.*, J. Immunol., 164: 3426 (2000) y en Trkola *et al.*, Nature, 384:184 (1996) que se incorporan en su totalidad por referencia en la presente memoria. Brevemente, se incuban  $10^6$  células que expresan CCR5 (por ejemplo, linfocitos T CD4+, células CHO transfectadas con CCR5) en hielo con dilución o diluciones apropiadas del anticuerpo de la invención. Después de 45 minutos de incubación, se añaden 0,2 microCurios de MIP1-beta radiomarcado (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ -MIP1-beta (DuPont-NEN, Boston, MA) a una concentración final de 0,1 nM. Después de una incubación de dos horas en hielo, se retira radiactividad no unida usando un gradiente de dos etapas, como se ha descrito en Grassi *et al.*, J Exp Med. 174: 53 (1991) que se incorpora en su totalidad por referencia en la presente memoria, en el que la capa inferior consiste en suero de ternero fetal que contiene sacarosa 10% y la capa superior consiste en silicona 80% (Sigma Aldrich) y aceite mineral 20% (Sigma Aldrich). La reactividad unida en sedimentos celulares se mide en un contador gamma.

### **Ejemplo 62**

#### **Ensayo de Quimiotaxis**

Los polipéptidos y agonistas o antagonistas de los mismos de la invención pueden ensayarse con respecto a su capacidad para mejorar, inhibir o no alterar significativamente la quimiotaxis de células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en respuesta a MIP1-beta. Las células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) pueden ser una población homogénea de células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) purificado o una población heterogénea, (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica, PBMC).

El siguiente ensayo para medir quimiotaxis inducida por MIP1-beta de células que expresan CCR5 implica marcar células con una molécula indicadora (fluorescente), inducir quimiotaxis en un pocillo de una placa de 96 pocillos que contiene un filtro a través del que pueden pasar las células y medir el número de células migradas mediante emisión de fluorescencia. Para realizar este ensayo se necesitan los siguientes materiales:

HBSS, sin calcio, sin magnesio (Biofluids N° Cat.: p 325-000)

Albúmina, Polvo Bovino, fracción V, sin IgG (Sigma N° Cat.: A-2058)

ChemoTx N° 105-2 (para linfocitos T, PBMC, células NK), 108-1(para eosinófilos, PMN) (Neuro Probe, Inc)

Calceína, AM (1 miligramo/ml en DMSO seco) (Molecular Probes N° Cat.: C-3099) PBS, 1X, pH 7,4, sin calcio ni magnesio (Biofluids N° Cat.: p 312-00)

Brevemente, las células (por ejemplo PBMC) se lavan dos veces con HBSS (Biofluids N° Cat.: p325-000)/BSA 0,1% y se resuspenden en el tampón a  $10 \times 10^6$  células/mililitro. Se añaden 5 microlitros de calceína AM (reserva de 1 miligramo/mililitro) a 1 mililitro de la suspensión celular. Las células se incuban en un incubador a 37°C con tapón suelto durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se lavan dos veces con HBSS/BSA 0,1% y se resuspenden a  $10 \times 10^6$ /mililitro en tampón HBSS/BSA 0,1%. Se añaden veintinueve microlitros de quimiocina de ensayo o tampón control en cámara inferior de la microplaca de quimiotaxis. El filtro se ajusta a la posición de la placa de 96 pocillos asegurando que no se meten burbujas de aire entre el filtro y la solución. A continuación, se cargan 20 microlitros de las células sobre el filtro y la placa se cubre para evitar evaporación. La placa se incuba después a 37°C durante 2 horas para linfocitos B, PBMC, PMN y células NK y 3 horas para eosinófilos. Después de incubación, enjuagar cuidadosamente la superficie superior del filtro con tampón PBS y retirar suavemente las células no migradas de la parte superior del filtro con una espátula. Medir la placa y filtrar a excitación de 485 nm/Emisión 530 nm usando lector de fluorescencia CytoFluor. Los resultados se expresan como índice quimiotáctico, que representa el incremento de veces en el número de células migradas en respuesta a quimiocina frente a la migración celular espontánea en medio de control.

Este protocolo puede modificarse fácilmente para ensayar si un agonista o antagonista del Receptor de Quimiocina de proteína G (por ejemplo anticuerpos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)) puede potenciar, inhibir o no alterar significativamente la capacidad de MIP-1 beta para inducir quimiotaxis en células que expresan CCR5. Para hacer esto, podrían preincubarse las células con anticuerpos anti-Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (posiblemente a varias concentraciones para generar una curva de respuesta a dosis) antes de cargar las células sobre el filtro.

Un ensayo alternativo para medir la capacidad de polipéptidos y agonistas o antagonistas de los mismos de la invención para mejorar, inhibir o no alterar significativamente la quimiotaxis de células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en respuesta a MIP-1beta puede realizarse en una cámara Transwell, en lugar de una microplaca de 96 pocillos. Para realizar este ensayo se necesitan los siguientes materiales.:

RPMI 1640 (GIBCO-BRL N° Cat.: 21870-084)

Albúmina, Polvo Bovino, fracción V, sin IgG (Sigma N° Cat.: A-2058)

Placa Transwell (Costar N° Cat.: 3421), diámetro de 6,5 mm, tamaño de poro de 5,0  $\mu$ m

MIP-1 $\beta$  (R&D Systems N° Cat.: 271-BME)

Medio de Separación de Linfocitos (ICN Biochemical N° Cat.: 50494)

Brevemente, se aíslan PBMC de sangre periférica humana fresca mediante el uso de medio de separación de linfocitos y se cultivan en RPMI-1640 con FBS 10% durante 2 días. Las PBMC cultivadas se resuspenden en RPMI 1640/BSA 0,5% a  $20 \times 10^6$  células/mililitro. MIP-1beta se diluye en RPMI-1640/BSA 0,5% hasta concentraciones finales de 10, 100 y 1000 nanogramos/ mililitro. Se añaden 600 microlitros de solución de MIP-1beta o RPMI 1640/BSA 0,5% solo a la cámara inferior del Transwell y se añaden 100 microlitros de la suspensión celular a la parte superior del filtro. Las células se incuban a 37°C durante 4 horas. Después de la incubación, se pueden recoger las células que migran al fondo de la cámara y después realizar un análisis de FACS, por ejemplo, para determinar el número y tipo de la población o poblaciones celulares migradas. Los resultados se expresan como índice quimiotáctico, que representa el incremento de veces en el número de células migradas en respuesta a quimiocina frente a migración celular espontánea en medio control.

Un ensayo adicional para determinar la capacidad de un anticuerpo de la invención para evitar que un ligando natural de CCR5, MIP1-beta, induzca a quimiotaxis en células que expresan MIP-1beta se describe en Lopalco *et al.*, J. Immunol., 164: 3426 (2000). Brevemente, las PBMC se activan (por ejemplo, con fitohemaglutinina e IL-2) durante 3 días en presencia de anticuerpos de la invención. Después se colocan  $3 \times 10^5$  PBMC activadas en 50 microlitros de 1640 RPMI que contiene albúmina de suero humano 3% en la cámara superior de un transwell de filtro desnudo con tamaño de poro de 5 micrómetros (CoStar). Se colocan 1,5 microgramos de MIP1-beta en las cámaras inferiores. Se permite que suceda la quimiotaxis durante media hora mientras que la cámara transwell se incubó a 37 grados Celsius. Las células que migraron de la cámara superior a la inferior se cuantificaron después por análisis de FACS. Los resultados se expresan en términos de un índice de migración, (es decir, el número de células que migran a una cámara inferior que contienen MIP1-beta / el número de células que migran a una cámara inferior que contienen solamente medio de control.

### **Ejemplo 63**

#### **Movilización de Calcio Después de Activar la Proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5)**

Cuando se activa el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), se moviliza calcio de almacenamientos intracelulares y de espacios extracelulares. Esta movilización de calcio puede controlarse usando indicadores de  $\text{Ca}^{++}$  fluorescente que pueden excitarse con luz ultravioleta, tal como por ejemplo, Fura-2, AM disponible de Molecular Probes, Eugene, OR (Nº Cat. F-1221). Un ensayo para controlar la movilización de calcio usando Fura-2 AM se describe a continuación.

Brevemente, se suspenden células (por ejemplo, PBMC purificadas o células transfectadas con CCR5 tales como células CCR5 CHO) a  $5 \times 10^6$  células/mililitro en tampón de calcio (tampón Hepes 20 mM, NaCl 125 mM, KCl 5 mM, glucosa 0,5 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, BSA 0,025%, pH 7,4). Se disuelve Fura-2, AM (50  $\mu\text{g}$ /frasco) en 25  $\mu\text{l}$  de DMSO. Las células se marcan con colorante añadiendo 1  $\mu\text{l}$  del Fura-1 AM a 2 ml de suspensión celular. Las células se incuban después durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavan dos veces con tampón de calcio y se suspenden a  $1 \times 10^6$  células / mililitro en tampón de calcio. Se colocan dos mililitros de la suspensión celular en una cubeta en agitación continua a 37°C. La concentración de  $[\text{Ca}^{++}]$  se mide usando longitudes de onda de excitación dobles 340 nm y 380 nm y una longitud de onda de emisión sencilla de 510 nm en un espectrofotómetro Hitachi. Se establece una medida inicial durante 60 segundos antes de añadir la quimiocina de ensayo o anticuerpo anti-Receptor acoplado a proteína G (CCR5). Se añaden después veinte microlitros de la quimiocina de ensayo (100 veces la concentración final) a la cubeta y se controlan los cambios en la concentración de calcio intracelular usando el espectrofotómetro. Este ensayo puede usarse, por ejemplo, si un anticuerpo anti-Receptor acoplado a proteína G (CCR5) es agonista (induce movilización de calcio) o antagonista (no induce movilización de calcio).

### **Ejemplo 64**

#### **Modelos de Cicatrización Defectiva en Glucocorticoides y Ratones Diabéticos**

##### **Modelo de Ratones Diabéticos db+/db+**

Para demostrar que el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) acelera el proceso de curación, se usa el modelo de cicatrización de ratones genéticamente diabéticos. El modelo de cicatrización de grosor completo en el ratón db+/db+ es un modelo bien caracterizado, clínicamente relevante y reproducible de cicatrización alterada. La curación de la herida diabética depende de la formación de tejido de granulación y reepitelización más que de contracción (Gartner, M. H: *et al.*, J. Surg. Res. 52: 389 (1992); Greenhalgh, D. G. *et al.*, Am. J. Pathol. 136: 1235 (1990)).

Los animales diabéticos tienen muchos de los elementos característicos observados en diabetes melitus Tipo II. Los ratones homocigotos (db+/db+) son obesos en comparación con sus compañeros de camada heterocigotos normales (db+/+m). Los ratones diabéticos mutantes (db+/db+) tienen una mutación recesiva autosómica en el cromosoma 4 (db+) (Coleman *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 283-293 (1982)). Los animales muestran polifagia, polidipsia y poliuria. Los ratones diabéticos mutantes (db+/db+) tienen niveles de glucosa elevados, niveles de insulina normales o aumentados e inmunidad mediada por células suprimida (Mandel *et al.*, J. Immunol. 120: 1375 (1978); Debray-Sachs, M. *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 51(1): 1-7 (1983); Leiter *et al.*, Am. J. of Pathol. 114: 46-55 (1985)). Se han descrito neuropatía periférica, complicaciones miocárdicas y lesiones microvasculares, engrosamiento de la membrana basal y anomalías en la filtración glomerular en estos animales (Norido, F. *et al.*, Exp. Neurol. 83(2): 221-232 (1984); Robertson *et al.*, Diabetes 29(1): 60-67 (1980); Giacomelli *et al.*, Lab Invest. 40(4): 460-473 (1979); Coleman, D. L., Diabetes 31 (Supl): 1-6 (1982)). Estos ratones diabéticos homocigotos desarrollan hiperglucemia que es resistente a insulina análoga a la diabetes tipo II humana (Mandel *et al.*, J. Immunol. 120: 1375-1377 (1978)).

Las características observadas en estos animales sugieren que la curación en este modelo puede ser similar a la curación observada en diabetes humana (Greenhalgh, *et al.*, Am. J. of Pathol. 136: 1235-1246 (1990)).

Se usan ratones hembra genéticamente diabéticos C57BL/KsJ (db+/db+) y sus compañeros de camada

heterocigotos no diabéticos (db+/+m) en este estudio (Jackson Laboratories). Los animales se obtienen a las 6 semanas de edad y tienen 8 semanas de edad al comienzo del estudio. Los animales se alojan individualmente y reciben comida y agua a voluntad. Todas estas manipulaciones se realizan usando técnicas asépticas. Los experimentos se realizan de acuerdo con las reglas y directrices del Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional y las Directrices para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de Human Genome Sciences, Inc.

Se realiza el protocolo de herida de acuerdo con métodos previamente indicados (Tsuboi, R. y Rifkin, D. B., J. Exp. Med 172: 245-251 (1990)). Brevemente, el día de la realización de la herida, los animales se anestesian con una inyección intraperitoneal de Avertin (0,01 mg/ml), 2,2,2-tribromoetanol y 2-metil-2-butanol disueltos en agua desionizada. La región dorsal del animal se afeita y la piel se lava con solución de etanol 70% y yodo. El área quirúrgica se seca con gasa estéril antes de realizar la herida. Se crea después una herida de 8 mm de grosor completo usando un perforador de tejido Keyes. Inmediatamente después de realizar la herida, la piel circundante se estira suavemente para eliminar la expansión de la herida. Las heridas se dejan abiertas durante la duración del experimento. La aplicación del tratamiento se realiza por vía tópica durante 5 días consecutivos comenzando el día de la lesión. Antes del tratamiento, las heridas se limpian suavemente con solución salina estéril y esponjas de gasa.

Las heridas se examinan visualmente y se fotografían a una distancia fija el día de la cirugía y a intervalos de dos días a partir de ese momento. Se determina el cierre de la herida por mediciones diarias los días 1-5 y el día 8. Las heridas se miden horizontal y verticalmente usando un calibrador Jameson calibrado. Se considera que las heridas están curadas si el tejido de granulación ya no es visible y la herida está cubierta por un epitelio continuo.

Se administra Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) usando en un intervalo diferentes dosis del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), de 4 mg a 500 mg por herida por día durante 8 días en vehículo. Los grupos de control con vehículo reciben 50 ml de solución de vehículo.

Los animales se sacrifican el día 8 con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (300 mg/kg). Las heridas y la piel circundante se recolectan después para histología e inmunohistoquímica. Las muestras de ensayo de tejidos se colocan en formalina tamponada neutra 10% en casetes tisulares entre esponjas de biopsia para procesamiento adicional.

Se evalúan tres grupos de 10 animales cada uno (5 diabéticos y 5 controles no diabéticos): 1) control de Vehículo placebo, 2) no tratado y 3) grupo tratado.

Se analiza el cierre de la herida por medición del área en el eje vertical y horizontal y obteniendo el área cuadrada total de la herida. Después se estima la contracción estableciendo las diferencias entre el área de herida inicial (día 0) y el posterior al tratamiento (día 8). El área de herida el día 1 es de 64 mm<sup>2</sup>, el tamaño correspondiente de la perforación dérmica. Se realizan cálculos usando la siguiente fórmula:

$$[\text{Área abierta el día 8}] - [\text{Área abierta el día 1}] / [\text{Área abierta el día 1}]$$

Se fijan las muestras de ensayo en formalina tamponada 10% y se seccionan bloques incluidos en parafina perpendiculares a la superficie de la herida (5 mm) y se cortan usando un microtomo Reichert-Jung. Se realiza tinción de hematoxilina-eosina rutinaria (H&E) en secciones transversales de heridas biseccionadas. Se usa examen histológico de las heridas para evaluar si el proceso de curación y la apariencia morfológica de la piel reparada está alterada por el tratamiento con Receptor de Quimiocina de proteína G. Esta evaluación incluye verificación de la presencia de acumulación de células, células inflamatorias, capilares, fibroblastos, reepitelización y madurez epidérmica (Greenhalgh, D. G. *et al.*, Am. J. Pathol. 136: 1235 (1990)). Se usa un micrómetro de lente calibrada por un observador en ciego.

También se tiñen secciones tisulares e inmunohistoquímicamente con un anticuerpo anti-queratina humana de conejo usando sistema de detección ABC Elite. Se usa piel humana como un control tisular positivo mientras que se usa IgG no inmune como un control negativo. Se determina el crecimiento de queratinocitos mediante la evaluación del alcance de la reepitelización de la herida usando un micrómetro de lente calibrada.

Se demuestra ciclina/antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) en muestras de ensayo de piel mediante el uso de anticuerpos anti-PCNA (1:50) con un sistema de detección ABC Elite. El cáncer de colon humano puede servir como un control de tejido positivo y el tejido cerebral humano puede usarse como un control de tejido negativo. Cada espécimen incluye una sección con omisión del anticuerpo primario y sustitución con IgG de ratón no inmune. La puntuación de estas secciones se basa en el alcance de proliferación en una escala de 0-8, reflejando la parte inferior de la escala proliferación ligera y reflejando la parte superior proliferación intensa.

Se analizaron los datos experimentales usando un ensayo de t para muestras no relacionadas. Se consideró significativo un p valor de < 0,05.

#### **Modelo de Rata Deficiente en Esteroides**

La inhibición de la curación de heridas por esteroides se ha documentado bien en diversos sistemas *in vitro* e *in vivo* (Wahl, S. M. Glucocorticoids and Wound healing. En: Anti-Inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects.



280-302 (1989); Wahl, S. M. *et al.*, J. Immunol. 115: 476-481 (1975); Werb, Z. *et al.*, J. Exp. Med 147:1684-1694 (1978)). Los glucocorticoides retardan la curación de heridas inhibiendo angiogénesis, disminuyendo la permeabilidad vascular (Ebert, R. H., *et al.*, An. Intern. Med 37: 701-705 (1952)), proliferación de fibroblastos y síntesis de colágeno (Beck, L. S. *et al.*, Growth Factors. 5: 295-304 (1991); Haynes, B. F. *et al.*, J. Clin. Invest. 61: 703-797 (1978)) y produciendo una reducción transitoria de monocitos circulantes (Haynes, B. F., *et al.*, J. Clin. Invest. 61: 703-797 (1978); Wahl, S. M., "Glucocorticoids and wound healing", In: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, Nueva York, pág. 280-302 (1989)). La administración sistémica de esteroides para curación de heridas alterada es un fenómeno bien establecido en ratas (Beck, L. S. *et al.*, Growth Factors. 5: 295-304 (1991); Haynes, B. F., *et al.*, J. Clin. Invest. 61: 703-797 (1978); Wahl, S. M., "Glucocorticoids and wound healing", In: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, Nueva York, pág. 280-302 (1989); Pierce, G. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2229-2233 (1989)).

Para demostrar que el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) puede acelerar el proceso de curación, se evalúan los efectos de múltiples aplicaciones tópicas del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en heridas de escisión de piel de grosor completo en ratas en las que se había alterado la curación por la administración sistémica de metilprednisolona.

Se usan ratas Sprague Dawley adultas jóvenes macho que pesan 250-300 g (Charles River Laboratories) en este ejemplo. Los animales se obtienen a las 8 semanas de edad y tienen 9 semanas de edad al comienzo del estudio. La respuesta de curación de las ratas se altera por la administración sistémica de metilprednisolona (17 mg/kg/rata por vía intramuscular) en el momento de la herida. Los animales se alojan individualmente y reciben comida y agua a voluntad. Todas las manipulaciones se realizan usando técnicas asépticas. Este estudio se realiza de acuerdo con las reglas y directrices de comité de Cuidado y Uso Animal Institucional y las Directrices para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de Human Genome Sciences, Inc.

Se sigue el protocolo de heridas de acuerdo con la sección A, anteriormente. El día de la realización de la herida, los animales se anestesian con una inyección intramuscular de quetamina (50 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg). La región dorsal del animal se afeita y la piel se lava con soluciones de yodo y etanol 70%. El área quirúrgica se seca con gasa estéril antes de realizar la herida. Se crea una herida de grosor completo de 8 mm usando un perforador tisular Keyes. Las heridas se dejan abiertas durante la duración del experimento. Las aplicaciones de los materiales de ensayo se realizan por vía tópica una vez al día durante 7 días consecutivos comenzando el día de la realización de la herida y posterior a la administración de metilprednisolona. Antes del tratamiento, las heridas se limpian suavemente con solución salina estéril y esponjas de gasa.

Las heridas se examinan visualmente y se fotografían a una distancia fija el día de realización de la herida y al final del tratamiento. El cierre de la herida se determina por medición diaria los días 1-5 y el día 8. Las heridas se miden horizontal y verticalmente usando un calibrador Jameson calibrado. Se considera que las heridas están curadas si ya no es visible el tejido de granulación y la herida está cubierta por un epitelio continuo.

Se administra Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) usando en un intervalo diferentes dosis de Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), de 4 mg a 500 mg por herida por día durante 8 días en vehículo. Los grupos de control de vehículo recibieron 50 ml de solución de vehículo.

Los animales se sacrifican el día 8 con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (300 mg/kg). Las heridas y la piel circundante se recolectan después para histología. Se colocan muestras de ensayo tisulares en formalina tamponada neutra 10% en casetes titulares entre esponjas de biopsia para procesamiento adicional.

Se evalúan cuatro grupos de 10 animales cada uno (5 con metilprednisolona y 5 sin glucocorticoides): 1) grupo no tratado 2) control de Vehículo placebo, 3) grupos tratados con Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).

Se analiza el cierre de la herida midiendo el área en el eje vertical y horizontal y obteniendo el área total de la herida. Se estima después el cierre estableciendo las diferencias entre el área de herida inicial (día 0) y el posterior al tratamiento (día 8). El área de herida el día 1 es de 64 mm<sup>2</sup>, el tamaño correspondiente de la perforación dérmica. Se realizan cálculos usando la siguiente fórmula:

$$[\text{Área abierta el día 8}] - [\text{Área abierta el día 1}] / [\text{Área abierta el día 1}]$$

Se fijan las muestras de ensayo en formalina tamponada 10% y se seccionan bloques incluidos en parafina perpendicularmente a la superficie de la herida (5 mm) y se cortan usando un microtomo Olympus. Se realiza tinción de hematoxilina-eosina rutinaria (H&E) en secciones transversales de heridas biseccionadas. La examinación histológica de las heridas permite la evaluación de si el proceso de curación y la apariencia morfológica de la piel reparada mejora por el tratamiento con Receptor de Quimiocina de proteína G. Se usa un micrómetro de lente calibrada por un observador en ciego para determinar la distancia del hueco de herida.

Los datos experimentales se analizan usando un ensayo de t para muestras no relacionadas. Se considera significativo un p valor de < 0,05.

Los estudios descritos en este ejemplo ensayan la actividad de la proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G

(CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría modificar fácilmente los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G.

#### **Ejemplo 65**

##### **5 Evaluación del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un Modelo de Ratón Diabético**

El modelo de ratón diabético usado en el Ejemplo 64 también puede usarse para determinar si el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) es eficaz en prevención, tratamiento y/o mejora de la condición diabética por sí mismo. Se administra Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) a ratones db+/db+ por vía parenteral durante diversos periodos de tiempo antes o después de que el ratón haya desarrollado diabetes y se miden los niveles de insulina y/o glucosa en sangre u otros métodos conocidos en la técnica para medir la gravedad de la enfermedad para determinar si la administración evita, ralentiza o disminuye la aparición o gravedad de la diabetes.

Este ejemplo ensaya la actividad de proteína del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5). Sin embargo, un experto en la materia podría modificar fácilmente los estudios ejemplificados para ensayar la actividad de polinucleótidos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) (por ejemplo, terapia génica), agonistas (incluyendo ligandos) y/o antagonistas del Receptor de Quimiocina de proteína G.

#### **Ejemplo 66**

##### **Evaluación del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en un Modelo de Enfermedad Inflamatoria del Intestino y Colitis**

El propósito de este estudio es determinar si el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) es eficaz en un modelo de colitis murina inducida por exposición a voluntad a sulfato sódico de dextrano en el agua potable.

Se usan ratones Swiss Webster hembra de seis a ocho semanas de edad (20-25 g, Charles River, Raleigh, NC) en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida con una solución 4% de sulfato sódico (DSS, 36.000-44.000 PM, American International Chemistry, Natick, MA) administrada a voluntad durante una semana. Se proporcionan agonistas, antagonistas, preferiblemente anticuerpos de la presente invención, del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) por administración parenteral diaria (n=10). Se usan tres parámetros para determinar la eficacia: 1) puntuación clínica, basándose en la evaluación de las heces; 2) puntuación histológica, basándose en la evaluación del colon y 3) cambio de peso. La puntuación clínica está comprendida por dos partes que suman un total de máximo de puntuación de cuatro. La consistencia de las heces se clasifica como: 0 = firme; 1 = suelta; 2 diarrea. También se evalúa sangre en las heces en una escala de 0 a 2 con 0 = sin sangre; 1 = sangre oculta; y 2 = hemorragia rectal global. Una puntuación de grupo media por encima de 3 indica probable mortalidad y enfermedad que ha progresado más allá de su etapa tratable. Las puntuaciones clínicas se toman el Día 0, 4, 5, 6 y 7. Para llegar a una puntuación histológica, se evalúan portaobjetos del colon ascendente, transversal y descendente de una manera ciega basándose en puntuación de inflamación (0-3) y puntuación de cripta (0-4). El peso corporal se mide diariamente. Los datos se expresan como media + ETM. Se usa un ensayo de t de Student para muestras no relacionadas para determinar diferencias significativas en comparación con el control de la enfermedad (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

Los resultados de este estudio pueden sugerir un papel para el Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en IBD y colitis, incluyendo colitis ulcerosa. De este modo, pueden usarse agonistas, antagonistas, incluyendo anticuerpos de la presente invención y fragmentos del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) para tratar, prevenir o aliviar a pacientes que tienen IBD, colitis y/o colitis ulcerosa o cualquier otra inflamación del intestino.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Human Genome Sciences, Inc.

Roschke, Viktor

5     Rosen, Craig A.

Ruben, Steven, M.

<120> Receptor de quimiocina de proteína G (CCR5) HDG NR10 humano

10    <130> 1488.115PC0J

<150> PCT/US01/04153

<151> 09-02-2001

15    <150> 09/779.880

<151> 09-02-2001

<150> 60/297.257

<151> 12-06-2001

20

<150> 60/310.458

<151> 08-08-2001

<150> 60/328.447

25    <151> 12-10-2001

<150> 60/341.725

<151> 21-12-2001

30    <160> 70

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

35    <211> 1414

<212> ADN

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (259)..(1314)

5

&lt;400&gt; 1

```

gtgagatggg gctttcatga attcccccaa caagagccaa gctctccatc tagtggacag      60
ggaagctagc agcaaacctt cctttcacta cgaaacttca ttgcttggcc caaaagagag      120
ttaattcaat gtagacatct atgtaggcaa ttaaaaacct attgatgtat aaaacagttt      180
gcattcatgg agggcaacta aatacattct aggactttat aaaagatcac tttttattta      240
tgcacagggt ggaacaag atg gat tat caa gtg tca agt cca atc tat gac      291
                Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp
                1          5          10

atc aat tat tat aca tcg gag ccc tgc cca aaa atc aat gtg aag caa      339
Ile Asn Tyr Tyr Thr Ser Glu Pro Cys Pro Lys Ile Asn Val Lys Gln

```

15	20	25	
atc gca gcc cgc ctc ctg cct ccg ctc tac tca ctg gtg ttc atc ttt Ile Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe 30 35 40			387
ggt ttt gtg ggc aac atg ctg gtc atc ctc atc ctg ata aac tgc caa Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Gln 45 50 55			435
agg ctg gag agc atg act gac atc tac ctg ctc aac ctg gcc atc tct Arg Leu Glu Ser Met Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser 60 65 70 75			483
gac ctg ttt ttc ctt ctt act gtc ccc ttc tgg gct cac tat gct gcc Asp Leu Phe Phe Leu Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala 80 85 90			531
gcc cag tgg gac ttt gga aat aca atg tgt caa ctc ttg aca ggg ctc Ala Gln Trp Asp Phe Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu 95 100 105			579
tat ttt ata ggc ttc ttc tct gga atc ttc ttc atc atc ctc ctg aca Tyr Phe Ile Gly Phe Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr 110 115 120			627
atc gat agg tac ctg gct atc gtc cat gct gtg ttt gct tta aaa gcc Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala 125 130 135			675
agg acg gtc acc ttt ggg gtg gtg aca agt gtg atc act tgg gtg gtg Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val 140 145 150 155			723
gct gtg ttt gcg tct ctc cca gga atc atc ttt acc aga tct caa aaa Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys 160 165 170			771
gaa ggt ctt cat tac acc tgc agc tct cat ttt cca tac agt cag tat Glu Gly Leu His Tyr Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr 175 180 185			819
caa ttc tgg aag aat ttc cag aca tta aag ata gtc atc ttg ggg ctg Gln Phe Trp Lys Asn Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu 190 195 200			867
gtc ctg ccg ctg ctt gtc atg gtc atc tgc tac tgc gga atc cta aaa Val Leu Pro Leu Leu Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys 205 210 215			915
act ctg ctt cgg tgt cga aat gag aag aag agg cac agg gct gtg agg Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg 220 225 230 235			963
ctt atc ttc acc atc atg att gtt tat ttt ctc ttc tgg gct ccc tac Leu Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr 240 245 250			1011
aac att gtc ctt ctc ctg aac acc ttc cag gaa ttc ttt ggc ctg aat Asn Ile Val Leu Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn 255 260 265			1059
aat tgc agt agc tct aac agg ttg gac caa gct atg cag gtg aca gag Asn Cys Ser Ser Ser Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu 265 270 275			1107

```

      270              275              280
act ctt ggg atg acg cac tgc tgc atc aac ccc atc atc tat gcc ttt 1155
Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe
      285              290              295

gtc ggg gag aag ttc aga aac tac ctc tta gtc ttc ttc caa aag cac 1203
Val Gly Glu Lys Phe Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His
      300              305              310              315

att gcc aaa cgc ttc tgc aaa tgc tgt tct att ttc cag caa gag gct 1251
Ile Ala Lys Arg Phe Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala
      320              325              330

ccc gag cga gca agc tca gtt tac acc cga tcc act ggg gag cag gaa 1299
Pro Glu Arg Ala Ser Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu
      335              340              345

ata tct gtg ggc ttg tgacacggac tcaagtgggc tgggtgaccca gtcagagttg 1354
Ile Ser Val Gly Leu
      350

tgcacatggc ttagttttca tacacagcct gggctggggg tggggtggaa gaggtctttt 1414

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 352

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

```

Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
1              5              10              15

Ser Glu Pro Cys Pro Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
      20              25              30

Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
      35              40              45

Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Gln Arg Leu Glu Ser Met
      50              55              60

Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
      65              70              75              80

Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
      85              90              95

Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
      100              105              110

Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
      115              120              125

Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
      130              135              140

Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
      145              150              155              160

Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr

```

165								170				175			
Thr	Cys	Ser	Ser	His	Phe	Pro	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Gln	Phe	Trp	Lys	Asn
			180					185					190		
Phe	Gln	Thr	Leu	Lys	Ile	Val	Ile	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	Leu	Leu
		195					200					205			
Val	Met	Val	Ile	Cys	Tyr	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Arg	Cys
	210					215					220				
Arg	Asn	Glu	Lys	Lys	Arg	His	Arg	Ala	Val	Arg	Leu	Ile	Phe	Thr	Ile
225					230					235					240
Met	Ile	Val	Tyr	Phe	Leu	Phe	Trp	Ala	Pro	Tyr	Asn	Ile	Val	Leu	Leu
				245					250					255	
Leu	Asn	Thr	Phe	Gln	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Asn	Asn	Cys	Ser	Ser	Ser
			260					265					270		
Asn	Arg	Leu	Asp	Gln	Ala	Met	Gln	Val	Thr	Glu	Thr	Leu	Gly	Met	Thr
		275					280					285			
His	Cys	Cys	Ile	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Ala	Phe	Val	Gly	Glu	Lys	Phe
	290					295					300				
Arg	Asn	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Phe	Gln	Lys	His	Ile	Ala	Lys	Arg	Phe
305					310					315					320
Cys	Lys	Cys	Cys	Ser	Ile	Phe	Gln	Gln	Glu	Ala	Pro	Glu	Arg	Ala	Ser
				325					330					335	
Ser	Val	Tyr	Thr	Arg	Ser	Thr	Gly	Glu	Gln	Glu	Ile	Ser	Val	Gly	Leu
			340						345				350		

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 30

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cebador oligonucleotídico 5' para HDGNR10

10

&lt;400&gt; 3

cggaattcct ccatggatta tcaagtgca 30

&lt;210&gt; 4

15 &lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para HDGNR10

<400> 4

cggaagcttc gtcacaagcc cacagatat 29

5

<210> 5

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para HDGNR10

<400> 5

15 gtccaagctt gccaccatgg attatcaagt gtca 34

<210> 6

<211> 61

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para HDGNR10

25 <400> 6

ctagctcgag tcaagcgtag tctgggacgt cgtatgggta gcacaagccc acagatatatt 60

c 61

<210> 7

<211> 30

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para HDGNR10

35



<400> 7

cgggatccct ccatggatta tcaagtgca 30

<210> 8

5 <211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador oligonucleotídico 3' para HDGNR10

<400> 8

cgggatcccg ctcacaagcc cacagatat 29

15 <210> 9

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 9

Glu	Glu	Val	Thr	Thr	Phe	Phe	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Ala	Pro	Cys	His
1				5				10						15	
Lys	Phe	Asp	Val	Lys	Gln	Ile	Gly	Ala	Gln	Leu	Leu	Pro	Pro	Leu	Tyr
			20				25					30			
Ser	Leu	Val	Phe	Ile	Phe	Gly	Phe	Val	Gly	Asn	Met	Leu	Val	Val	Leu
		35				40						45			

Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr Leu  
 50 55 60  
 Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro Leu  
 65 70 75 80  
 Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met Cys  
 85 90 95  
 Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile Phe  
 100 105 110  
 Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala  
 115 120 125  
 Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr Ser  
 130 135 140  
 Val Ile Thr Trp Leu Val Ala Val Phe Ala Ser Val Pro Gly Ile Ile  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro Tyr  
 165 170 175  
 Phe Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg Asn Ile Leu  
 180 185 190  
 Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile  
 195 200 205  
 Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala  
 210 215 220  
 Val Arg Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Thr  
 225 230 235 240  
 Pro Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly  
 245 250 255  
 Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln Val  
 260 265 270  
 Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr  
 275 280 285  
 Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Ser Leu Phe His Ile Ala Leu Gly  
 290 295 300  
 Cys Arg Ile Ala Pro Leu Gln Lys Pro Val Cys Gly Gly Pro Gly Val  
 305 310 315 320  
 Arg Pro Gly Lys Asn Val Lys Val Thr Thr Gln Gly Leu Leu Asp Gly  
 325 330 335  
 Arg Gly Lys Gly Lys Ser Ile Gly  
 340

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 733

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

```

gggatccgga gcccaaattct tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg      60
aattcgaggg tgcaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga      120
tctcccgac tcctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt aagccacgaa gaccctgagg      180
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg      240
aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact      300
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca acccccatcg      360
agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc      420
catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct      480
atccaagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga      540
ccacgcctcc cgtgctggac tccgaaggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg      600
acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc      660
acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc      720
gactctagag gat                                                                733

```

<210> 11

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Motivo de la región proximal a membrana

<220>

<221> Variante

10 <222> (3)

<223> Puede ser cualquier aminoácido

<400> 11

Trp Ser Xaa Trp Ser  
1 5

15

<210> 12

<211> 86

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Cebador 5' para construcción de promotor temprano de SV40 - sitio de activación gamma

<400> 12

gcgctcgag atttccccga aatctagatt tccccgaaat gatttccccg aaatgatttc 60  
cccgaatat ctgccatctc aattag 86

<210> 13

<211> 27

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para promotor temprano de SV40

10

<400> 13

gcggcaagct tttgcaaag cctaggc 27

<210> 14

15 <211> 271

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Construcción de promotor temprano de SV40 - sitio de activación gamma

<400> 14

ctcgagattt ccccgaaatc tagatttccc cgaaatgatt tccccgaaat gatttccccg 60  
aaatatctgc catctcaatt agtcagcaac catagtcccc cccctaactc cgcccatccc 120  
gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccatt ggctgactaa ttttttttat 180  
ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt 240  
ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct t 271

25 <210> 15

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para secuencia promotora de EGR-1

<400> 15

gogctcgagg gatgacagcg atagaacccc gg 32

5 <210> 16

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para secuencia promotora de EGR-1

<400> 16

gcgaagcttc gcgactcccc ggatccgcct c 31

15

<210> 17

<211> 12

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

20

<400> 17

ggggactttc cc 12

<210> 18

25 <211> 73

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Cebador oligonucleotídico 5' para construcción de promotor temprano de SV40 - NF-KB

<400> 18

gcggcctcga ggggactttc ccggggactt tccggggact ttccgggact ttccatcctg 60

ccatctcaat tag 73

35 <210> 19

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para promotor temprano de SV40

<400> 19

gcggcaagct tttgcaaag cctaggc 27

10

<210> 20

<211> 256

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Construcción de promotor temprano de SV40 NF-KB

<400> 20

ctcgagggga ctttcccggg gactttccgg ggactttccg ggactttcca tctgccatct 60

caattagtca gcaaccatag tcccgccct aactccgcc atcccgcctc taactccgcc 120

cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga 180

ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg 240

20

cttttgcaaa aagctt 256

<210> 21

<211> 1056

<212> ADN

25

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1056)

30

<400> 21

atg gat tat caa gtg tca agt cca atc tat gac atc aat tat tat aca Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr 1 5 10 15	48
tcg gag ccc tgc caa aaa atc aat gtg aag caa atc gca gcc cgc ctc Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu 20 25 30	96
ctg cct ccg ctc tac tca ctg gtg ttc atc ttt ggt ttt gtg ggc aac Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn 35 40 45	144
atg ctg gtc atc ctc atc ctg ata aac tgc aaa agg ctg aag agc atg Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met 50 55 60	192
act gac atc tac ctg ctc aac ctg gcc atc tct gac ctg ttt ttc ctt Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu 65 70 75 80	240
ctt act gtc ccc ttc tgg gct cac tat gct gcc gcc cag tgg gac ttt Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe 85 90 95	288
gga aat aca atg tgt caa ctc ttg aca ggg ctc tat ttt ata ggc ttc Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe 100 105 110	336
ttc tct gga atc ttc ttc atc atc ctc ctg aca atc gat agg tac ctg Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu 115 120 125	384
gct gtc gtc cat gct gtg ttt gct tta aaa gcc agg acg gtc acc ttt Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe 130 135 140	432
ggg gtg gtg aca agt gtg atc act tgg gtg gtg gct gtg ttt gcg tct Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser 145 150 155 160	480
ctc cca gga atc atc ttt acc aga tct caa aaa gaa ggt ctt cat tac Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr 165 170 175	528
acc tgc agc tct cat ttt cca tac agt cag tat caa ttc tgg aag aat Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn 180 185 190	576
ttc cag aca tta aag ata gtc atc ttg ggg ctg gtc ctg ccg ctg ctt Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu 195 200 205	624
gtc atg gtc atc tgc tac tcg gga atc cta aaa act ctg ctt cgg tgt Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys 210 215 220	672
cga aat gag aag aag agg cac agg gct gtg agg ctt atc ttc acc atc Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile 225 230 235 240	720
atg att gtt tat ttt ctc ttc tgg gct ccc tac aac att gtc ctt ctc Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu 245 250 255	768
ctg aac acc ttc cag gaa ttc ttt ggc ctg aat aat tgc agt agc tct Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser 260 265 270	816
aac agg ttg gac caa gct atg cag gtg aca gag act ctt ggg atg acg Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr 275 280 285	864
cac tgc tgc atc aac ccc atc atc tat gcc ttt gtc ggg gag aag ttc His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe 290 295 300	912

aga aac tac ctc tta gtc ttc ttc caa aag cac att gcc aaa cgc ttc	960
Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe	
305 310 315 320	
tgc aaa tgc tgt tct att ttc cag caa gag gct ccc gag cga gca agc	1008
Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser	
325 330 335	
tca gtt tac acc cga tcc act gag gag cag gaa ata tct gtg ggc ttg	1056
Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Glu Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu	
340 345 350	

<210> 22

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22



Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu  
 20 25 30  
 Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn  
 35 40 45  
 Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met  
 50 55 60  
 Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe  
 85 90 95  
 Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe  
 100 105 110  
 Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu  
 115 120 125  
 Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe  
 130 135 140  
 Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr  
 165 170 175  
 Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn  
 180 185 190  
 Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu  
 195 200 205  
 Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys  
 210 215 220  
 Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile  
 225 230 235 240  
 Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu  
 245 250 255  
 Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser  
 260 265 270  
 Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr  
 275 280 285  
 His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe  
 290 295 300  
 Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe  
 305 310 315 320  
 Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser  
 325 330 335  
 Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Glu Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu  
 340 345 350

<210> 23

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

10 <400> 23

caggtgcagc tggcagtc tgg 23

<210> 24

<211> 23

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

20

<400> 24

caggtcaact taaggagtc tgg 23

<210> 25

25 <211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

<400> 25

gaggtgcagc tggcagtc tgg 23

35 <210> 26

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

<400> 26

caggtgcagc tgcaggagtc ggg 23

10 <210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

<400> 27

gaggtgcagc tgttcagtc tgc 23

20

<210> 28

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

<400> 28

30 caggtacagc tgcagcagtc agg 23

<210> 29

<211> 24

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

<400> 29

5 tgaggagacg gtgaccaggg tgcc 24

<210> 30

<211> 24

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

15 <400> 30

tgaagagacg gtgaccattg tccc 24

<210> 31

<211> 24

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

25

<400> 31

tgaggagacg gtgaccaggg ttcc 24

<210> 32

30 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VH

<400> 32

tgaggagacg gtagccgtgg tccc 24

<210> 33

5 <211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

<400> 33

gacatccaga tgaccagtc tcc 23

15 <210> 34

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

<400> 34

gatgttgta tgactcagtc tcc 23

25

<210> 35

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

<400> 35

35 gatattgtga tgactcagtc tcc 23

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

<400> 36

10 gaaattgtgt tgacgcagtc tcc 23

<210> 37

<211> 23

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

20 <400> 37

gacatcgtga tgaccagtc tcc 23

<210> 38

<211> 23

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

30

<400> 38

gaaacgacac tcacgcagtc tcc 23

<210> 39

35 <211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

5

<400> 39

gaaattgtgc tgactcagtc tcc 23

<210> 40

10

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

<400> 40

cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

20

<210> 41

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

<400> 41

cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

30

<210> 42

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

<400> 42

tcctatgtgc tgactcagcc ace 23

5

<210> 43

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

<400> 43

15 tcttctgagc tgactcagga ccc 23

<210> 44

<211> 23

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

25 <400> 44

cacgttatac tgactcaacc gcc 23

<210> 45

<211> 23

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

35

<400> 45



caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

<210> 46

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 5' para dominio VL

10

<400> 46

aattttatgc tgactcagcc cca 23

<210> 47

15 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

<400> 47

acgtttgatt tccaccttgg tccc 24

25 <210> 48

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

<400> 48

acgtttgatc tccagcttgg tccc 24

35

<210> 49

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

<400> 49

acgtttgata tccactttgg tccc 24

10

<210> 50

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

<400> 50

20 acgtttgatc tccaccttgg tccc 24

<210> 51

<211> 24

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

30 <400> 51

acgtttaatc tccagtcgtg tccc 24

<210> 52

<211> 23

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

5 <400> 52

cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 53

<211> 23

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

15

<400> 53

cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 54

20 <211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

<400> 54

tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

30 <210> 55

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

<400> 55

tcttctgagc tgactcagga ccc 23

5 <210> 56

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

<400> 56

cacgttatac tgactcaacc gcc 23

15

<210> 57

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

<400> 57

25 caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

<210> 58

<211> 23

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico 3' para dominio VL

35 <400> 58

aattttatgc tgactcagcc cca 23

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 363

&lt;212&gt; ADN

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(363)

10 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 59

cag	gtg	cag	ctg	cag	gag	tcg	ggc	cca	gga	ctg	gtg	aag	cct	tcg	gag	48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1				5				10					15			
acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	act	gtc	tct	ggg	ggc	tcc	atc	agt	agt	ttc	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Phe	
			20				25					30				
tac	tgg	agc	tgg	atc	cgg	cag	ccc	gcc	ggg	aag	gga	ctg	gac	tgg	att	144
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Asp	Trp	Ile	
		35				40					45					
ggg	cgt	atc	tat	acc	agc	ggg	aac	acc	aac	tac	aac	ccc	tcc	ctc	aag	192
Gly	Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	
	50					55				60						
agt	cga	gtc	acc	atg	tca	gta	gac	acg	tcc	aag	aac	cgg	ttc	tcc	ctg	240
Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Phe	Ser	Leu	
65				70				75				80				
aaa	ctg	agc	tct	gtg	acc	gcc	gcg	gac	acg	gcc	gtg	tat	tac	tgt	gcg	288
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
			85				90					95				
aga	gat	cgg	ggc	agc	agc	tgg	tac	ccc	gat	gct	ttt	gat	atc	tgg	ggc	336
Arg	Asp	Arg	Gly	Ser	Ser	Trp	Tyr	Pro	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	
			100				105					110				
caa	ggg	aca	atg	gtc	acc	gtc	tcc	tca								363
Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120										

15 &lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

20 &lt;400&gt; 60

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe  
20 25 30  
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile  
35 40 45  
Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60  
Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Arg Phe Ser Leu  
65 70 75 80  
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95  
Arg Asp Arg Gly Ser Ser Trp Tyr Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
100 105 110  
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 61

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(327)

<223>

<400> 61

gat att gtg ttg acg cat tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48  
Asp Ile Val Leu Thr His Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag cgt gtt acc agc agc 96  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Thr Ser Ser  
20 25 30  
tgc tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144  
Cys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45  
atc tat ggt aca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192  
Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80  
cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat gtt agc tca cct 288  
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Val Ser Ser Pro  
85 90 95  
ctc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctc gag atc aaa cgt 327  
Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 109

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 62

Asp Ile Val Leu Thr His Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Thr Ser Ser  
20 25 30  
Cys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80  
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Val Ser Ser Pro  
85 90 95  
Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

10

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 379

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(378)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 63

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	aag	tct	ggg	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Ser	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tcc	ctt	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tcc	gga	ttc	act	ttc	agt	aac	gcc	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Ala	
			20					25					30			
tgg	atg	acc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	agg	ctg	gag	tgg	gtt	144
Trp	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
ggc	cgt	att	aaa	agc	aat	gct	gat	ggg	ggg	tca	aca	gac	tac	gct	gca	192
Gly	Arg	Ile	Lys	Ser	Asn	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ala	
	50					55					60					
ccc	gtg	aaa	ggc	aga	ttc	acc	atc	tca	aga	gat	gat	tca	aaa	aac	acg	240
Pro	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	
65					70				75						80	
ctg	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aaa	acc	gag	gac	aca	gcc	gtg	tat	288
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	
				85					90					95		
tac	tgt	aac	aca	gat	aag	ggg	ggg	agc	tac	ccc	tac	tac	tac	tac	ggt	336
Tyr	Cys	Asn	Thr	Asp	Lys	Gly	Gly	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	
			100					105					110			
atg	gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	g		379
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125				

10

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 64



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

<210> 65

<211> 324

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(324)

<223>

<400> 65

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att aga aat gat	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp	
20 25 30	

```

tta ggc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag cgc ctg atc      144
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
      35              40              45

tat gat gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60

agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65              70              75              80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat aat agt tac cca ttc      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Phe
      85              90              95

act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa cga      324
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
      100              105

```

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 108

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 66

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
      20              25              30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
      35              40              45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65              70              75              80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Phe
      85              90              95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
      100              105

```

10

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 378

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

15

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(378)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 67

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggc	cca	gga	ctg	gtg	aag	cct	tcg	gag	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1				5					10					15		
acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	act	gtc	tct	ggg	ggc	tcc	atc	agt	agt	tac	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
tac	tgg	agc	tgg	atc	cgg	cag	ccc	cca	ggg	aag	gga	ctg	gag	tgg	att	144
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
ggg	tat	atc	tat	tac	agt	ggg	agc	acc	aac	tac	aac	ccc	tcc	ctc	aag	192
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	
	50					55					60					
agt	cga	gtc	acc	ata	tca	gta	gac	acg	tcc	aag	aac	cag	ttc	tcc	ctg	240
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	
65					70					75					80	
aag	ctg	agc	tct	gtg	acc	gct	gcg	gac	acg	gcc	gtg	tat	tac	tgt	gcg	288
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				85					90					95		
aga	gat	gtc	atg	cag	cag	ccg	gta	cgg	ggg	tac	tac	tac	tac	tac	ggg	336
Arg	Asp	Val	Met	Gln	Gln	Pro	Val	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	
			100					105						110		
atg	gac	gtc	tgg	ggc	caa	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca			378
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125				

5

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

10

&lt;400&gt; 68

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

<210> 69

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(327)

<223>

<400> 69

```

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

gaa aga gtc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag aga gtt agc aac agc      96
Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Asn Ser
           20           25           30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ttc ctc     144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Phe Leu
           35           40           45

atc tat ggt gta tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt     192
Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
           50           55           60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag     240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agt tca ccg     288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
           85           90           95

tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cga                 327
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100           105

```

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 109

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 70

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Asn Ser
           20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Phe Leu
           35           40           45

Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
           50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
           85           90           95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100           105

```

10

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo que se une a polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo:
  - 5 (a) la secuencias de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo expresado por la línea celular de hibridoma depositada con el N° de Depósito de ATCC PTA-4054; y
  - (b) la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo expresado por la línea celular de hibridoma depositada con el N° de Depósito de ATCC PTA-4054.
2. Un anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo que se une específicamente a polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5), comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo las secuencias de aminoácidos de cada uno de los dominios VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3 del anticuerpo expresado por la línea celular de hibridoma depositada con el N° de Depósito de ATCC PTA-4054; teniendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo una actividad seleccionada del grupo que consiste en:
  - (a) inhibición de unión de RANTES con células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5);
  - 15 (b) inhibición de unión de MIP-1alfa con células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5); y
  - (c) inhibición de unión de MIP-1beta con células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5); y teniendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo una actividad seleccionada del grupo que consiste en:
  - (d) inhibición de unión de VIH con células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5); y
  - (e) inhibición de infección por VIH de células que expresan Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).
3. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en:
  - (a) un dominio constante de IgM;
  - (b) un dominio constante de IgG; y
  - 25 (c) un dominio constante de IgA.
4. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 3 en el que el dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en un dominio constante de IgG1, un dominio constante de IgG2, un dominio constante de IgG3 y un dominio constante de IgG4.
5. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en:
  - (a) un dominio constante kappa; y
  - (b) un dominio constante lambda.
6. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) se expresa en la superficie de una célula.
7. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se une a Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una transferencia de Western o en un ELISA.
8. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, seleccionándose dicho anticuerpo o fragmento del mismo del grupo que consiste en:
  - 40 (a) un fragmento Fab;
  - (b) un fragmento Fab';
  - (c) un F(ab')<sub>2</sub>;
  - (d) un Fd;
  - (e) un Fv de cadena sencilla;

(f) un Fv con enlace disulfuro; y

(g) un anticuerpo monoclonal.

9. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, teniendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-9}$  M o menos.

5 10. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, teniendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo una tasa de disociación seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una tasa de disociación de al menos  $10^{-3}$ /s; y

(b) una tasa de disociación de al menos  $10^{-4}$ /s.

11. Un anticuerpo expresado por la línea celular depositada con el N° de Depósito de ATCC PTA-4054.

10 12. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, estando dicho anticuerpo o fragmento del mismo fusionado con un polipéptido heterólogo.

13. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 12, en el que el polipéptido heterólogo es albúmina de suero humano.

15 14. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, estando dicho anticuerpo o fragmento del mismo acoplado o conjugado con un marcador detectable.

15. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 14, en el que el marcador detectable es un marcador radiactivo.

16. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 15, en el que el marcador radiactivo es  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  o  $^{153}\text{Sm}$ .

20 17. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 14, en el que el marcador detectable es una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente o un marcador bioluminiscente.

18. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, estando el anticuerpo o fragmento del mismo biotinilado.

25 19. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, estando dicho anticuerpo o fragmento del mismo conjugado con un agente terapéutico o citotóxico.

20. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 19, en el que el agente terapéutico o citotóxico es un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, una toxina o un agente apoptótico.

30 21. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

22. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

23. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 22.

35 24. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 23 o el polinucleótido de la reivindicación 22.

25. La célula hospedadora de la reivindicación 24, que es una línea celular capaz de expresar el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

26. La línea celular de la reivindicación 25, en la que las células son células NSO o células CHO.

40 27. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, pudiendo obtenerse dicho anticuerpo o fragmento del mismo por expresión de la línea celular de la reivindicación 25 o 26.

28. Un método para preparar un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende:

(a) expresar el anticuerpo o fragmento del mismo codificado por el polinucleótido de la reivindicación 22; y

(b) recuperar dicho anticuerpo o fragmento del mismo.

45 29. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a

- 13, pudiendo obtenerse dicho anticuerpo o fragmento del mismo por el método de la reivindicación 28.
30. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 27 y 29 y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 31. Uso de un anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 27 y 29 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de infección por VIH.
32. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 27 y 29 para su uso en el tratamiento o prevención de infección por VIH.
- 10 33. Uso de un anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 27 y 29 para la preparación de una composición de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de artritis reumatoide.
34. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 27 y 29 para su uso en el tratamiento o prevención de artritis reumatoide.
- 15 35. La composición farmacéutica de la reivindicación 30 o el uso de la reivindicación 31 ó 33, siendo la composición farmacéutica para administración en un ser humano.
36. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 32 ó 34, en el que el tratamiento o prevención se aplica a un ser humano.
- 20 37. La composición farmacéutica de la reivindicación 30 ó 35 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 31, 33 y 35, siendo la composición farmacéutica para administración del anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo en combinación con un agente quimioterapéutico o un agente antirretroviral.
38. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 32, 34 y 36, administrándose el anticuerpo o fragmento del mismo en combinación con un agente quimioterapéutico o un agente antirretroviral.
- 25 39. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 30, 35 y 37 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 31, 33, 35 y 37, comprendiendo la composición farmacéutica adicionalmente un agente antirretroviral.
40. El anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 32, 34, 36 y 38, en el que se administra adicionalmente un agente antirretroviral.
- 30 41. Un método para detectar expresión de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) que comprende:
- (a) ensayar la expresión de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una muestra biológica de un individuo usando el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 27 y 29; y
- 35 (b) comparar el nivel de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con un nivel convencional de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).
42. Un método para detectar, diagnosticar o pronosticar infección por VIH y/o afecciones asociadas con infección por VIH que comprende:
- (a) ensayar la expresión de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una muestra biológica de un individuo usando el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 27 y 29; y
- 40 (b) comparar el nivel de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con un nivel convencional de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).
43. Un método para detectar, diagnosticar o pronosticar artritis reumatoide que comprende:
- 45 a. ensayar la expresión de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) en una muestra biológica de un individuo usando el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 27 y 29; y
- b. comparar el nivel de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5) con un nivel convencional de un polipéptido del Receptor de Quimiocina de proteína G (CCR5).



44. Un kit que comprende el anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 27 y 29.
45. El kit de la reivindicación 44 que comprende adicionalmente un anticuerpo control.

```

      10      30      50
GTGAGATGGTGCCTTTCATGAATCCCCCAACAAGAGCCAAGCTCTCCATCTAGTGGACAG
      70      90     110
GGAAGCTAGCAGCAAACCTTCCCTTCACTACGAAACTTCATTGCTTGGCCCCAAAAGAGAG
     130     150     170
TTAATTC AATGTAGACATCTATGTAGGCAATTA AAAACCTATTGATGTATAAAACAGTTT
     190     210     230
GCATTCATGGAGGGCAACTAAATACATTCTAGGACTTTATAAAAGATCACTTTTATTTA
     250     270     290
TGCACAGGGTGAACAAGATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTAT
      M D Y Q V S S P I Y D I N Y
     310     330     350
TATACATCGGAGCCCTGCCCAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCT
Y T S E P C P K I N V K Q I A A R L L P
     370     390     410
CCGCTCTACTCACTGGTGTTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATC
P L Y S L V F I F G F V G N M L V I L I
     430     450     470
CTGATAAACTGCCAAAGGCTGGAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATC
L I N C Q R L E S M T D I Y L L N L A I
     490     510     530
TCTGACCTGTTTTCTTCTTACTGTCCCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGCCAGTGG
S D L F F L L T V P F W A H Y A A A Q W
     550     570     590
GACTTTGGAATACAATGTGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGCTTCTTCTCT
D F G N T M C Q L L T G L Y F I G F F S
     610     630     650
GGAATCTTCTTCATCATCCTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTATCGTCCATGCTGTG
G I F F I I L L T I D R Y L A I V H A V
     670     690     710
TTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTG
F A L K A R T V T F G V V T S V I T W V
     730     750     770
GTGGCTGTGTTTGGCTCTCTCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCTT
V A V F A S L P G I I F T R S Q K E G L
     790     810     830
CATTACACCTGCAGCTCTCATTTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTTCCAG
H Y T C S S H F P Y S Q Y Q F W K N F Q
     850     870     890
ACATTAAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTATGGTCATCTGCTAC
T L K I V I L G L V L P L L V M V I C Y
     910     930     950
TCGGGAATCCTAAAACTCTGCTTCGGTGTGAAATGAGAAGAAGAGGCACAGGGCTGTG
S G I L K T L L R C R N E K K R H R A V

```

FIG.1A

970 990 1010  
AGGCTTATCTTCACCATCATGATTGTTTATTTCTCTTCTGGGCTCCCTACAACATTGTC  
R L I F T I M I V Y F L F W A P Y N I V  
1030 1050 1070  
CTTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAGCTCTAACAGG  
L L L N T F Q E F F G L N N C S S S N R  
1090 1110 1130  
TTGGACCAAGCTATGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACCCC  
L D Q A M Q V T E T L G M T H C C I N P  
1150 1170 1190  
ATCATCTATGCCTTTGTCTGGGAGAAGTTTCAGAACTACCTCTTAGTCTTCTTCCAAAAG  
I I Y A F V G E K F R N Y L L V F F Q K  
1210 1230 1250  
CACATTGCCAAACGCTTCTGCAAATGCTGTTCTATTTTCCAGCAAGAGGCTCCCGAGCGA  
H I A K R F C K C C S I F Q Q E A P E R  
1270 1290 1310  
GCAAGCTCAGTTTACACCCGATCCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTTGTGACAC  
A S S V Y T R S T G E Q E I S V G L \*  
1330 1350 1370  
GGACTCAAGTGGGCTGGTGACCCAGTCAGAGTTGTGCACATGGCTTAGTTTTCATACACA  
1390 1410  
GCCTGGGCTGGGGGTGGGGTGGAAGAGGTCTTTT

FIG.1B

```

4 QVSSPIYDINYYTSEPCPKINVKQIAARLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVL 53
: .::|.:.| :.||.:.|:||||:|.|||||:|||||:|
18 EEVTTFDFDYD..GAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVL 65

54 ILINCORLESMTDIYLLNLAISDLFFLLTVPFWAHYAAAQWDFGNTMCQL 103
|||||.:.|:|||||:||||:|:|:| |.:.| |||.||.
66 ILINCKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNAMCKL 115

104 LTGLYF IGFFSGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITW 153
:|||| ||:|:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
116 FTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITW 165

154 VVAVFASLPGIIFTRSQKEGLHYTCSSHFYYSQYQFWKNFQTLKIVILGL 203
:|||||:|||||:||||:|.|:..|| :|.||:|. |||
166 LVAVFASVPGIIFTKQKEDSVYVCGPYFPRG...WNHFHTIMRNILGL 211

204 VLPLLMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWAPYNI 253
|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
212 VLPLLMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNI 261

254 VLLNNTFQEFFGLNNCSSSNRLDQAMQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEK 303
|:|||||:|||||.|||.||| |||||:|||||:|||||
262 VLLNNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEK 311

304 FRNYLLVFFQKHIAKRFCCKCSIFQQEAPERASSVYTRS...TGEQEISV 350
||.:. :.:. :|| :. |.:. .. |:. .| |.:. :.:. :|
312 FRSLFHIALGCRIA.PLQKPVCGPGVRPGKNVKVTTQGLLDGRGKGKSI 360

351 G 351
|
361 G 361

```

FIG. 2

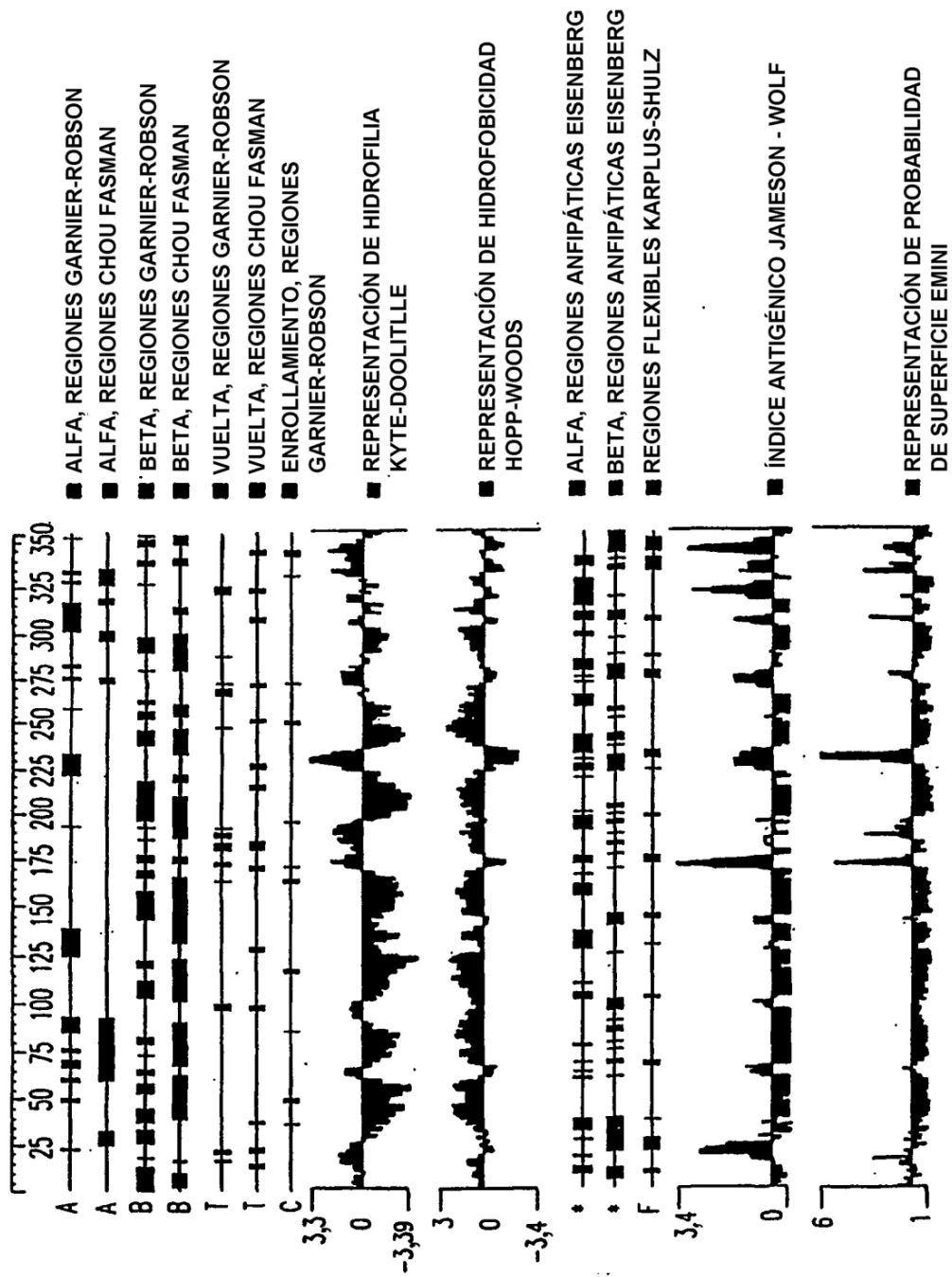


FIG.3

**Secuencia de VH anti-CCR5 1D8**

1 CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC  
 1 Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L

**CDR1**

61 ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGT AGT TTC TAC TGG AGC TGG ATC CGG CAG CCC  
 21 T C T V S G G S I S S F Y W S W I R Q P

**CDR2**

121 GCC GGG AAG GGA CTG GAC TGG ATT GGG CGT ATC TAT ACC AGC GGG AAC ACC AAC TAC AAC  
 41 A G K G L D W I G R I Y T S G N T N Y N

181 CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATG TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CGG TTC TCC CTG  
 61 P S L K S R V T M S V D T S K N R F S L

241 AAA CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CGG GGC  
 81 K L S S V T A A D T A V Y Y C A R D R G

**CDR3**

301 AGC AGC TGG TAC CCC GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCC  
 101 S S W Y P D A F D I W G Q G T M V T V S

361 TCA  
 121 S

**Secuencia de VK anti-CCR5 1D8**

1 GAT ATT GTG TTG ACG CAT TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC  
 1 D I V L T H S P G T L S L S P G E R A T

**CDR1**

61 CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG CGT GTT ACC AGC AGC TGC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA  
 21 L S C R A S Q R V T S S C L A W Y Q Q K

**CDR2**

121 CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT ACA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA  
 41 P G Q A P R L L I Y G T S S R A T G I P

181 GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG  
 61 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E

**CDR3**

241 CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GTT AGC TCA CCT CTC ACC TTC GGC  
 81 P E D F A V Y Y C Q Q Y V S S P L T F G

301 CAA GGC ACA CGA CTC GAG ATC AAA CGT  
 101 Q G T R L E I K R

**FIG.4**

## VH anti-CCR5 3C9

1	GAG	GTG	CAG	CTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTA	AAG	TCT	GGG	GGG	TCC	CTT	AGA	CTC	60		
1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	S	G	G	S	L	R	L	20	
<b>CDR1</b>																						
61	TCC	TGT	GCA	GCC	TCC	GGA	TTC	ACT	TTC	AGT	AAC	GCC	TGG	ATG	ACC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	120	
21	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	A	W	M	T	W	V	R	Q	A	40	
<b>CDR2</b>																						
121	CCA	GGG	AAG	AGG	CTG	GAG	TGG	GTT	GGC	CGT	ATT	AAA	AGC	AAT	GCT	GAT	GGT	GGG	TCA	ACA	180	
41	P	G	K	R	L	E	W	V	G	R	I	K	S	N	A	D	G	G	S	T	60	
181	GAC	TAC	GCT	GCA	CCC	GTG	AAA	GGC	AGA	TTC	ACC	ATC	TCA	AGA	GAT	GAT	TCA	AAA	AAC	ACG	240	
61	D	Y	A	A	P	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	80	
241	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AAA	ACC	GAG	GAC	ACA	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	AAC	ACA	300	
81	L	Y	L	Q	M	N	S	L	K	T	E	D	T	A	V	Y	Y	C	N	T	100	
<b>CDR3</b>																						
301	GAT	AAG	GGT	GGG	AGC	TAC	CCC	TAC	TAC	TAC	TAC	GGT	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	360	
101	D	K	G	G	S	Y	P	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	120	
361	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	G															379
121	T	V	T	V	S	S															127	

## VK anti-CCR5 3C9

1	GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	60	
1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	20	
<b>CDR1</b>																					
61	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	GGC	ATT	AGA	AAT	GAT	TTA	GGC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	120
21	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	R	N	D	L	G	W	Y	Q	Q	K	P	40
<b>CDR2</b>																					
121	GGG	AAA	GCC	CCT	AAG	CGC	CTG	ATC	TAT	GAT	GCA	TCC	AGT	TTG	CAA	AGT	GGG	GTC	CCA	TCA	180
41	G	K	A	P	K	R	L	I	Y	D	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	60
181	AGG	TTC	AGC	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GAA	TTC	ACT	CTC	ACA	ATC	AGC	AGC	CTG	CAG	CCT	240
61	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	80
<b>CDR3</b>																					
241	GAA	GAT	TTT	GCA	ACT	TAT	TAC	TGT	CTA	CAG	CAT	AAT	AGT	TAC	CCA	TTC	ACT	TTC	GGC	CCT	300
81	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	H	N	S	Y	P	F	T	F	G	P	100
301	GGG	ACC	AAA	GTG	GAT	ATC	AAA	CGA	324												
101	G	T	K	V	D	I	K	R	108												

**FIG.5**

**VH anti-CCR5 9E6**

1 GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC 60  
 1 E V Q L V E S G P G L V K P S E T L S L 20  
  

**CDR1**

 61 ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGT AGT TAC TAC TGG AGC TGG ATC CCG CAG CCC 120  
 21 T C T V S G G S I S S Y Y W S W I R Q P 40  
  

**CDR2**

 121 CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG TAT ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAC 180  
 41 P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N 60  
 181 CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG 240  
 61 P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L 80  
 241 AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GTC ATG 300  
 81 K L S S V T A A D T A V Y Y C A R D V M 100  
  

**CDR3**

 301 CAG CAG CCG GTA CCG GGT TAC TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGA ACC 360  
 101 Q Q P V R G Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T 120  
  
 361 CTG GTC ACC GTC TCC TCA 378  
 121 L V T V S S 126

**VK anti-CCR5 9E6**

1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GTC ACC 60  
 1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R V T 20  
  

**CDR1**

 61 CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGA GTT AGC AAC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA 120  
 21 L S C R A S Q R V S N S Y L A W Y Q Q K 40  
  

**CDR2**

 121 CCT GGC CAG GCT CCC AGG TTC CTC ATC TAT GGT GTA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA 180  
 41 P G Q A P R F L I Y G V S S R A T G I P 60  
 181 GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG 240  
 61 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E 80  
  

**CDR3**

 241 CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGT TCA CCG TGG ACG TTC GGC 300  
 81 P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P W T F G 100  
 301 CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA 327  
 101 Q G T K V E I K R 109

**FIG.6**