



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 122**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05850470 .5**

96 Fecha de presentación : **19.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1828234**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Antagonistas de quimiocinas CC.**

30 Prioridad: **21.12.2004 US 638312 P**
21.12.2004 EP 04106778

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.06.2009

73 Titular/es: **LABORATOIRES SERONO S.A.**
Zone Industrielle de l'Ourietaz
1170 Aubonne, CH

72 Inventor/es: **Proudfoot, Amanda;**
Power, Christine y
Frauenschuh, Achim

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 321 122 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

Antagonistas de quimiocinas CC.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a nuevos antagonistas de quimiocinas CC y sus usos, particularmente como compuestos antiinflamatorios y en el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con las quimiocinas CC.

10 **Antecedentes de la invención**

Las quimiocinas son pequeñas proteínas proinflamatorias segregadas, que median la migración direccional de los leucocitos de la sangre hacia el sitio de lesión. Dependiendo de la posición de las cisteínas conservadas que caracterizan esta familia de proteínas, la familia de quimiocinas puede dividirse estructuralmente en quimiocinas C, CC, CXC y CX₃C que se unen a una serie de receptores de membrana (Baggiolini M *et al.*, 1997; Fernandez EJ y Lolis E, 2002). Estos receptores de membranas, todos receptores acoplados a la proteína G heptahelicoidal, permiten que las quimiocinas ejerzan su actividad biológica en las células diana, que pueden presentar combinaciones específicas de receptores de acuerdo a su estado y/o tipo. Los efectos fisiológicos de las quimiocinas son producidos por un complejo y un sistema integrado de interacciones concurrentes: los receptores a menudo tienen especificidad de ligandos que se superpone, de modo que un receptor individual puede unirse a diferentes quimiocinas. Una quimiocina individual puede también unirse a diferentes receptores.

Los estudios sobre las relaciones entre estructura y actividad indican que las quimiocinas tienen dos sitios principales de interacción con sus receptores, la región flexible aminoterminal y el bucle conformacionalmente rígido que sigue a la segunda cisteína. Se cree que las quimiocinas se acoplan a los receptores mediante la región de bucle, y se piensa que este contacto facilita la unión de la región aminoterminal que produce la activación del receptor.

Usualmente, las quimiocinas se producen en el sitio de lesión y causan la migración y activación de los leucocitos, desempeñando un papel fundamental en los procesos inflamatorios, inmunitarios, homeostáticos, hematopoyéticos y angiogénicos. Por lo tanto, estas moléculas se consideran buenos candidatos diana para la intervención terapéutica en enfermedades asociadas a dichos procesos. La inhibición de las quimiocinas, o de sus receptores, puede reducir la maduración, reclutamiento y activación de leucocitos, como también otros procesos patológicos asociados con angiogénesis o arteriosclerosis (Baggiolini M, 2001; Loetscher P y Clark-Lewis I, 2001; Godessart N y Kunkel SL, 2001).

Además de las quimiocinas inhibidoras mutantes, los anticuerpos y péptidos, y los inhibidores de moléculas pequeñas que bloquean los receptores, la búsqueda de antagonistas eficaces de quimiocinas también se ha extendido a una serie de virus y otros organismos que, cuando se pongan en contacto con hospedantes humanos o mamíferos, muestren potentes actividades inmunomoduladoras que afecten al hospedante.

El mimitismo vírico de las citocinas, quimiocinas y sus receptores puede indicar estrategias de modulación inmunitaria para desarrollar productos terapéuticos (Alcami A, 2003; Lindow M *et al.*, 2003). Recientemente, se han revisado los factores inmunomoduladores expresados por artrópodos hematófagos (como mosquitos, jejenes y garrapatas) (Gillespie, RD *et al.*, 2000).

En particular, las glándulas salivales de las garrapatas producen una mezcla compleja de moléculas bioactivas que tienen, en particular, actividades antiinflamatorias, antihemostáticas y antiinmunitarias. Éstas incluyen proteínas bioactivas que controlan la histamina, se unen a las inmunoglobulinas o inhiben la cascada de complemento alternativa u otras proteasas.

A pesar de la gran cantidad de bibliografía, solamente algunos artículos mencionan las secuencias de cDNA identificadas por secuenciación aleatoria y cribados diferenciales de colecciones generadas a partir de diversas garrapatas y/o especies. No obstante, la gran mayoría de estas secuencias no se caracterizan bioquímicamente o funcionalmente, y muchas anotaciones se realizan solamente en base a la similitud de secuencia con proteínas conocidas implicadas en las funciones celulares básicas, como aquellas previamente caracterizadas en las glándulas salivales de garrapatas por actividades enzimáticas o por inducir respuestas de anticuerpos. En particular, no hay indicios de que las proteínas de garrapatas actúen como proteínas de unión a las quimiocinas CC ni de que funcionen como antagonistas de las quimiocinas CC.

60 **Sumario de la invención**

Sorprendentemente, se ha descubierto que la saliva de *Rhipicephalus sanguineus* (garrapata canina) contiene una nueva proteína denominada ChBP-59, que se une a las quimiocinas CC e inhibe su actividad. Se clonó ChBP-59 de una colección de cDNA de *Rhipicephalus sanguineus* y se expresó en células mamíferas. Esta proteína, como también sus derivados, fragmentos o miméticos, se pueden usar terapéuticamente, p. ej., como antagonistas de quimiocinas CC en organismos de mamíferos, o como dianas para la vacunación y el control de garrapatas y de patógenos transmitidos por garrapatas.

Un primer aspecto de la invención se refiere, por lo tanto, a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ChBP-59 o su fragmento o análogo. Los polipéptidos preferidos de la presente invención se unen a una quimiocina CC, e inhiben su actividad biológica. Un ejemplo específico de dicho polipéptido es ChBP-59 o su fragmento.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido tal como se definió anteriormente. Dichos ácidos nucleicos también incluyen oligonucleótidos aislados de ellos y vectores que contienen dichas moléculas, en particular vectores de expresión.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen selectivamente a los polipéptidos anteriormente definidos.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a células hospedantes y a animales no humanos transgénicos que expresan un polipéptido como el anteriormente definido, como también a métodos para producir dichas células y animales no humanos transgénicos.

Un quinto aspecto de la presente invención es un procedimiento para preparar un polipéptido según se definió anteriormente, típicamente usando tecnologías recombinantes.

Un sexto aspecto de la invención es una composición farmacéutica (incluyendo una vacuna o inmunógeno) que comprende un polipéptido o molécula de ácido nucleico según se definió anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso de un polipéptido o molécula de ácido nucleico según se definió anteriormente para la preparación de un medicamento para regular una respuesta inmunitaria o inflamatoria en un mamífero.

Otras características y ventajas de la invención serán obvias a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción de las Figuras

Figura 1: Alineación de la secuencia de cDNA de ChBP-59 con la secuencia de la proteína ChBP-59 codificada por el Marco de Lectura Abierto (ORF) relevante. La secuencia de señal (residuos 1-20, según lo pronosticado por el algoritmo SIGNALJ) se encuentra subrayada. El sitio de poliadenilación pronosticado está recuadrado. Los residuos Cisteína presentes en la proteína madura están resaltados. Los sitios de glucosilación unidos a N pronosticados están en negrita.

Figura 2: Alineación de cDNA de ChBP-59 compatible con Gateway que contiene los sitios flanqueadores attB obtenidos por dos tandas sucesivas de PCR. Las flechas indican la posición y el sentido de los cebadores PCR relevantes (que se resumen en la Tabla III). Los codones de comienzo y finalización están en negrita. Los aminoácidos que forman la secuencia de señal están subrayados.

Figura 3: (A) Mapa del vector de entrada pDONR221_ChBP-59-HIS para el sistema de clonación Gateway. B) Mapa del vector de expresión pDEST8_ChBP-59-HIS en células de insectos (TN5). (C) Mapa del vector de expresión pEAK12d_ChBP-59-HIS para la expresión en células de mamífero (HEK293/EBNA).

Figura 4: 10% SDS-gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) con solución azul de Coomassie que muestra el peso molecular de ChBP-59-HIS purificado de células HEK293 y células TN5 infectadas con baculovirus (marcadas BV en la fig. 4) usando cromatografía de afinidad Ni^{2+} y de intercambio aniónico. Los patrones de peso molecular se indican a la izquierda (M_R).

Figura 5: Autorradiografía del SDS-PAGE que muestra los complejos formados por el entrecruzamiento de la quimiocina CC ^{125}I -marcada CCL3/MIP-1 alfa con ChBP-59-HIS recombinante expresado en proteína de células HEK293 (HEK) o células TN5 de insecto (TN5), con la proteína de unión a la quimiocina CC vírica (vCCI, control positivo), con saliva de garrapata en bruto de *Rhipicephalus sanguineus* (RSs) o con Albúmina de Suero Bovino (BSA, control negativo). Las proteínas no marcadas se añadieron a la quimiocina CC radiomarcada (^{125}I -CCL3/MIP-1 alfa) en presencia (+) o ausencia (-) del agente de entrecruzamiento (BS^3). Los patrones de peso molecular (en Kd) se indican a la izquierda (M).

Figura 6: Actividad de unión de la quimiocina CC de ChBP-59-HIS recombinante purificado de células de insectos infectados con baculovirus. El efecto inhibitorio de ChBP-59-HIS se midió por adición de diluciones en serie de la proteína recombinante hasta una cantidad constante de un receptor de quimiocina inmovilizado por perlas SPA (CCR5) y de CCL5/RANTES (A), CCL3/MIP-1 alfa (B), o CCL2/MCP-1 (C) radiomarcado.

Figura 7: Efecto inhibitorio de ChBP-59-HIS en un ensayo que mide la quimiotaxia inducida por CCL3/MIP-1 alfa y CCL5/RANTES en células L1.2 de ratón que expresan el receptor de quimiocina CC, CCR5. La quimiocina CC se añadió a una concentración constante (1,0 nM) en las diferentes muestras que tenían una concentración molar en aumento (expresada en Log) de ChBP-59-HIS. Las unidades de Fluorescencia son proporcionales al número de células migradas.

Figura 8: Efecto inhibidor de ChBP-59-6His sobre el reclutamiento peritoneal inducido por CCL3/MIP-1 α . Se administró ChBP-59-6His por vía subcutánea a una dosis de 1,5 mg/kg, 45 min antes de la administración de CCL3/MIP-1 α a 0,15 mg/kg por vía intraperitoneal. Después de 18 h, los ratones se sacrificaron y se enumeró el número de células reclutadas en la cavidad peritoneal.

Figura 9: Dosis y respuesta del efecto inhibidor de ChBP-6His sobre el reclutamiento peritoneal inducido por CCL3/MIP-1 α en dos cepas de murino. Se administró ChBP-59-6His por vía subcutánea en diversas dosis, 45 min antes de la administración de CCL3/MIP-1 α a 0,5 mg/kg por vía intraperitoneal. Después de 18 h, se enumeró el número de granulocitos reclutados en la cavidad peritoneal. A) Balb/C B) cepa de ratón C57B6.

Figura 10: Visualización del proceso de reclutamiento celular por microscopia intravital. Se inyectaron juntos MIP-1 α (0,15 mg/kg) o ChBP-59 (0,5 mg/kg) y MIP-1 α (0,15 mg/kg) por vía intraescrotal. Después de 1 h, se extirpó el músculo cremáster y se observó la circulación con el microscopio intravital y se tomaron los registros para el análisis independiente. A) Rodaje. B) Adhesión. C) Emigración.

Figura 11: Efecto inhibidor de ChBP-59-6His sobre el reclutamiento celular de Th2 en los pulmones. Se sensibilizaron ratones con 2.500 huevos de *Schistosoma mansoni* por vía intraperitoneal en el día 1 y en el día 7. Siete días después, se expusieron a antígeno de huevo de Schistosoma (SEA) por vía intranasal. Seis días después, se administró ChBP-6His s.c. a 0,5 mg/kg 45 min antes de una segunda exposición a SEA por vía intratraqueal, y se proporcionó una segunda administración de ChBP-6His a 0,5 mg/kg, 24 h más tarde. Después de 48 h, se extrajo fluido BAL para enumeración celular. A) células totales. B) eosinófilos. C) células mononucleares.

Figura 12: Efecto inhibidor de ChBP-59-6His sobre la inflamación pulmonar inducida por ovalbúmina. Se inmunizaron los ratones dos veces con ovalbúmina en Al(OH)₃ (alum). Después de 14 días, se expusieron a la prueba con ovalbúmina en aerosol al 1% ovalbúmina aerosol durante 20 min. Se administró ChBP-59-6His a 0,5 mg/kg s.c., 45 min antes de la exposición al aerosol y posteriormente cada 12 h. Se extrajo BAL 2 días después de la exposición al aerosol para enumeración celular. A) células totales. B) eosinófilos. C) células mononucleares.

Figura 13: Efecto inhibidor de ChBP-59-6His sobre inflamación pulmonar inducida por bleomicina. Los ratones se sensibilizaron con 0,125 unidades de bleomicina por vía intratraqueal en el día 0. Antes de la sensibilización, se trataron con ChBP-59-6His a 0,5 mg/kg s.c., 45 min antes de la administración de bleomicina, y posteriormente con la misma dosis cada 12 h durante los 12 días siguientes. Los ratones que se analizaron en el día 2 después de la sensibilización se trataron con 3 dosis de ChBP-59-6His. En el día 2 o en el día 8, se extrajo BAL para enumeración celular. A) células totales. B) eosinófilos C) células mononucleares.

Descripción detallada de la invención

La presente invención provee nuevas composiciones y métodos para regular la actividad de las quimiocinas. Más particularmente, la presente invención describe una nueva proteína que tiene propiedades de unión a la quimiocina CC, que se puede usar para inhibir la acción de la quimiocina. Los ejemplos demuestran que esta proteína, que deriva de saliva de garrapata, se puede expresar y purificar en forma recombinante, y se une eficazmente a las quimiocinas CC e inhibe su acción, p. ej., la respuesta quimiotáctica específica de las células inducida por una quimiocina CC.

Un primer aspecto de la invención reside, por lo tanto, en un polipéptido ChBP-59, es decir, cualquier polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de ChBP-59 o su fragmento o análogo. Los polipéptidos preferidos de la presente invención se unen a una quimiocina CC e inhiben la actividad de dicha quimiocina. Los polipéptidos particulares de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en:

a) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 (SEC ID NO: 5);

b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 maduro (SEC ID NO: 6);

c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS (SEC ID NO: 17);

d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS maduro (SEC ID NO: 18);

e) una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico capaz de hibridación a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de a), b), c) o d) bajo condiciones moderadamente rigurosas, en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína que se une a una quimiocina CC e inhibe la actividad de dicha quimiocina;

f) una proteína por lo menos aproximadamente 70% idéntica en secuencia de aminoácidos a la proteína de a), b), c) o d) y que se une a una quimiocina CC e inhibe la actividad de dicha quimiocina;

g) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c), d), e) o f), en donde el fragmento retiene la capacidad de unirse a una quimiocina CC e inhibe la actividad de dicha quimiocina.

En una realización preferida, la proteína se selecciona del grupo que consiste en:

a) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 (SEC ID NO: 5);

b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 maduro (SEC ID NO 6);

c) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS (SEC ED NO: 17);

d) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS maduro (SEC ID NO: 18);

e) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c) o d), en donde el fragmento se une a una quimiocina CC e inhibe la actividad de dicha quimiocina.

Los polipéptidos de la invención pueden estar en forma madura, resultante de una o más modificaciones post-transicionales (glucosilación, fosforilación, modificación con endo/exopeptidasas para eliminar el péptido de señal, por ejemplo) o de una adición dentro del marco de la secuencia que codifica secuencias heterólogas (como marcadores o dominios que mejoran la detección y/o la purificación). Por ejemplo, ChBP-59 se ha expresado como proteína marcada con histidina recombinante en la forma completa (SEC ID NO: 17) y en la forma madura (SEC ID NO: 18), en líneas celulares tanto de mamífero como de insecto.

Los polipéptidos de la presente invención o sus correspondientes ácidos nucleicos pueden estar en forma aislada (p. ej., no en su entorno natural), incluyendo ácidos nucleicos y polipéptidos recombinantes o sintéticos.

Los ejemplos muestran que los polipéptidos ChBP-59 se unen a las quimiocinas CC y se pueden utilizar para inhibir (p. ej., reducir) su actividad. Esta caracterización se realizó haciendo uso de una serie de ensayos bioquímicos, incluyendo el uso de quimiocinas CC radiactivas, o ensayos funcionales que incluyen ensayos basados en células, como también modelos de enfermedad animal *in vivo*. Como se demuestra en los ejemplos, los polipéptidos ChBP-59 se unen, en particular, a las quimiocinas CC tales como CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 alfa o CCL2/MCP-1, o en general a las quimiocinas CC que se unen a los receptores CCR1 o CCR5. La proteína ChBP-59 se puede considerar una proteína de unión a la quimiocina CC de amplio espectro, reconociendo otras quimiocinas CC tales como TARC/CCL17, CCL18/PARC, CCL4/MIP-1 beta, MDC/CCL22, MCP-3/CCL7, MCP-2/CCL7 y Eotaxina/CCL11, no obstante con actividades diferentes. Dicho espectro de actividad confiere a los polipéptidos ChBP-59 de la presente invención una amplia gama de utilidad terapéutica, como se analizará a continuación.

Dentro del contexto de la presente invención, un fragmento de un polipéptido designa cualquier fragmento que comprende por lo menos 5, 7, 7, 8, 9 ó 10 residuos aminoácido consecutivos de dicha secuencia de polipéptidos. Los fragmentos particulares de la presente invención comprenden 15, 20, 25 o más residuos aminoácido de una proteína ChBP-59, tal como se describe en esta memoria. Los fragmentos preferidos retienen la capacidad de unir a la quimiocina por lo menos una actividad biológica de una proteína de longitud total, p. ej., una actividad inmunogénica o una actividad inmunomoduladora.

En este sentido, dentro del contexto de la presente invención, actividad “inmunomoduladora” designa cualquier actividad detectada *in vitro* o *in vivo* que afecta la respuesta inmunitaria o bien en un modo positivo o negativo. Los ejemplos de dichas actividades son actividades inmunizantes, actividades inmunosupresoras, actividades antiinflamatorias, actividades pro-/anti-apoptóticas o actividades antitumorales.

Alternativamente, el fragmento se puede identificar por proveer actividad inmunizante cuando se administra a un mamífero. Estos fragmentos deben tener propiedades antigénicas e inmunogénicas apropiadas para provocar una respuesta inmunitaria cuando sea necesaria (por ejemplo, contra garrapatas u organismos patógenos transmitidos por garrapatas). La bibliografía proporciona muchos ejemplos de cómo dichas secuencias funcionales pueden identificarse como antígenos de vacunas experimentales, y eventualmente administrarse con adyuvantes y/o entrecruzarse con un vehículo. (Mulenga A *et al.* 2000; WO 01/80881; WO 03/030931; WO 01/87270). Se puede usar un antígeno o grupo de antígenos específico identificado en ChBP-59 para prevenir o reducir la infección o enfermedad ectoparasitaria en un animal, de modo que la inmunidad del animal al ectoparásito se refuerce por exposición natural del animal al ectoparásito (WO 95/22603). Finalmente, el fragmento se puede utilizar también para producir anticuerpos dirigidos a toda la proteína para aplicaciones de detección o diagnóstico.

Las propiedades de ChBP-59 anteriormente definidas y ejemplificadas en esta memoria, que usan variantes recombinantes de esta secuencia, se pueden mantener o incluso potenciar en los mutantes activos. Esta categoría de moléculas incluye análogos naturales o sintéticos de dicha secuencia, en donde se han añadido, eliminado o sustituido uno o más residuos aminoácido, siempre que exhiban la misma actividad biológica caracterizada en la presente invención a niveles comparables o superiores, según lo determinado por lo que se describe en los Ejemplos a continuación.

En particular, el término “activo” significa que dichos compuestos alternativos deben mantener, o incluso potenciar, las propiedades de inmunomodulación y unión a la quimiocina CC de ChBP-59.

Las moléculas mutantes activas se pueden generar por técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, tecnologías combinatorias al nivel de la secuencia de DNA codificante (como barajado de DNA, visualización/selección de fagos) o por

estudios de diseño asistido por ordenador, o cualquier otra técnica conocida adecuada, que proporcione un conjunto finito de péptidos o polipéptidos sustancialmente mutados o acortados en forma correspondiente. Estas moléculas alternativas se pueden obtener y ensayar rutinariamente por el experto en la técnica, usando las enseñanzas presentadas en la técnica anterior y en los Ejemplos que siguen.

De acuerdo con la presente invención, los cambios preferidos en estos mutantes activos se conocen comúnmente como sustituciones “conservadoras” o “seguras”, e implican residuos no básicos. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas con aminoácidos que tienen propiedades químicas suficientemente similares, con el fin de conservar la estructura y la función biológica de la molécula. Está claro que las inserciones y delecciones de aminoácidos pueden además elaborarse en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones implican solamente unos pocos aminoácidos, p. ej., menos de diez y preferiblemente menos de tres, y no eliminan ni desplazan aminoácidos que son críticos para la conformación funcional de una proteína o péptido.

La bibliografía provee muchos modelos mediante los cuales se puede llevar a cabo la selección de sustituciones de aminoácidos conservadoras en base a estudios estadísticos y de físico-química de la secuencia y/o la estructura de la proteína natural (Rogov SI y Nekrasov AN, 2001). Los experimentos de diseño de proteínas han demostrado que el uso de subconjuntos específicos de aminoácidos pueden producir proteínas plegables y activas, ayudando a la clasificación de sustituciones “sinónimas” de aminoácidos que se pueden acomodar más fácilmente en la estructura de la proteína y que se pueden usar para detectar homólogos y parálogos de ChBP-59 funcionales y estructurales (Murphy LR *et al.*, 2000). Los grupos aminoácidos sinónimos y los grupos sinónimos más preferidos para las sustituciones son aquellos definidos en la Tabla I.

No obstante, en el contexto de la secuencia de ChBP-59, los residuos específicos pueden tener particular importancia. Por ejemplo, ChBP-59 no es significativamente homólogo a cualquier proteína conocida pero contiene un número par de residuos cisteína en la proteína madura, en particular en la posición correspondiente a 32, 49, 53, 66, 85, 90, 95 y 104 en ChBP-59 de longitud total de acuerdo con la SEC ID NO: 5. No obstante, ChBP-59 contiene tres sitios de glucosilación potenciales en la posición correspondiente a Asparagina 39, 54, y 62 de ChBP-59 de longitud total de acuerdo con la SEC ID NO: 5. Estos residuos pueden ser importantes para el correcto pliegue y/o actividad, y preferiblemente deben conservarse en las correspondientes posiciones de estos polipéptidos alternativos. Alternativamente, las cisteínas sustituidas o los sitios de glucosilación pueden restablecerse en una posición diferente de la proteína.

Alternativamente, los mutantes activos de ChBP-59 pueden ser la consecuencia de alteraciones de secuencia que reducen la inmunogenicidad de dicha proteína de unión a la quimiocina CC cuando se administra a un mamífero. La bibliografía provee muchos ejemplos de estas alteraciones de secuencia que se pueden diseñar e introducir en este alcance o para otras optimizaciones funcionales que permiten una administración segura y eficaz de una proteína terapéutica, especialmente cuando es una proteína no humana, no mamífera o no natural (Schellekens H, 2002). Los ejemplos de planteamientos técnicos para lograr estas moléculas son la evolución dirigida (Vassero AP *et al.*, 2003), el diseño racional (Marshall SA *et al.*, 2003), la bioinformática (Gendel SM, 2002), la identificación y neutralización de epítomos de células T CD4+ (WO 03/104263; WO 03/006047; WO 02/98454; WO 98/52976; WO 01/40281), la fusión con otras secuencias de proteínas (WO 02/79415; WO 94/11028) o la conjugación con otros compuestos (WO 96/40792).

Las secuencias derivadas de ChBP-59 activas pueden ser análogos u ortólogos naturales de ChBP-59 que se pueden aislar, en particular, de otras especies de garrapata, en particular aquellas que pertenecen a la familia *Ixodidae*, y más en particular, a la subfamilia *Rhipicephalinae*, a la cual pertenece *Rhipicephalus sanguineus*, como también otras subfamilias como *Ixodinae* (que incluye *Ixodes scapularis* e *Ixodes ricinus*) o *Amblyomminae* (que incluye *Amblyomma variegatum* y *Amblyomma americanum*). Alternativamente, se pueden identificar ortólogos en mamíferos, como de ser humano y ratón.

Se dispone de información limitada sobre el genoma y el transcriptoma de artrópodos hematófagos, y mayormente se asocia con secuencias ribosómicas y mitocondriales, que se estudiaron para determinar las relaciones filogenéticas en base a su conservación (Murrell A *et al.*, 2001). Los datos genómicos de la garrapata están disponibles solamente en formatos parciales y preliminares (Ullmann AJ *et al.*, 2002), pero se pueden realizar otros análisis de los genes de garrapata que codifican las proteínas de unión a la quimiocina CC mediante el uso de DNA genómico que puede extraerse de garrapatas ixodidas aplicando condiciones y métodos específicos (Hill CA y Gutierrez, J A 2003), en particular para detectar cualquier polimorfismo significativo en proteínas de glándula salival, como ya se demostró (Wang H *et al.*, 1999). Las secuencias genómicas y de proteínas de estos organismos son importantes para entender su fisiología y biología, proporcionando así información útil para entender la función de las proteínas de la invención en las relaciones entre hospedantes, parásitos y patógenos transmitidos por parásitos (Valenzuela JG, 2002b).

La caracterización bioquímica y fisiológica de las actividades de unión a la quimiocina CC descrita para la proteína homóloga a ChBP-59 en la presente invención se puede realizar aplicando cualquiera de las tecnologías recientemente mejoradas para el estudio de garrapatas y patógenos transmitidos por garrapatas, como electroforesis en gel bidimensional (Madden RD *et al.*, 2004) o interferencia de RNA (Aijamali MN *et al.*, 2003). Además, se pueden realizar otros estudios para mapear el sitio de reconocimiento de la quimiocina CC en estas proteínas y los mecanismos del antagonismo de la quimiocina CC (Véase BT *et al.*, 2001; Beck CG *et al.*, 2001; Burns JM *et al.*, 2002; Webb LM *et al.*, 2004) o para identificar las modificaciones post-transicionales relevantes (Alarcon-Chaidez FJ *et al.*, 2003).

Otro aspecto de la invención son proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ChBP-59, como se definió anteriormente, operativamente unido a un dominio heterólogo, p. ej., una o más secuencias de aminoácidos que pueden seleccionarse de lo siguiente: un dominio extracelular de una proteína unida a una membrana, regiones constantes de inmunoglobulina (región Fc), dominios de multimerización, señales de exportación y secuencias de marcadores (como aquellas que ayudan a la purificación por afinidad: marcador HA, marcador Histidina, GST, péptidos FLAAG o MBP).

En el contexto de una proteína de fusión, la expresión “operativamente unido” indica que el polipéptido ChBP-59 y las secuencias de aminoácidos adicionales se asocian a través de enlace(s) peptídicos, o bien directamente o vía residuos espaciadores (p. ej., un enlazador), en este modo, la proteína de fusión puede producirse en forma recombinante, por expresión directa en una célula hospedante de una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, como se analizará a continuación. Además, si es necesario, las secuencias de aminoácidos adicionales incluidas en la proteína de fusión se pueden eliminar, o bien al final de proceso de producción/purificación o *in vivo*, p. ej., mediante una endo-/exopeptidasa apropiada, como se analizará a continuación. El resto heterólogo puede estar operativamente unido a la porción N-terminal o C-terminal del polipéptido ChBP-59.

El diseño de los restos y/o enlazadores, como también los métodos y estrategias para la construcción, purificación, detección, maduración y uso de las proteínas de fusión se analiza ampliamente en la bibliografía (Nilsson J *et al.*, 1997; “Applications of chimeric genes and hybrid proteins” Methods Enzymol. Vol. 326-328, Academic Press, 2000). En general, las secuencias heterólogas tienen como fin proveer propiedades adicionales sin debilitar la actividad terapéutica de la proteína original (unión a la quimiocina CC, por ejemplo) en un modo significativo. Los ejemplos de dichas propiedades adicionales son un procedimiento más simple de purificación, una semivida más prolongada en los fluidos corporales, un resto de unión adicional, la maduración mediante una digestión endoproteolítica, la estabilidad durante la producción recombinante o la localización extracelular. Esta última característica es de particular importancia para definir un grupo específico de proteínas de fusión o quiméricas incluidas en la definición anterior, ya que permite que los polipéptidos se localicen en el espacio en donde se facilita el aislamiento y la purificación de estos polipéptidos, y en donde las quimiocinas CC normalmente están activas.

La opción de que una o más de estas secuencias se condensan a un polipéptido ChBP-59 es funcional al protocolo de uso y/o purificación de dicha proteína como proteína recombinante. Por ejemplo, la actividad de CHBP-59 se ensayó en los ejemplos mediante una proteína de fusión que incluye una secuencia del marcador histidina, facilitando tanto la detección como la purificación de CHBP-59. Estas secuencias se pueden elegir entre los siguientes tres grupos básicos de secuencias heterólogas.

Un primer grupo de dichas secuencias consiste en ayudar a la secreción y la purificación de la proteína usando tecnologías de DNA recombinante, como un péptido de señal y señales de exportación (Rapoport TA *et al.*, 1996), o secuencias de marcadores que ayudan a la purificación por afinidad (marcador HA, marcador Histidina, GST, FLAG o MBP).

Un segundo grupo de secuencias heterólogas se representa mediante aquellos que permiten una mejor estabilidad y bioactividad de las proteínas.

Un ejemplo típico de una estrategia que permite una semivida prolongada de una proteína es la fusión con albúmina de suero humano o con péptidos y otras secuencias modificadoras (p. ej., por miristoilación) que permiten la unión a albúmina de suero humano circulante (Chuang VT *et al.*, 2002; Graslund T *et al.*, 1997; WO 01/77137). Alternativamente, la secuencia adicional puede ayudar a direccionar hacia la localización específica, como en el cerebro (WO 03/32913).

Otra forma de mejorar la estabilidad de una proteína recombinante cuando se administra a un sujeto consiste en generar multímeros de la proteína, condensando dominios aislados de otras proteínas, lo cual permite la formación de dímeros, trímeros, etc. Los ejemplos de secuencias de proteínas que permiten la multimerización de los polipéptidos de la invención son dominios aislados de proteínas tales como hCG (WO 97/30161), colágeno X (WO 04/33486), C4BP (WO 04/20639), proteínas Erb (WO 98/02540) o péptidos con bobinas bobinadas (WO 01/00814).

Un ejemplo muy conocido de dichas proteínas de fusión se representa por la región constante/Fc de las proteínas de la inmunoglobulina humana, lo que permite la dimerización común a inmunoglobulinas humanas. En la bibliografía, se describen diferentes estrategias para generar la proteína de fusión que comprende una proteína terapéutica y un fragmento de inmunoglobulina (WO 91/08298; WO 96/08570; WO 93/22332; WO 04/085478; WO 01/03737, WO 02/66514). Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica CHBP-59 maduro se puede clonar en un vector de expresión condensado a una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de señal de CHBP-59 original (o cualquier otra secuencia de señal/exportación apropiada) en su extremo 5', y la secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante de cadena pesada lambda de inmunoglobulina humana IgG1 (NCBI Acc. No. CAA75302; segmento 246-477) en su extremo 3'. El vector resultante se puede emplear para transformar una línea celular de CHO o HEK293, y se pueden seleccionar clones que expresan y segregan establemente la proteína de fusión recombinante que tiene CHBP-59 en el término N y la secuencia IgG1 en el término C. Una vez hecho esto, se pueden utilizar para aumentar a escala la producción y para purificar la proteína de fusión recombinante del medio de cultivo. Alternativamente, la posición del ácido nucleico que codifica la región constante de la cadena pesada lambda de inmunoglobulina humana IgG1 y CHBP-59 se puede invertir, y la proteína resultante se puede expresar y segregar usando incluso la secuencia de señal original de CHBP-59 o cualquier otra secuencia de señal/exportación apropiada. Usando esta tec-

nología, puede ser también posible generar heterodímeros si los dos constructos diferentes que expresan una proteína de fusión CHBP-59-Fc y el otro una proteína de fusión diferente basada en Fc (por ejemplo, otro antagonista de la quimiocina CC) se co-expresan en la misma célula hospedante (WO 00/18932).

Otro grupo de secuencias heterólogas se representa por aquellas que añaden una actividad funcional adicional que puede sinergizar o ampliar las que se muestran mediante CHBP-59. Estas secuencias, que se espera que se aislen de un dominio extracelular de una proteína unida a una membrana (como el receptor de quimiocina CC) o que estén presentes en una proteína segregada, pueden ser activas como también antagonistas de la quimiocina CC y, en general, deben tener una actividad inmunomoduladora.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia adicional incluida en las proteínas de fusión puede eliminarse, p. ej., al final del proceso de producción o purificación, o *in vivo*, si es necesario, p. ej., mediante una endo-/exopeptidasa apropiada. Por ejemplo, la secuencia del enlazador incluida en la proteína recombinante puede presentar un sitio de reconocimiento para una endopeptidasa (como una caspasa) que se puede emplear para separar enzimáticamente la proteína deseada de la secuencia heteróloga, o bien *in vivo* o *in vitro*. Alternativamente, si la secuencia de la proteína que se ha de expresar no contiene una metionina de partida (por ejemplo, si la secuencia codifica solamente la secuencia madura de la proteína, sin el péptido de señal), una proteína de la invención se puede expresar correctamente en una célula hospedante con una Metionina de partida. Este aminoácido adicional puede luego mantenerse en la proteína recombinante resultante o, mediante una exopeptidasa, tal como Metionina Aminopeptidasa, de acuerdo con los métodos descritos en la bibliografía (Van Valkenburgh HA y Kahn RA, 2002; Ben-Bassat A, 1991).

Se pueden obtener otras variantes o análogos de los polipéptidos de la invención en la forma de miméticos de péptidos (también llamados péptido-miméticos), en los que la naturaleza del péptido o polipéptido ha sido químicamente modificada al nivel de las cadenas laterales de aminoácidos, de la quiralidad de los aminoácidos y/o de la cadena principal del péptido. Estas alteraciones tienen como fin proveer antagonistas con mejores características de purificación, potencia y/o farmacocinética. Por ejemplo, cuando el péptido susceptible a escisión por peptidasas después de la inyección al sujeto representa un problema, el reemplazo de un enlace peptídico particularmente sensible con un mimético de péptido no escindible puede proporcionar un péptido más estable y, por consiguiente, más útil como terapéutico. De modo similar, el reemplazo de un residuo aminoácido L es una forma convencional de tornar el péptido menos sensible a proteólisis y, finalmente, más similar a los compuestos orgánicos que no son péptidos. También son útiles los grupos bloqueantes aminoterminales tales como t-butiloxicarbonilo, acetilo, teflo, succinilo, metoxisuccinilo, suberilo, adipilo, azelaílo, dansilo, benciloxicarbonilo, fluorenilmetoxicarbonilo, metoxiazelaílo, metoxiadipilo, metoxisuberilo y 2,4-dinitrofenilo. Se conocen en la técnica muchas otras modificaciones que proporcionan mayor potencia, actividad prolongada, facilidad de purificación y/o mayor semivida (WO 02/10195; Villain M *et al.*, 2001). Los grupos “sinónimos” alternativos preferidos para derivados de aminoácidos incluidos en los miméticos de péptidos son aquellos definidos en la Tabla II. Por “derivado de aminoácido” se entiende un aminoácido o entidad química de tipo aminoácido que no sea uno de los 20 aminoácidos genéticamente codificados que ocurren naturalmente. En particular, el derivado de aminoácido puede contener restos alquilo sustituidos o no sustituidos que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, y puede incluir uno o más heteroátomos. Los derivados de aminoácido se pueden elaborar *de novo* u obtenerse de fuentes comerciales (Calbiochem-Novabiochem AG, Suiza; Bachem, EE. UU.). Las técnicas para la síntesis y el desarrollo de miméticos de péptidos, como también miméticos no peptídicos, se conocen en la técnica (Hruby VJ y Balse PM, 2000; Golebiowski A *et al.*, 2001). En la bibliografía, también se describen diversas metodologías para incorporar aminoácidos no naturales a proteínas, usando sistemas de traducción *in vitro* e *in vivo*, para sondear y/o mejorar la estructura de y la función de la proteína (Dougherty DA, 2000).

Como se analizará a continuación, los polipéptidos de la invención se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo tecnologías recombinantes y tecnologías de síntesis química.

Otro objeto de la invención reside en una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido según se definió anteriormente, es decir, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ChBP-59 o su fragmento o análogo. Las moléculas de ácido nucleico particulares de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en:

a) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 (SEC ID NO: 5);

b) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 maduro (SEC ID NO: 6);

c) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS (SEC ID NO: 17);

d) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS maduro (SEC ID NO: 18);

e) una molécula de ácido nucleico capaz de hibridación a una molécula de ácido nucleico de a), b), c) o d) bajo condiciones moderadamente rigurosas, y que codifica una proteína que se une a una quimiocina CC;

f) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína por lo menos aproximadamente 70% idéntica en una secuencia de aminoácidos a una proteína de a), b), c) o d), y que se une a una quimiocina CC;

g) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende un fragmento de una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico de a), b), c), d), e), o f). cuyo fragmento se une a una quimiocina CC; y

h) una variante degenerada de una molécula de ácido nucleico de a), b), c), d), e), f) o g).

En particular, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en:

a) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 (SEC ID NO: 5);

b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 maduro (SEC ID NO 6);

c) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-594-HIS (SEC ID NO: 17);

d) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS maduro (SEC ID NO: 18);

e) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c) o d), cuyo fragmento se une a una quimiocina CC;

f) un mutante activo de una proteína de a), b), c) o d), en donde en dicho mutante se han añadido, eliminado o sustituido uno o más residuos aminoácido y en donde dicho mutante se une a una quimiocina CC; y

g) una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión comprende una proteína de a), b), c), d), e) o f) operativamente unida a una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas de lo siguiente: un dominio extracelular de una proteína unida a una membrana, una región constante de inmunoglobulina, un dominio de multimerización, un péptido de señal, una señal de exportación y una secuencia de marcador.

Dentro del contexto de la presente invención, una “variante degenerada” designa todas las secuencias de ácido nucleico que, en virtud de la degeneración del código genético, codifican la misma secuencia de aminoácidos que un ácido nucleico de referencia.

Asimismo, la expresión “molécula de ácido nucleico” abarca todos tipos diferentes de ácidos nucleicos, incluyendo, aunque sin limitación, ácidos desoxirribonucleicos (p. ej., DNA, cDNA, gDNA, DNA sintético, etc.), ácidos ribonucleicos (p. ej., RNA, mRNA, etc.) y ácidos nucleicos de péptidos (PNA). En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico es una molécula de DNA, tal como una molécula de DNA bicatenaria, típicamente un cDNA.

Si los aspectos principales se dirigen al DNA y a las secuencias de proteínas del ChBP-59 descrito en los ejemplos, las realizaciones específicas incluyen una serie de secuencias relacionadas con ChBP-59, como secuencias de DNA o RNA capaces de hibridarse bajo condiciones moderadamente rigurosas (solución de prelavado de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y condiciones de hibridación de 50°C, 5X SSC, durante una noche) a las secuencias de DNA que codifican ChBP-59, y que codifican una proteína de unión a la quimiocina CC.

Por ejemplo, la invención provee la secuencia del cDNA de *Rhipicephalus sanguineus* que expresa ChBP-59 (SEC ID NO: 3), el Marco de Lectura Abierto asociado (ORF; SEC ID NO: 4), una secuencia de cDNA modificado que permite la expresión de ChBP-59 como proteína recombinante condensada a un marcador de histidina en células hospedantes de mamíferos o insectos (SEC ID NO: 15), y el ORF asociado (SEC ID NO: 16).

En otras realizaciones preferidas, las secuencias relacionadas con ChBP-59 son moléculas de DNA que codifican proteínas que son por lo menos aproximadamente 70%, preferiblemente 80% y lo más preferiblemente 90% idénticas en secuencia de aminoácidos a ChBP-59. Este valor se puede calcular con cualquiera de los programas especializados, como FASTA (Pearson WR, 2000) y, para secuencias parciales o fragmentos, se calcula sobre esa porción de ChBP-59 que está presente en el fragmento.

Otra realización preferida es un oligonucleótido que comprende un fragmento de, o se hibrida específicamente a una región de la secuencia de una molécula de ácido nucleico según se definió anteriormente. Dichos oligonucleótidos típicamente contienen entre 5 y 100 nucleótidos de longitud, y se pueden seleccionar, p. ej., del grupo que consiste en oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. Estos oligonucleótidos se pueden usar para detectar (por PCR o transferencia Southern, por ejemplo) las secuencias no codificantes/codificantes en transcritos que codifican ChBP-59 y secuencias relacionadas en una muestra, o para generar y subclonar variantes recombinantes de ChBP-59, como se muestra en el ejemplo para el extremo 3' de los cebadores utilizados para subclonar y modificar la secuencia codificante ChBP-59 como una variante marcada con histidina (59-attB1 directa y 59-attB2 inversa; SEC ID NO: 7 y 8).

En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico anteriormente definidas pueden estar comprendidas en un vector de clonación o expresión. En este sentido, un objeto particular de la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende un promotor operativamente asociado a una molécula de ácido nucleico tal como se definió anteriormente, en un promotor constitutivo específico de tejido o un promotor regulado (p. ej., inducible). El vector puede comprender cualquier elemento regulador adicional, como un terminador, potenciador, origen de replicación, marcador de selección, etc. El vector puede ser un plásmido, cósmido, vector vírico, fago, cromosoma artificial y similar.

En una realización particular, este vector puede comprender:

- a) un DNA de la invención; y
- b) un casete de expresión;

en donde dicho DNA (a) está operativamente asociado a un promotor constitutivo específico de tejido o a un promotor inducible incluido en la secuencia (b).

Opcionalmente, si el ácido nucleico codificante (es decir, la secuencia (a)) no contiene un codón para una metionina de partida (por ejemplo, si esta secuencia codifica solamente la secuencia madura de la proteína, sin el péptido de señal), el vector o el casete de expresión puede también contener una secuencia ATG que está clonada en 5' a dicha secuencia, de modo tal que puede expresarse correctamente con una Metionina de partida. Este aminoácido adicional puede luego mantenerse en la proteína recombinante resultante, o eliminarse mediante una enzima, tal como Metionina Aminopeptidasa, de acuerdo con métodos descritos en la bibliografía (Van Valkenburgh HA y Kahn RA, 2002; Ben-Bassat A, 1991).

Este vector puede permitir la expresión de las proteínas de la invención, no solamente en la condición del cultivo de tejido sino también *in vivo*, por razones experimentales o terapéuticas. Por ejemplo, las células que sobre-expresan la proteína de la invención pueden transferirse (p. ej., encapsularse) en un modelo animal para controlar los efectos fisiológicos de la administración constante de la proteína, y eventualmente antes de aplicar las células a seres humanos. Alternativamente, el vector se puede usar para transferencia génica mediada por retrovirus, o cualquier otra tecnología que permita la introducción y expresión de un vector o de la secuencia que codifica DNA aislado en un animal bajo el control de un promotor endógeno. Este planteamiento permite la generación de animales no humanos transgénicos en donde las proteínas de la invención se expresan constitutivamente o en un modo regulado (p. ej., en tejidos específicos y/o después de la inducción con compuestos específicos). Se aplicaron planteamientos similares a otra proteína de unión a quimiocina no mamífera, demostrando varios efectos de desarrollo y patológicos (Jensen KK *et al.*, 2003; Pyo R *et al.*, 2004; Bursill CA *et al.*, 2004).

Otro objeto de la invención consiste en células hospedantes transformadas o transfectadas con un vector de clonación o expresión anteriormente indicado. Estos vectores se pueden usar en un procedimiento de preparación de los polipéptidos de la invención. En este sentido, un objeto de la invención es un método para preparar un polipéptido ChBP-598 según se definió anteriormente, que comprende cultivar células recombinantes como se definió anteriormente bajo condiciones que permiten o promueven la expresión y recuperan el polipéptido ChBP-59. Cuando el vector expresa el polipéptido como una proteína segregada en el espacio extracelular, la proteína se puede recoger más fácilmente y purificarse a partir de células cultivadas en vista de mayor procesamiento.

Muchos libros y revisiones proveen enseñanzas sobre cómo clonar y producir proteínas recombinantes usando vectores y células hospedantes Procarióticas o Eucarióticas, como por ejemplo algunos títulos de la serie "A Practical Approach" publicada por Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001). En particular, los ejemplos muestran cómo, una vez que la secuencia de DNA que codifica ChBP-59 ha sido identificada cribando la colección de cDNA de *Rhipicephalus sanguineus*, se puede adaptar, modificar e insertar el ORF a los vectores de expresión para obtener la correspondiente proteína recombinante.

En general, los vectores pueden ser vectores episomales o no/homológamente integradores, que pueden introducirse a las células hospedantes apropiadas por cualquier medio adecuado (transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, microinyección directa, etc.) para transformarlas. Los factores de importancia en la selección de un vector plásmido, vírico o retrovírico particular incluyen: la facilidad con la que las células receptoras que contienen el vector pueden ser reconocidas y seleccionadas entre aquellas células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desean en un hospedante particular; y, si se desea, ser capaces de "transportar" el vector entre células hospedantes de diferentes especies. Los vectores deberán permitir la expresión de las proteínas aisladas de la invención, o las proteínas de fusión que las comprenden en la célula hospedante procariótica o eucariótica bajo el control de las secuencias reguladoras de la iniciación/terminación transcripcional apropiada, que se seleccionan para ser constitutivamente activas o inducibles en dicha célula. Una línea celular sustancialmente enriquecida en dichas células puede entonces aislarse para proveer una línea celular estable (como se muestra en el ejemplo con las líneas celulares HEK293 y TN5).

Para células hospedantes Eucarióticas (p. ej., células de levadura, insecto o mamífero), se pueden emplear diferentes secuencias reguladoras de transcripción y traducción, dependiendo de la naturaleza del hospedante. Pueden derivar

de fuentes víricas, como adenovirus, papilloma virus bovino, virus de simio o similar, en donde las señales reguladoras se asocian con un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. Los ejemplos son el promotor TK del Herpes virus, el promotor temprano SV40, el promotor del gen de levadura gal4, etc. Se pueden seleccionar señales reguladoras de iniciación transcripcional que permitan la represión y activación, de modo que la expresión de los genes se pueda modular. Las células que han sido establemente transformadas por el DNA introducido se pueden seleccionar introduciendo también uno o más marcadores que permitan la selección de células hospedantes que contienen el vector de expresión. El marcador puede también proveer fototrofia a un hospedante auxotrópico, resistencia a biocidas, p. ej., antibióticos, o metales pesados tales como cobre o similares. El gen marcador seleccionable puede estar directamente unido a las secuencias génicas de DNA que se han de expresar o introducirse a la misma célula por co-transfección. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima de las proteínas de la invención.

Las células hospedantes para producción recombinante pueden ser células Procarióticas o Eucarióticas. Las células Procarióticas particularmente adecuadas incluyen bacterias (como *Bacillus subtilis* o *E. coli*) transformadas con un vector de expresión de DNA bacteriófago recombinante, plásmido o cósmido. Se prefieren las células hospedantes Eucarióticas, p. ej., células mamíferas, como células de ser humano, mono, ratón y ovario de hámster chino (CHO), porque proporcionan modificaciones post-traduccionales a las moléculas de proteína, incluyendo el correcto pliegue o glucosilación en los sitios correctos. Las células hospedantes Eucarióticas alternativas son células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura. Las células de levadura también pueden realizar modificaciones peptídicas post-traduccionales, incluyendo glucosilación. Existe una serie de estrategias de DNA recombinante que utilizan fuertes secuencias promotoras y un alto número de copias de plásmidos que se pueden utilizar para la producción de las proteínas deseadas en levadura. La levadura reconoce secuencias líderes en productos génicos de mamíferos clonados y segrega péptidos que portan secuencias líderes (es decir, pre-péptidos).

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de un polipéptido recombinante, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente el polipéptido de interés pueden transformarse usando vectores de expresión que pueden contener orígenes víricos de replicación y/o elementos de expresión endógena y un gen de marcador seleccionable en el mismo vector o en un vector separado. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células se desarrollen durante 1-2 días en un medio enriquecido, antes de transferirse al medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el desarrollo y la recuperación de las células que expresan exitosamente las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células establemente transformadas pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo de célula. Una línea celular sustancialmente enriquecida en dichas células puede luego aislarse para proveer una línea celular estable.

Un método particularmente preferido de producción de alto rendimiento de un polipéptido recombinante de la presente invención consiste en el uso de ampliación por dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO deficientes de DHFR, mediante el uso de niveles sucesivamente en aumento de metotrexato, como se describe en la patente US 4.889.803. El polipéptido obtenido puede estar en forma glucosilada.

Las líneas celulares de mamíferos disponibles como hospedantes para expresión se conocen en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de American Type Culture Collection (ATCC) incluyendo, aunque sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, riñón de hámster bebé (BHK), riñón de mono (COS), C127, 3T3, BHK, HEK 293, melanoma Bowes y carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y una serie de otras líneas celulares. En el sistema de baculovirus, los materiales para sistemas de expresión celular de baculovirus/insecto se comercializan en forma de un estuche, entre otros, por Invitrogen.

Alternativamente, los polipéptidos de la presente invención se pueden preparar por síntesis artificial. En este sentido, los ejemplos de tecnologías de síntesis química son síntesis de fase sólida y síntesis de fase líquida. Como síntesis de fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al término carboxi del péptido que se ha de sintetizar se une a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, y por repetición alternativa de reacciones, uno en donde los aminoácidos con sus grupos amino y grupos funcionales de cadena lateral protegidos con grupos protectores apropiados se condensan uno por uno desde el término carboxi hasta el término amino, y uno donde se liberan los aminoácidos unidos a la resina o al grupo protector de los grupos amino de los péptidos, la cadena de péptidos se extiende por lo tanto de esta manera. Los métodos de síntesis de fase sólida se clasifican ampliamente por el método tBoc y el método Fmoc, dependiendo del tipo de grupo protector utilizado. Típicamente, los grupos protectores incluyen tBoc (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxicarbonilo), Bzl (bencilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Mbh (4,4-dimetoxidibenzhidrilo), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo), Trt (trilito), Tos (tosilo), Z (benciloxicarbonilo) y Cl2-Bzl (2,6-diclorobencilo) para los grupos amino; NO2 (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidino; y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo. Después de la síntesis del polipéptido deseado, se somete a la reacción de desprotección y se corta del soporte sólido. Dicha reacción de corte del péptido se puede llevar a cabo con fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico para el método Boc, y con TFA para el método Fmoc. Las proteínas totalmente sintéticas de tamaño comparable a aquel de ChBP-59 se describen en la bibliografía (Brown A *et al.*, 1996).

Los polipéptidos de la presente invención se pueden producir, formular, administrar o utilizar genéricamente en otras formas alternativas que pueden preferirse de acuerdo con el método deseado de uso y/o producción. La proteína de la invención se puede modificar post-traduccionamente, por ejemplo por glucosilación, como se muestra en los ejemplos.

En general, la proteína de la invención se puede proveer en forma de fracciones activas, precursores, sales, derivados, conjugados o complejos.

Como se indicó anteriormente, el término “activo” o la expresión “biológicamente activo” significa que dichos compuestos alternativos deben mantener, o incluso potenciar, las propiedades inmunomoduladoras y/o de unión a la quimiocina CC de ChBP-59.

El término “fracción” se refiere a cualquier fragmento de la cadena del polipéptido del compuesto propiamente dicho, solo o combinado con moléculas relacionadas o residuos unidos a éste, por ejemplo residuos de azúcares o fosfatos. Dichas moléculas pueden resultar también de otras modificaciones que normalmente no alteran la secuencia primaria, por ejemplo, derivatización química de péptidos *in vitro* (acetilación o carboxilación), y aquellas elaboradas modificando la proteína post-traduccionalmente, como por fosforilación (introducción de residuos fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina) o por glucosilación (exponiendo el péptido a enzimas que afectan la glucosilación, p. ej., glucosilando o desglucosilando enzimas mamíferas) durante su síntesis y/o en etapas de procesamiento adicionales. En particular, se ha caracterizado ChBP-59 en saliva de garrapata en ambas formas recombinantes descritas en este documento como más o menos pesadamente glucosiladas. Esta modificación se puede efectuar *in vitro*, usando la enzima modificadora apropiada, o *in vitro*, eligiendo las células hospedantes apropiadas para la producción recombinante.

Los “precursores” son compuestos que pueden convertirse en los compuestos de la presente invención por procesamiento metabólico y enzimático antes o después de la administración a las células o al organismo.

El término “sales” en este documento se refiere a ambas sales de grupos carboxilo y a sales de adición de ácido de grupos amino de los péptidos, polipéptidos o sus análogos, de la presente invención. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por métodos conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, hierro o zinc, y similares, y sales con bases orgánicas como aquellas formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaina y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Cualquiera de dichas sales deberá tener actividad sustancialmente similar a los péptidos y polipéptidos de la invención o sus análogos.

El término “derivados”, tal como se emplea en esta memoria, se refiere a derivados que se pueden preparar a partir de grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los restos aminoácido o en los grupos amino-/o carboxi-terminales de acuerdo con métodos conocidos. Dichos derivados incluyen, por ejemplo, ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y derivados de N-acilo de los grupos amino libres o derivados de O-acilo de los grupos hidroxilo libres y se forman con grupos acilo, como por ejemplo grupos alcanofilo o arofilo.

Las proteínas de la invención pueden estar en la forma de conjugado o complejo activo con una molécula seleccionada entre etiquetas radiactivas, biotina, etiquetas fluorescentes, agentes citotóxicos y agentes de administración de fármacos. Los conjugados o complejos útiles se pueden generar usando moléculas y métodos conocidos en la técnica para diversos propósitos, por ejemplo para la detección de la interacción con quimiocinas CC u otras proteínas (etiquetas radiactivas o fluorescentes, biotina), eficacia terapéutica (agentes citotóxicos) o para mejorar los agentes en términos de eficacia de administración de fármacos, como polietilenglicol y otros polímeros naturales o sintéticos (Harris JM y Chess RB, 2003; Greenwald RB *et al.*, 2003; Pillai O y Panchagnula R, 2001).

Estos compuestos derivados de ChBP-59 se pueden producir siguiendo una modificación dirigida al sitio de un residuo apropiado, en una posición interna o terminal. Los residuos se pueden usar para la unión, siempre que tengan una cadena lateral sujeta a la unión de polímeros (es decir, la cadena lateral de un aminoácido que porta un grupo funcional, p. ej., lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, histidina, etc.). Alternativamente, un residuo en estos sitios se puede reemplazar con un aminoácido diferente que tenga una cadena lateral sujeta a la unión de polímeros.

Por ejemplo, se puede añadir una Cisteína adicional que permita la PEGilación directa en el término N o C de la secuencia de proteínas maduras por tecnologías de DNA recombinante o enzimáticamente. Alternativamente, la Cisteína puede incluirse en la proteína por la sustitución de un residuo, por ejemplo en correspondencia de un sitio de glucosilación.

Además, las cadenas laterales de los aminoácidos genéticamente codificados se pueden modificar químicamente para unión de polímeros, o se pueden emplear aminoácidos no naturales con grupos funcionales de cadena lateral apropiada. La unión de polímeros puede efectuarse no solo a la cadena lateral del aminoácido natural en una posición específica del antagonista o a la cadena lateral de un aminoácido natural o no natural que reemplaza al aminoácido natural en una posición específica del antagonista, sino también a un carbohidrato u otro resto que esté unido a la cadena lateral del aminoácido en la posición diana.

Los polímeros adecuados para estos propósitos son biocompatibles, a saber, no son tóxicos para los sistemas biológicos, y muchos de dichos polímeros se conocen. Dichos polímeros pueden ser hidrófobos o hidrófilos por naturaleza, biodegradables, no biodegradables o una combinación de éstos. Estos polímeros incluyen polímeros naturales (tales como colágeno, gelatina, celulosa, ácido hialurónico), como también polímeros sintéticos (tales como poliésteres, poliortoésteres, polianhídridos). Los ejemplos de polímeros hidrófobos no degradables incluyen polidimetilsiloxanos, poliuretanos, politetrafluoroetilenos, polietilenos, polivinilcloruros y polimetilmetacrilatos. Los ejemplos de políme-

ros no hidrófilos no degradables incluyen poli(2-hidroxietilmetacrilato), alcohol polivinílico, poli(N-vinilpirrolidona), polialquilenos, poliacrilamida y sus copolímeros.

Los polímeros preferidos comprenden, como una unidad de repetición secuencial, óxido de etileno, tal como un polietilenglicol (PEG).

El método de unión preferido emplea una combinación de una síntesis peptídica y ligadura química. Ventajosamente, la unión de un polímero soluble en agua se realizará a través de un enlazador biodegradable, especialmente en la región aminoterminal de una proteína. Dicha modificación actúa para proveer la proteína en una forma precursora (o “profármaco”) que, tras la degradación del enlazador libera la proteína sin modificación del polímero.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen selectivamente a las proteínas de la invención.

El término “anticuerpo”, tal como se emplea en la presente memoria, abarca anticuerpos monoclonales y policlonales, quiméricos, humanizados, totalmente humanos, biespecíficos o multiespecíficos, como también sus fragmentos, tales como anticuerpos de cadena sencilla (scFv) o anticuerpos de dominio, como se explicará en más detalle a continuación.

Dentro del contexto de la presente invención, el término unión “selectiva” indica que los anticuerpos se unen con preferencia al polipéptido o epítipo diana, es decir, con una afinidad mayor que cualquier unión a cualquier otro antígeno o epítipo. En otros términos, la unión al polipéptido diana se puede discriminar de la unión no específica a otros antígenos. Se prefiere que los anticuerpos de acuerdo con la presente invención exhiban afinidad de unión (K_a) al polipéptido o epítipo diana de 10^6 M^{-1} o más, preferiblemente 10^7 M^{-1} o más, más preferiblemente 10^8 M^{-1} o más y lo más preferiblemente 10^9 M^{-1} o más. La afinidad de unión de un anticuerpo la puede determinar fácilmente una persona con experiencia ordinaria en la técnica, por ejemplo, por análisis Scatchard (Scatchard G., 1949).

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, o sus fragmentos o derivados que tienen sustancialmente la misma especificidad de antígenos.

Los métodos para preparar anticuerpos policlonales de diversas especies, incluyendo roedores, primates y caballos, se han descrito, por ejemplo, en Vaitukaitis *et al* (1971). Los anticuerpos policlonales pueden generarse en un mamífero, por ejemplo, con una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero por inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido de la SEC ID NO 5, 6, 17, 18 o una variante, como se describió anteriormente en la presente memoria, o su proteína de fusión. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida para que sea inmunogénico en el mamífero que se esté inmunizando. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, aunque sin limitarse a ello, hemocianina de molusco, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (Lípido A monosforilo, trehalosa dicorinomicolato sintético). Se pueden aplicar inyecciones repetidas. Se toman muestras de sangre y se separan las inmunoglobulinas y el suero.

Los anticuerpos pueden, alternativamente, ser anticuerpos monoclonales. La expresión “anticuerpo monoclonal”, como se emplea en esta memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. El modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no se interpretará que requiere la producción del anticuerpo por un método particular.

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales se pueden hallar, por ejemplo, en Kohler *et al* (Nature 256 (1975) 495), incorporada a la presente memoria por referencia.

En un método de hibridoma, típicamente se inmuniza a un ratón, hámster u otro animal hospedante apropiado, con un agente de inmunización (el agente inmunizante típicamente incluirá el polipéptido de la SEC ID NO: 5, 6, 17, 18 o una variante como la anteriormente descrita en la presente memoria, o su proteína de fusión) para producir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. En general, se usan linfocitos de sangre periférica (“PBL”) si se desean células de origen humano, o se usan células del bazo o de los ganglios linfáticos si se desean fuentes mamíferas no humanas. Los linfocitos se condensan luego a una línea celular immortalizada, usando un agente de condensación adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding 1986). Las líneas celulares immortalizadas son por lo general células mamíferas transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Usualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células no condensadas, immortalizadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (“medio HAT”), cuyas sustancias previenen el desarrollo de células deficientes de HGPRT. Las líneas celulares immortalizadas preferidas son aquellas que se condensan eficientemente,

soportan un alto nivel de expresión estable del anticuerpo por las células que producen el anticuerpo seleccionado y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y hetermieloma de ratón y humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos.

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede luego ensayarse para presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido inmunizante. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente de unión a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en el campo.

Una vez que se identifican las células de hibridoma, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución limitativos y desarrollarse por métodos convencionales (Goding, *supra*). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden desarrollarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico por procedimientos de purificación convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden también elaborarse por métodos de DNA recombinante, como aquellos descritos en la patente estadounidense No. 4.816.567. El DNA que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como origen preferido de dicho DNA. Una vez aislado, el DNA puede disponerse en vectores de expresión, que luego se transfectan a células hospedantes como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedantes recombinantes.

Los “anticuerpos monoclonales” pueden también aislarse de colecciones de anticuerpos de fago, usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, 1991 y en Marks *et al.*, 1991.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes se conocen en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena liviana de inmunoglobulina y la cadena pesada modificada. La cadena pesada está truncada en general en cualquier punto en la región Fc como para prevenir el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos cisteína relevantes se sustituyen con otro residuo aminoácido o se eliminan como para prevenir el entrecruzamiento.

Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir sus fragmentos, particularmente, Fab, se puede lograr usando técnicas de rutina conocidas en el campo.

Los anticuerpos pueden también producirse por selección de colecciones combinatorias de inmunoglobulinas, como se describe, por ejemplo, en Ward *et al.* (1989).

Los anticuerpos de la invención pueden además comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígenos de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de especies no humanas (anticuerpo donante) como de ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen en la técnica. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y sus colegas (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986)), sustituyendo las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por CDR de roedor o secuencias de CDR. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la correspondiente secuencia de una especie no humana.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en el campo, incluyendo colecciones de visualización de fagos (Hoogenboom y Winter, (1991)). De modo similar, los anticuerpos humanos se pueden producir introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o totalmente inactivados. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja en gran medida a aquella vista en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo redistribución de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este planteamiento se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses No. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

La invención también se refiere a inmunos conjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a restos heterólogos, como agentes citotóxicos, etiquetas, fármacos u otros agentes terapéuticos, covalentemente unidos o no, o bien directamente o a través del uso de agentes de acoplamiento o enlazadores. Los agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, toxinas (p. ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden utilizar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos que no son de unión de toxina de difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfasarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Están disponibles una diversidad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un “receptor” (como estreptavidina) para utilización en la diana previa de tumores en los que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por eliminación de conjugado no unido de la circulación, usando un agente de aclaramiento y luego la administración de un “ligando” (p. ej., avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (p. ej., un radionucleótido).

Además, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención se pueden PEGilar usando métodos conocidos en la técnica y descritos en esta memoria. Los anticuerpos descritos en esta memoria se pueden formular también como inmunoliposomas. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se describen en la patente estadounidense No. 5.013.556.

La invención se refiere además a “fragmentos de anticuerpo” que comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión a antígenos del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla; monocuerpos; diacuerpos; monocuerpos camelizados; anticuerpos de dominio y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento de antígenos y un sitio de unión a antígenos completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena liviana en asociación firme y no covalente. Es en esta configuración que interactúan los tres CDR de cada dominio variable para definir un sitio de unión a antígenos en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis CDR confieren especificidad de unión a antígenos al anticuerpo. No obstante, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad inferior que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de algunos residuos en el término carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en esta memoria para Fab' en donde el/los residuo(s) cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente era producidos como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos. Las “cadenas livianas” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Las “moléculas de anticuerpos de cadena sencilla” son fragmentos de un anticuerpo que comprenden dominios VH y VL de dicho anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador de polipéptidos entre los dominios VH y VL, que permite que la molécula de anticuerpos de una sola cadena forme la estructura deseada para la unión a antígenos.

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígenos, en donde los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH - VL). Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos se describen en más detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161.

El término “monocuerpo”, tal como se emplea en esta memoria, se refiere a una molécula de unión a antígenos con un dominio variable de cadena pesada y ningún dominio variable de cadena liviana. Un monocuerpo puede unirse a un antígeno en ausencia de cadenas livianas y típicamente tiene tres regiones CDR designadas CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Un monocuerpo de IgG de cadena pesada tiene dos moléculas de unión a antígenos de cadena pesada conectadas a un enlace disulfuro. El dominio variable de cadena pesada comprende una o más regiones CDR, preferiblemente una región CDRH3.

Un “anticuerpo camelizado” se refiere a un monocuerpo o su porción de unión a antígenos obtenido de un origen animal de la familia de los camélidos, incluyendo animales con pies con dos dedos y plantas de cuero. Los animales de la familia de los camélidos incluyen camellos, llamas y alpacas. Se ha publicado que los camellos (*Camelus dromedaries* y *Camelus bactrianus*) a menudo carecen de dominios de cadena liviana variable cuando se analiza el material de tipo IgG del suero, indicando que pueden derivar suficiente especificidad y afinidad de los dominios VH (tres bucles de CDR) solos.

También incluidos dentro de la invención se encuentran los anticuerpos de un solo dominio. Los anticuerpos de un solo dominio, también llamados anticuerpos de dominio o dAb, son las unidades de anticuerpos de unión funcional más pequeñas, correspondientes a las regiones variables o bien de las cadenas pesada (VH) o liviana (VL) de los anticuerpos humanos. Los dominios de anticuerpo tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa, o menos de una décima del tamaño de un anticuerpo completo. En contraste con los anticuerpos convencionales, los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas de células bacterianas, de levadura y mamífero. A su vez, muchos anticuerpos de dominio son altamente estables y retienen actividad incluso después de someterse a condiciones arduas, como liofilización o termodesnaturalización, lo que los hace susceptibles a una amplia gama de condiciones de formulación farmacéutica y procedimientos de elaboración.

Las proteínas de la invención se pueden proveer en formas más o menos purificadas. Los ejemplos muestran cómo clonar ácidos nucleicos necesarios para expresar ChBP-59 recombinante, cómo purificar ChBP-59 recombinante o natural usando afinidad hacia las quimiocinas CC y tecnologías cromatográficas, y cómo seleccionar células que expresan correctamente esta proteína mediante ensayos para detectar las actividades de unión a la quimiocina CC.

En particular, la purificación de los antagonistas naturales, sintéticos o recombinantes de la invención se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos conocidos para este propósito, es decir, cualquier procedimiento convencional que implique extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis o similar. Otro procedimiento de purificación que se puede usar con preferencia para purificar la proteína de la invención es la cromatografía por afinidad que usa anticuerpos monoclonales o grupos de afinidad, que unen la proteína diana y que se producen e inmovilizan en una matriz de gel contenida dentro de una columna. Las preparaciones impuras que contienen las proteínas se pasan por la columna. La proteína se une a la columna con heparina o con el anticuerpo específico mientras pasan las impurezas. Después del lavado, la proteína se eluye del gel por un cambio en el pH o fuerza iónica. Alternativamente, se puede emplear HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). La elución se puede llevar a cabo usando un disolvente a base de agua-acetonitrilo comúnmente empleado para la purificación de proteínas. Preparaciones purificadas de las proteínas de la invención, como se usan en este documento, se refieren a las preparaciones que son por lo menos 1% (en peso seco), y preferiblemente por lo menos 5%, de dichas proteínas.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un polipéptido ChBP-59 según se definió anteriormente (en la forma de proteínas y sus formas alternativas ya descritas) como ingrediente activo, y un diluyente o vehículo adecuado.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido ChBP-59 como se definió anteriormente, o un vector o célula hospedante recombinante correspondiente, y un diluyente o vehículo adecuado.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un polipéptido ChBP-59 según se definió anteriormente, o un ácido nucleico que lo codifica, para la elaboración de un medicamento para uso en la regulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Estas composiciones se pueden usar como medicamentos, en particular, para regular una respuesta inmunitaria o inflamatoria en un mamífero, y más particularmente como compuestos antiinflamatorios.

En general, dada la implicancia de las quimiocinas CC en muchos trastornos humanos y veterinarios, las proteínas de unión a la quimiocina CC de la invención se pueden usar como antagonistas de la quimiocina CC (como CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 alfa o CCL2/MCP-1) para el tratamiento o la prevención de trastornos relacionados con la quimiocina CC en animales. Un listado no exhaustivo de trastornos relacionados con la quimiocina CC incluye: enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, infecciones, enfermedades alérgicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas, enfermedades gastrointestinales, enfermedades neurológicas, septicemia, enfermedades relacionadas con rechazo a trasplantes o enfermedades fibróticas. Los ejemplos no limitativos de estas enfermedades son los siguientes: artritis, artritis reumatoidea (RA), artritis psoriásica, psoriasis, artritis reumatoidea, reestenosis, septicemia, artrosis, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis sistémica, escleroderma, polimiositis, glomerulonefritis, fibrosis, enfermedades alérgicas o de hipersensibilidad, dermatitis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria de los intestinos (IBD), enfermedad de Crohn, fibromas, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, choque septicémico, infección vírica, cáncer, endometriosis, trasplante, enfermedad de injerto contra hospedante (GVHD), lesión por reperusión cardíaca y renal, isquemia y aterosclerosis.

Las proteínas de la invención, o fragmentos específicos, se pueden usar como ingredientes activos en la elaboración de composiciones farmacéuticas para regular una respuesta inmunitaria o inflamatoria en un mamífero, por ejemplo de composiciones antiinflamatorias. Alternativamente, las proteínas de la invención, o fragmentos específicos, se pueden usar como ingredientes activos en la elaboración de composiciones farmacéuticas para la vacunación de un mamífero

contra parásitos, virus o bacterias. El procedimiento de preparación de dichas composiciones farmacéuticas comprende combinar ChBP-59 junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica que contiene una proteína de la invención como ingrediente activo se puede usar para unir una quimiocina CC *in vivo*, bloquear la unión de una citocina CC a un receptor de superficie celular correspondiente y consecuentemente producir un efecto potencialmente terapéutico, como un efecto antiinflamatorio. Se puede usar también una composición que contenga una proteína de la invención como ingrediente activo, para unir a análogos de la quimiocina CC presentes en los virus, bacterias o parásitos para bloquear la entrada del virus, bacteria o parásito a las células. Las composiciones farmacéuticas para la vacunación de un mamífero contra un parásito, virus o bacteria puede comprender un fragmento de la proteína de la invención como ingrediente activo. Las composiciones anteriormente indicadas pueden además comprender una sustancia inmunosupresora o antiinflamatoria adicional.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener, en combinación con las proteínas de la invención como ingrediente activo, diluyentes, vehículos, vehículos biológicamente compatibles y aditivos que son adecuados para administración a un animal (por ejemplo, solución salina fisiológica) y eventualmente comprenden auxiliares (como excipientes, estabilizantes o adyuvantes) que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en cualquier forma aceptable para satisfacer las necesidades del modo de administración. Por ejemplo, el uso de biomateriales y otros polímeros para administración de fármacos, como también las diferentes técnicas y modelos para validar un modo específico de administración, se describen en la bibliografía (Luo B y Prestwich GD, 2001; Cleland JL *et al.*, 2001).

“Farmacéuticamente aceptable” abarca cualquier vehículo, que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedante al que se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, los ingredientes activos anteriormente mencionados se pueden formular en forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer. Los vehículos se pueden seleccionar también de almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y diversos aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético (aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo).

Se puede emplear cualquier modo de administración aceptado y determinarse por el experto en la técnica para establecer los niveles sanguíneos deseados de los ingredientes activos. Por ejemplo, la administración se puede realizar por diversas rutas parenterales tales como subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, rectal, oral o bucal. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden administrar en formas de administración de liberación sostenida o controlada, que incluyen inyecciones de absorción lenta, bombas osmóticas y similares, para la administración prolongada del polipéptido a un índice predeterminado, preferiblemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración única de las dosis precisas.

La administración parenteral puede ser por inyección intravenosa rápida o por perfusión gradual en el tiempo. Las preparaciones para administración parenteral incluyen suspensiones, emulsiones y soluciones estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener agentes o excipientes auxiliares conocidos en la técnica, y se pueden preparar según métodos de rutina. Además, se puede administrar la suspensión de los compuestos activos como inyección oleosa apropiada. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácido graso sintético, por ejemplo, etiloleato o triglicéridos. Las suspensiones para inyección acuosas que pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede también contener estabilizantes. Las composiciones farmacéuticas incluyen soluciones adecuadas para administración por inyección, y contienen entre aproximadamente 0,01 y 99,99 por ciento, preferiblemente entre aproximadamente 20 y 75 por ciento de compuesto activo junto con el excipiente.

Se ha de entender que la dosis administrada dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, la clase de tratamiento concurrente, si lo hubiese, la frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. La dosis se adaptará al sujeto individual, como entenderá y determinará el experto en la técnica. La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse por dosis múltiples o en una sola dosis. La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar sola o junto con otros agentes terapéuticos dirigidos a la afección o dirigidos a otros síntomas de la afección. Usualmente, una dosis diaria del ingrediente activo está comprendida entre 0,01 y 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día. Comúnmente, 1 a 40 miligramos por kilogramo por día administrados en dosis divididas o en forma de liberación sostenida son eficaces para obtener los resultados deseados. La segunda administración o las administraciones subsiguientes se pueden realizar a una dosis que sea igual, menor o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo.

También se describe el uso de una proteína codificada por un DNA de la invención como medicamento, en particular en la preparación de una composición para regular una respuesta inmunitaria o inflamatoria en un mamífero.

También se describen métodos para inmunizar a un animal contra un ectoparásito que se alimenta de sangre, o para regular una respuesta inmunitaria o inflamatoria en un animal que lo necesita, que comprende administrar a dicho animal una proteína de la invención durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para regular dicha respuesta inmunitaria.

También se describe un método para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con la quimiocina CC, que comprende la administración de una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención.

Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de los ingredientes activos que es suficiente para afectar el curso y la gravedad de la enfermedad, conduciendo a la reducción o remisión de dicha patología. La cantidad eficaz dependerá de la ruta de administración y del estado del paciente.

La expresión “enfermedades relacionadas con la quimiocina CC” indica cualquier enfermedad debida a una producción de quimiocina CC excesiva o descontrolada, que conduce a una infiltración masiva de monocitos/macrófagos/neutrófilos/células T, y en donde la administración de ChBP-59 puede provocar un efecto beneficioso. Se proporcionó anteriormente en este documento un listado no exhaustivo de dichas enfermedades crónicas, agudas o heredadas.

Las aplicaciones terapéuticas de los antagonistas de quimiocina CC de la invención y de los reactivos relacionados se pueden evaluar (en términos de seguridad, farmacocinética y eficacia) mediante los ensayos *in vivo* o *in vitro* que hacen uso de células, tejidos y modelos mamíferos (Coleman R *et al.*, 2001; Li A, 2001; Methods Mol. Biol vol. 138, “Chemokines Protocols”, editado por Proudfoot A *et al.*, Humana Press Inc., 2000; Methods Enzymol, vol. 287 y 288, Academic Press, 1997). Una lista no limitativa de ensayos incluye: movilización de calcio, desgranulación, aumento de citocinas proinflamatorias, aumento de proteasas, inhibición de reclutamiento celular *in vitro* e *in vivo*.

Otro aspecto de la invención son estuches de prueba que contienen cualquier compuesto descrito en asociación con las proteínas de unión a la quimiocina CC de la invención. Por ejemplo, un estuche para detectar una quimiocina CC o un análogo, una proteína de unión a una quimiocina CC o un receptor, la interacción de la quimiocina CC y una proteína de unión a la quimiocina CC o antagonistas o agonistas de dicha interacción, que comprende un reactivo de detección y por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

a) Una molécula de ácido nucleico (p. ej., un DNA);

b) Un oligonucleótido;

c) Una proteína; y

d) Un anticuerpo;

derivado de la proteína de unión a la quimiocina CC de la invención.

Estos estuches se pueden utilizar en los métodos aplicables *in vitro* o *in vivo* en los que una muestra se pone en contacto mediante uno de estos compuestos, que se puede marcar o inmovilizar en un soporte sólido.

La presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas, pero el contenido de la descripción comprende todas las modificaciones y sustituciones que puede realizar una persona experimentada en la técnica sin extenderse más allá del significado y propósito de las reivindicaciones.

La invención será ahora descrita mediante los siguientes Ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos en modo alguno de la presente invención. Los Ejemplos harán referencia a las Figuras anteriormente especificadas en este documento.

Ejemplos

Ejemplo 1

Cribado de saliva y colección de cDNA de Rhipicephalus sanguineus para actividades de unión de la quimiocina CC y clonación de ChBP-59

Materiales y métodos

a. *Cribado de actividades de unión a la quimiocina en saliva de Rhipicephalus sanguineus (garrapata marrón del perro)*

Se obtuvo saliva de garrapata de *Rhipicephalus sanguineus* bruta de acuerdo con el protocolo publicado (Ferreira BR y Silva JS, 1998). Se ensayaron alícuotas de saliva de *Rhipicephalus sanguineus* (RSs) usando diferentes ensayos que incluyen, como control negativo, Albúmina de Suero Bovino (BSA) y, como control positivo, una proteína de unión a la quimiocina CC de *ectromelia virus* (conocida como vCCI o p35).

Se salpicaron diferentes cantidades de RSs y de vCCI en filtros de nitrocelulosa en paralelo, y los filtros se expusieron a diferentes quimiocinas CC y CXC radiomarcadas, recombinantes.

Se diseñó un Ensayo de Proximidad de Centelleos (SPA) para detectar moléculas que interfirieran con la interacción quimiocina/receptor de quimiocina como se describe en la bibliografía (Alouani S, 2000). En síntesis, se recubrieron esferas SPA de aglutinina de germen de trigo con membranas celulares aisladas de cepas de células CHO que expresan establemente un receptor de quimiocina específico (p. ej., CCR1 o CCR5) y luego se incubaron con la correspondiente quimiocina CC radiomarcada sola o combinada con la quimiocina CC.

b. Construcción de la colección de cDNA de *Rhipicephalus sanguineus* y del plásmido control que expresa vCCI

Se cosecharon glándulas salivales de 100 garrapatas adultas (*Rhipicephalus sanguineus*) y se conservaron inmediatamente en solución RNeasyTM (Ambion) en hielo seco hasta su uso posterior. Se extrajo RNA total usando el método TRIzolTM (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La colección de cDNA se construyó en el vector fagémido XTriplex2 usando el estuche de construcción de la colección de cDNA SMART (Clontech). Los cDNA se fraccionaron por tamaño con una columna ChromaSpin 400 (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante antes de la ligadura al vector. El tamaño de los insertos de cDNA clonados en la colección osciló entre aproximadamente 0,6 kb y 1,5 kb, y la frecuencia de los insertos fue aproximadamente 80%.

Los insertos de cDNA de la colección de cDNA de glándula salival de *Rhipicephalus sanguineus* en pTriplex2 se cortaron con la enzima de restricción SfiI y se subclonaron en el vector de expresión de células mamíferas pEXP-lib (Clontech). El vector pEXP-Lib contiene un casete de expresión que comprende el promotor/potenciador temprano inmediato principal de citomegalovirus (CMV) humano seguido de un sitio de clonación múltiple; un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) del virus de encefalomiocarditis (ECMV); un gen que codifica resistencia a puromicina (puromicina-N-acetil-transferasa); y la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. El sitio de clonación múltiple contiene dos sitios Sfi I distintos (Sfi IA y Sfi IB, que difieren en sus secuencias interpalindrómicas), lo que permite la subclonación direccional de insertos de cDNA del vector pTriplex2 a pEXPII.

La proteína control vCCI (NCBI Acc. no. CAC05575; SEC ID NO: 1) se expresó clonando el cDNA que codifica la proteína (NCBI Acc. no. AJ277111; SEC ID NO: 2) en pEXP-lib como se describió anteriormente para generar pEXP-lib vCCI.

c. Cribado de la colección usando sobrenadantes de células HEK293

Se mantuvieron células de riñón embrionario humano 293 (células HEK293; ATCC Cat. No. CRC-1573) en DMEM-F12 Nut Mix, suero de ternero fetal inactivado por calor al 10%, L-Glutamina 2 mM, 100 unidades/ml solución de penicilina-estreptomomicina.

Los plásmidos pEXP-lib que expresan la colección de cDNA de *Rhipicephalus sanguineus* se mezclaron en grupos que se transfectaron a células HEK293 usando un estuche de transfección GenePorter2 (Gene Therapy Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El plásmido pEXP-lib que expresa la proteína control vCCI se transfectó también en HEK293 del mismo modo.

Se cosechó medio de cultivo de células HEK293 transfectadas de células desarrolladas en medio completo después de tres días en cultivo. El medio condicionado se centrifugó para eliminar los sedimentos celulares, y el sobrenadante se usó en un ensayo de entrecruzamiento o SPA.

Para experimentos de entrecruzamiento, se transfirieron muestras del medio a una placa de 96 pocillos de fondo plano (Costar). Se añadió una quimiocina CC radiomarcada (¹²⁵I-CCL3/MIP-1alfa) a una concentración final de 0,23 nM a 50 µl de cada muestra de sobrenadante, que luego se incubó agitando durante 2 horas a temperatura ambiente. Se transfirió luego una alícuota de 25 µl de cada pocillo a un nuevo pocillo que contenía 5 µl de BS3 50 mM (reactivo de entrecruzamiento) y se incubó durante 2 horas más con agitación. Después de este período, se añadieron 5 µl de tampón de muestra 10X (base Tris 125 mM, pH 6,8, que contenía SDS al 10%, EDTA 5 mM, glicerol al 20%, azul bromofenol al 0,2% p/p, DTT 1 M) a cada pocillo para detener la reacción de entrecruzamiento. Las muestras se sometieron luego a ebullición durante 5 minutos y a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida Bis-Tris 10% (Invitrogen NuPAGE, catálogo no. NP0301BOX). Después de la electroforesis, el gel se selló en una envoltura SaranTM y se expuso a una pantalla de reproducción de imágenes fluorescentes de conservación de tipo K (Biorad) durante 8 horas. Las pantallas de imágenes se exploraron a una resolución de 100 µm usando un reproductor de imágenes Biorad Personal FX.

Resultados

La saliva de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* ya se ha usado para caracterizar actividades inmunomoduladoras, como supresión de IgG y producción de citocina (Matsumoto K *et al.*, 2003) o proliferación de células T (Ferreira BR y Silva JS, 1998), pero no actividades dirigidas específicamente a las quimiocinas CC.

Una actividad de unión específica a la quimiocina CC, comparable a aquella detectada usando vCCI, una proteína de unión a la quimiocina CC de *ectromelia virus*, también conocida como p35 (Burns JM *et al.*, 2002), se detectó en la saliva de *Rhipicephalus sanguineus* usando filtros de nitrocelulosa manchados con la saliva y expuestos a diferentes quimiocinas CC/CXC radiomarcadas, y un Ensayo de Proximidad de Centelleos (SPA), una tecnología de cribado de alto rendimiento que permite la medición de las interacciones moleculares con gran precisión.

ES 2 321 122 T3

La actividad de unión a la quimiocina CC se identificó luego en *Rhipicephalus sanguineus* al nivel de la secuencia de la proteína/DNA en una colección de cDNA generada a partir de glándulas salivales de *Rhipicephalus sanguineus*. Se usaron grupos de los cDNA de esta colección para transfectar células mamíferas (HEK293).

5 Los clones que expresan cDNA transfectados que codifican un polipéptido que contiene el péptido de señal segregan la proteína en el medio de cultivo. Los sobrenadantes se ensayaron directamente, a una dilución diferente, o bien en el ensayo SPA anteriormente descrito o en un ensayo de entrecruzamiento, usando una quimiocina CC radiomarcada (^{125}I -CCL3/MIP-1alfa). En particular, la adición del reactivo de entrecruzamiento a la quimiocina CC radiomarcada/proteína de unión a la quimiocina CC estabiliza el complejo proteico uniendo las dos moléculas covalentemente.

10 El complejo resultante se puede identificar por SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posterior autorradiografía como una banda desplazada. Este método de entrecruzamiento es muy sensible, ya que se pueden detectar cantidades en nanogramos de proteína.

Los ensayos se realizaron comparando la señal obtenida con el sobrenadante obtenido del clon que expresa la proteína tomada como control positivo (vCCI), un sobrenadante al que se añadió vCCI, y un sobrenadante de células no transfectadas.

Los grupos de clones de HEK293 transfectadas que muestran la presencia de actividad de unión a la quimiocina CC se sometieron a tandas sucesivas de cribado y deconvolución hasta que se identificó un solo clon de HEK293 transfectada que segrega actividad de unión a la quimiocina CC y se denominó ChBP-59 (Fig. 1).

El cDNA que codifica ChBP-59 (SEC ID NO: 3) contiene un Marco de Lectura Abierto (ORF; SEC ID NO: 4) que codifica una proteína de 114 aminoácidos (SEC ID NO: 5). La proteína contiene una secuencia de péptido de señal de secreción potencial (residuos 1-20), que conduce a una proteína madura de 94 aminoácidos (SEC ID NO: 6) que no tiene homología significativa con proteínas conocidas.

Otras características de ChBP-59 son tres sitios de glucosilación potencial (en Asparagina 39, 54 y 62, de acuerdo con la numeración de la proteína total), y una serie de Cisteínas que se pueden aparear para formar puentes disulfuro (residuos 32, 49, 53, 66, 85, 90, 95 y 104, de acuerdo con la numeración de la proteína total).

30

Ejemplo 2

Purificación y validación de ChBP-59 expresado en sobrenadante de cultivo celular de HEK293 EBNA y en sobrenadante de cultivo celular de insecto TN5 como una proteína recombinante marcada con His

35

Material y métodos

a. Subclonación de cDNA de ChBP-59 en vectores de expresión pDEST8 y pEAK12d usando el procedimiento de clonación Gateway™

40

La primera etapa del procedimiento de clonación Gateway implica una reacción PCR de dos etapas (PCR1 y PCR2) que genera el ORF del ChBP-59 flanqueado en el extremo 5' por un sitio de recombinación attB1 y secuencia Kozak, y flanqueado en el extremo 3' por una secuencia que codifica un marcador de Histidina 6 dentro del marco (6His), a un codón finalizador y el sitio de recombinación attB2 (cDNA compatible con Gateway; fig. 2). La reacción PCR 1 (en un volumen final de 50 μl) contiene: 1 μl (40 ng) de pEXP-Lib-ChBP-59 plásmido, 1,5 μl de dNTP (10 mM), 10 μl de tampón Pfx polimerasa 10X, 1 μl de MgSO_4 (50 mM), 0,5 μl cada uno de cebador específico de genes (100 μM) (59-attB1 directo y 59-attB2 inverso; SEC ID NO: 7 y 8) y 0,5 μl de DNA polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen). La reacción PCR1 se llevó a cabo usando una etapa de desnaturalización inicial de 95°C durante 2 minutos, seguida de 12 ciclos de 94°C durante 15 s; 55°C durante 30 s y 68°C durante 2 min; y un ciclo de espera de 4°C. Los productos de ampliación se purificaron directamente usando el Sistema de Purificación de DNA Wizard PCR Preps (Promega) y se recuperaron en 50 μl de agua estéril de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La reacción PCR2 (en un volumen final de 50 μl) contenía 10 μl de producto PCR1 purificado, 1,5 μl de dNTP (10 mM), 5 μl de tampón de polimerasa Pfx 10X, 1 μl de MgSO_4 (50 mM), 0,5 μl de cada cebador de conversión Gateway (100 μM) (GCP directo y GCP inverso; SEC ID NO: 9 y 10) y 0,5 μl de DNA polimerasa Platinum Pfx. Las condiciones para la reacción PCR 2 fueron: 95°C durante 1 minuto; 4 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 50°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos; 25 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos; ciclo de espera a 4°C. Los productos PCR resultantes se visualizaron en un gel de agarosa 0,8% en tampón TAE 1 X (Invitrogen) y la banda que migraba en la masa molecular pronosticada (430 bp) se purificó del gel usando el Sistema de Purificación de DNA Wizard PCR Preps (Promega) y se recuperó en 50 μl de agua estéril de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La segunda etapa del procedimiento de clonación Gateway implica la subclonación del producto PCR modificado por PCR en el vector de entrada Gateway pDONR221. Se incubaron 5 μl de producto purificado de PCR2 con 1,5 μl del vector pDONR221 (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 2 μl tampón BP y 1,5 μl de mezcla enzimática clonasa BP (Invitrogen) en un volumen final de 10 μl a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se detuvo por adición de proteínaasa K 1 μl (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se incubó a 37°C durante otros 10 minutos. Una alícuota de esta reacción (1 μl) se usó para transformar

65

ES 2 321 122 T3

células DH10B de *E. coli* por electroporación de la siguiente manera: se descongeló en hielo una alícuota de 25 μ l de células electrocompetentes DH10B (Invitrogen) y se añadió 1 μ l de la mezcla de reacción BP. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación enfriada de 0,1 cm y las células se electroporaron usando BioRad Gene-Pulser™ de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se añadió medio SOC (0,5 ml), que había sido precalentado hasta temperatura ambiente, inmediatamente después de la electroporación. La mezcla se transfirió a un tubo de 15 ml con tapa a presión y se incubó con agitación (220 rpm) durante 1 hora a 37°C. Luego se dispusieron alícuotas de la mezcla de transformación (10 μ l y 50 μ l) en placas L-broth (LB) que contenían kanamicina (40 μ g/ml) y se incubaron durante una noche a 37°C.

Se preparó mini-prep DNA plásmido a partir de 5 ml de cultivos de 6 de las colonias resultantes usando un sistema robótico Qiaprep Turbo 9600 (Qiagen). El DNA plasmídico (150-200 ng) se sometió a secuenciación de DNA con cebadores 21M13 y M13Rev usando el sistema BigDye Terminator (Applied Biosystems cat. no. 4336919) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de la secuenciación se purificaron usando placas de limpieza Montage SEQ 96 (Millipore cat. no. LSKS09624), luego se analizaron en un secuenciador Applied Biosystems 3700.

Los eluatos de plásmido (2 μ l o aprox. 150 ng) de uno de los clones, que contenía la secuencia correcta (pDONR221__ChBP-59-HIS), se usó luego en las reacciones de recombinación que contenían 1,5 μ l o bien del vector pDEST8 o del vector pEAK12d (0,1 μ g/ μ l), 2 μ l de tampón LR y 1,5 μ l de clonasa LR (Invitrogen) en un volumen final de 10 μ l. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las reacciones se detuvieron por adición de Proteinasa K (2 μ g) y se incubaron a 37°C durante otros 10 minutos. Se usó una alícuota de cada reacción (1 μ l) para transformar células DH10B de *E. coli* por electroporación de la siguiente manera: una alícuota de 25 μ l de células electrocompetentes DH10B (Invitrogen) se descongeló en hielo y se añadió 1 μ l de la mezcla de reacción LR. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,1 cm enfriada y las células se electroporaron usando BioRad Gene-Pulser™ de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se añadió medio SOC (0,5 ml), que había sido precalentado hasta temperatura ambiente, inmediatamente después de la electroporación. La mezcla se transfirió a un tubo con tapa a presión de 15 ml y se incubó con agitación (220 rpm) durante 1 hora a 37°C. Las alícuotas de la mezcla de transformación (10 μ l y 50 μ l) se dispusieron luego en placas L-broth (LB) que contenían ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron durante una noche a 37°C.

Se preparó mini-prep DNA plásmido a partir de 5 ml de cultivos inoculados con seis de las colonias resultantes subclonadas en cada vector, usando Qiaprep Bio Robot 8000 (Qiagen). El DNA plasmídico (200-500 ng) en el vector pEAK12d se sometió a secuenciación de DNA con los cebadores pEAK12F y pEAK12R (SEC ID NO: 11 y 12). De modo similar, el DNA plasmídico (200-500 ng) en el vector pDEST8 se sometió a secuenciación de DNA con los cebadores pDEST8F y pDESTSR (SEC ID NO: 13 y 14) como se describió anteriormente.

Se preparó maxi-prep DNA purificado con gradiente CsCl a partir de 500 ml de cultivo de los clones verificados de la secuencia (pEAK12d__ChBP-59-HIS y pDEST8__ChBP-59-HIS), usando el método descrito por Sambrook J. *et al*, 1989 (en Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se resuspendió DNA plasmídico a una concentración de 1 μ g/ μ l en agua estéril (o Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) y se conservó a -20°C.

Las secuencias de los cebadores utilizadas en las diferentes etapas de sub/clonación se resumen en la Tabla III.

b. Purificación de ChBP-59-HIS recombinante expresado en células HEK293

Se cosechó sobrenadante de cultivo celular (450 ml) de células HEK293-EBNA 6 días después de la transfección con pEAK12d-ChBP-59-HIS y se diluyó con 2 volúmenes de tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,5 que contenía NaCl 0,3 M y glicerol al 10% (vol/vol). La muestra se filtró a través de una membrana de filtro de 0,22 μ m, luego se cargó a 1,7 ml/min a 4°C a una columna SX 16/10 que contenía 5 ml Ni²⁺-NTA agarosa (Catálogo No: 30250; Qiagen) usando un sistema purificador Akta (Amersham Biosciences). El material no específicamente unido se eliminó lavando la columna a 1,5 ml/min con 5 volúmenes de columna (CV) de tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,5 que contenía NaCl 0,3 M, glicerol al 10% (Catálogo No: 49781; Fluka), seguidos de 50 CV del mismo tampón que contenía Tween-20 al 1% (Catálogo No: 93773; Fluka) y finalmente con 30 CV del tampón sin Tween-20. La columna se eluyó en fracciones de 5 ml con 10 CV de tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 0,3 M, glicerol al 10% e imidazol 12,5 mM (Catálogo No: 56749; Fluka) a 2,5 ml/min seguido de un gradiente de 10 CV hasta una concentración máxima de imidazol 250 mM, que se mantuvo por otros 5 CV.

Las fracciones que contenían ChBP-59-HIS se mezclaron y concentraron 10 veces usando dispositivos de filtro centrífugos con un valor de corte de 10 kDa (Amicon Ultra-15, Catálogo No: UFC901096, Millipore). La mezcla concentrada se sometió a cromatografía de exclusión de tamaño como segunda etapa de la purificación. Una columna SX200 10/300 GL (volumen de lecho de 25 ml; catálogo No: 17-5175-01; Amersham Biosciences), que se había equilibrado en PBS (solución salina tamponada con fosfato), se inyectó con 450 μ l del eluato de proteína que contenía ChBP-59-HIS concentrado. La proteína se eluyó en fracciones de 0,5 ml cada una a 2,5 ml/min. Las fracciones que contenían la proteína ChBP-59-HIS se mezclaron, dividieron en alícuotas y conservaron a -80°C.

c. Purificación de ChBP-59-HIS recombinante expresado en células de insecto

Células de insecto *Trichoplusia ni* de la cepa comercial HighFive (Catálogo No: 10486; Invitrogen) se cultivaron en medio Excell405 (Catálogo No: 24405; JRH Biosciences). Las células se infectaron con baculovirus recombinante

generado a partir del plásmido de expresión pDEST8-ChBP-59-HIS. El sobrenadante de cultivo se cosechó y clarificó por centrifugación durante 30 minutos a 500 g. Se cosechó un total de 1200 ml de sobrenadante de las células y se diluyó en 7 volúmenes de tampón NaPO_4 50 mM en hielo seco, pH 7,5, que contenía NaCl 0,3 M y glicerol al 10%, y posteriormente se filtró a través de un filtro de 0,22 μm . La muestra filtrada y diluida se pasó por una resina de agarosa de 15 ml Ni^{2+} -NTA (Catálogo No: 30250; Qiagen), cargada en una columna SX 26/10 a 7 ml/min y 4°C. La columna se lavó a 2,5 ml/min con 5 CV de tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 0,3 M, glicerol al 10%, seguido de 50 CV del mismo tampón que contenía Tween20 al 1% (Catálogo No: 93772; Fluka) y finalmente con 30 CV del tampón sin Tween20 para eliminar todos los restos de detergente. El material no específicamente unido se eliminó lavando la columna a 2,5 ml/min con 10 CV de fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 0,3 M, glicerol al 10% e imidazol 12,5 mM a 2,5 ml/min. La columna se eluyó luego a 2,5 ml/min con un gradiente lineal de imidazol de 12,5 mM a 250 mM por 10 CV. La columna se eluyó por otros 5 CV a imidazol 250 mM. Las fracciones seleccionadas se analizaron por SDS-PAGE y transferencia Western, usando anticuerpos con marcador anti-Histidina.

Las fracciones que contenían ChBP-59-HIS se mezclaron y sometieron a una segunda etapa de purificación basada en cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones combinadas de la cromatografía de afinidad post- Ni^{2+} se diluyeron 10 veces en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8) que contenía NaCl 0,03 M y se cargaron a una columna SX16/10 que contenía 15 ml de sefarosa Q a 5 ml/min a 4°C. Luego, la columna se lavó con 10 CV de tampón y posteriormente se eluyó aplicando un gradiente de sal de tampón que contiene NaCl 0,03 M a 1 M durante 10 CV. Se recogieron fracciones de 7 ml y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían ChBP-59-HIS se mezclaron, y la mezcla se dividió a la mitad y se dializó contra 100 volúmenes de tampón Tris-HCl 25 mM, pH 8 o contra PBS. La concentración de proteína de la mezcla se determinó por espectrofotometría de UV a 280 nm, y las fracciones de proteína mezcladas se dividieron en alícuotas y se conservaron a -80°C.

d. Transferencia Western y análisis de entrecruzamiento de ChBP-59-HIS recombinante

Los eluatos de la columna se diluyeron 1:1 con 2x tampón de muestra (Invitrogen) que contenía DTT 100 mM y se sometieron a ebullición durante 5 minutos. Las muestras y un patrón de peso molecular marcado con HIS (Catálogo No: LC5606; Invitrogen) se sometieron a electroforesis en un gel Bis-Tris al 10% pasado por un tampón MES a 200 V durante 35 min. Las proteínas sometidas a electroforesis se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm (Catálogo No: LC2001; Invitrogen) en tampón de transferencia (glicina 39 mM, base Tris 48 mM y metanol al 20%, pH 8,3) durante 50 minutos a temperatura ambiente, usando una corriente constante de 290 mA. La membrana se bloqueó incubando en 20 ml de solución bloqueante (Tween 20 al 0,1%, leche en polvo al 5% en PBS), durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma oscilante. La membrana se incubó luego en 15 ml de la solución que contenía el anticuerpo con marcador anti-Histidina primario (diluido 1:1000 en Tween 20 al 0,1%, leche en polvo al 2,5% en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Los anticuerpos primarios utilizados fueron sonda de His H-15 (sc-803; Santa Cruz Biotechnology) o sonda de His G-18 (sc-804; Santa Cruz Biotechnology). La membrana se enjuagó en tampón de lavado (Tween 20 al 0,1% en PBS) y se lavó con 3 cambios de tampón de lavado (10 minutos cada uno). La membrana se incubó luego en anticuerpo secundario conjugado con HRP (diluido 1:3000 en Tween 20 al 0,1%, leche en polvo al 2,5% en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. La membrana se lavó nuevamente como se describió previamente. Finalmente, la membrana se secó con papel secante, y se visualizó la tinción del anticuerpo usando el estuche de Reactivos de Detección de Transferencia Western ECLTM (Catálogo No: RPN2106; Amersham Pharmacia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

El ORF que codifica ChBP-59 se transfirió en plásmidos que permiten altos niveles de producción en células de mamíferos o insectos, usando un estuche comercial (GatewayTM) como proteína recombinante marcada con histidina (ChBP-59-HIS; fig. 2).

El plásmido que contenía el ORF del clon 59 (pEXP-Lib_ChBP-59) se usó como molde de PCR para generar una versión marcada con Histidina 6 de cDNA de ChBP-59 (SEC ID NO: 15) compatible con el sistema de clonación Gateway. El ORF para ChBP-59-HIS (SEC ID NO: 16) codifica una secuencia de 120 aminoácidos (SEC ID NO: 17) que puede luego madurar por eliminación de la secuencia de señal como secuencia de 100 aminoácidos (SEC ID NO: 18). Se generaron el vector de entrada Gateway pDONR221_ChBP-59-HIS y los constructos de expresión pDEST8_ChBP-59-HIS y pEAK12d_ChBP-59-HIS (fig. 3).

Se purificó ChBP-59-HIS recombinante a partir de sobrenadante celular de HEK293 transfectadas con pEAK12d-ChBP-59 (usando cromatografía de afinidad Ni^{2+} seguida de cromatografía de exclusión de tamaño) o a partir de células de insectos TN5 infectadas con pDEST8-ChBP-59-HIS (usando cromatografía de afinidad Ni^{2+} seguida de cromatografía de intercambio aniónico). La tinción con azul de Coomassie de un SDS-PAGE en el que se ha cargado la proteína purificada sugiere que ChBP-59-HIS se expresó y purificó como una mezcla de formas modificadas de modo diferente post-traduccionalmente, posiblemente por glucosilación, como se muestra para otra proteína de garrapata expresada en células de insectos (Alarcon-Chaidez FJ *et al.*, 2003). De hecho, la proteína aparece como una banda manchada, con un peso molecular promedio de aproximadamente 20-25 Kd para la proteína recombinante expresada en células HEK293 y TN5 (fig. 4).

A la presencia de ChBP-59-HIS recombinante durante las diferentes etapas de purificación de ambos sobrenadantes de células HEK293 y de insecto le siguió la transferencia Western con marcador anti-Histidina como anticuerpo

primario. El N-terminal de la secuencia madura, purificada se ha secuenciado, confirmando que la secuencia ED-DEDYGDLG forma el término N de la proteína madura.

La actividad de unión a la quimiocina CC de las preparaciones finales de ChBP-59-HIS se comparó con la actividad observada usando el control positivo (la proteína de unión a la quimiocina CC vírica vCCI) o la saliva de *Rhipicephalus sanguineus*, usando el ensayo de entrecruzamiento empleado inicialmente para caracterizar la actividad en saliva de garrapata.

En SDS-PAGE, la quimiocina CC CCL 3/MIP-1 alfa marcada con ^{125}I libre migra como una banda de 8 kDa. Cuando se añade el agente de entrecruzamiento, una parte de la radiactividad es retenida en un complejo de proteínas que tiene un peso molecular de 28-40 kDa, como se puede determinar aproximadamente en base a la banda desplazada, en ambas muestras que contienen ChBP-59 recombinante y saliva de garrapata (fig; 5). El peso molecular de la banda desplazada es levemente diferente entre estas muestras, probablemente debido a las diferentes clases y nivel de modificación post-traducciona

Dado que el peso molecular para el polipéptido ChBP-59-HIS maduro (100 aminoácidos) es alrededor de 11 Kd, esta proteína recombinante parece ser activa cuando se expresa en células hospedantes Eucarióticas en donde es isoformas modificadas post-traduccionalmente. Estas modificaciones pueden ascender hasta 10-20 Kd (según lo indicado también por la tinción de Coomassie en la fig. 4) y probablemente se deban principalmente a glucosilación alternativa.

Este experimento, que ha sido confirmado usando otras quimiocinas CC radiomarcadas (CCL5/RANTES y CCL2/MCP-1), demuestra la actividad de ChBP-59 (como proteína natural y como proteína marcada con histidina, recombinante) como proteína de unión a la quimiocina CC.

Ejemplo 3

Caracterización de actividad inhibidora de ChBP-59 recombinante en quimiocinas CC

Materiales y métodos

Ensayos SPA

Se designó el ensayo SPA para detectar moléculas que interfirieran con la interacción quimiocina/receptor de quimiocina, como se describe en la bibliografía (Alouani S, 2000) y como ya se describió en este documento (Ejemplo 1).

b. Quimiotaxia inducida por quimiocina CC

Los experimentos de quimiotaxia se realizaron en células L1.2 (línea pre-célula B de ratón) que expresan establemente el receptor de quimiocina humana 5 (CCR5). Se mantuvieron las células L1.2/CCR5 en medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen, catálogo no: 31870-025) enriquecido con FCS (Suero de ternero fetal; TerraCell, catálogo no: CS-C08-1000-A) al 10%, L-glutamina 2 mM (Invitrogen, catálogo no: 25030-024), piruvato sódico 1 mM (Sigma, catálogo no: S8636) y 1% penicilina-estreptomina (Invitrogen, catálogo no: 15140-148).

Veinticuatro horas antes de efectuar el ensayo de quimiotaxia, las células se trataron con ácido butírico 5 mM (Sigma, catálogo no: B-5887). Al día siguiente, las células se cosecharon por centrifugación durante 15 minutos a 230 x g y se resuspendieron a una densidad celular de 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 sin indicador rojo fenol (Invitrogen, catálogo no: 32404-014), enriquecido con FCS al 10%. Se suspendió CCL3/MIP-1 alfa a 0,01 mg/ml en el mismo medio y se prepararon once diluciones en serie 4 veces. De modo similar, se diluyó en serie cinco veces ChBP-59-HIS recombinante purificado de células TN5, comenzando por 316 ng/ml, y se mezcló en cantidades iguales con medio que contenía CCL3/MIP-1 alfa 2 nM. Se añadieron por triplicado alícuotas (32 ml) de la solución de quimiocina o de la solución de quimiocina-ChBP-59-HIS diluida en serie a los compartimentos inferiores de una cámara de quimiotaxia y se dispuso cuidadosamente una unidad de filtro con tamaño de poros de 8 μm (Neuroprobe ChemoTx System, catálogo no: 101-8) en la parte superior del compartimento inferior. La suspensión de células L1.2/CCR5 (20 μl) se añadió al compartimento superior de la cámara de quimiotaxia y se incubó durante 2 horas a 37°C en una incubadora humidificada con 5% CO_2 .

La tapa de la cámara de quimiotaxia luego se quitó y desechó. Se dispuso boca abajo una placa con embudo de 96 pocillos (Neuroprobe ChemoTx System, catálogo No: FP1) en la parte superior del compartimento inferior de la cámara de quimiotaxia. Se dispuso luego boca abajo una placa de matriz negra (Vitaris, catálogo no: 3915) en la parte superior de la placa de embudo y el ensamblaje de la cámara de quimiotaxia/placa de embudo/placa de matriz negra se invirtió. El medio del compartimento inferior de la cámara de quimiotaxia se transfirió luego a la placa de matriz negra por centrifugación durante 2 minutos a 700x g. La placa de matriz negra que contenía las células migradas se selló y congeló durante 2 horas a - 80°C. La cantidad de células que habían migrado al compartimento inferior de la cámara de quimiotaxia se determinó indirectamente usando el estuche de ensayo de proliferación celular CyQUANT (Molecular Probes, catálogo no: C7026). La placa negra se descongeló, y las células se resuspendieron completamente en 200 ml de tampón de lisis celular que contenía el tinte provisto en el estuche, de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. La fluorescencia se midió en una lectora de placas Wallac Victor, usando 480 nm/520 nm longitudes de onda de excitación/emisión.

Resultados

Las propiedades de unión a la quimiocina CC de ChBP-59-HIS se estudiaron en un SPA (Ensayo de Proximidad de Centelleos) y en un ensayo de migración celular inducida por la quimiocina CC.

El ensayo SPA demuestra que la dilución en serie de pares de quimiocina/receptor de quimiocina específicos de ChBP-59-HIS recombinante puede inhibir esta interacción. De hecho, la señal de SPA debida a la interacción de la esfera con la quimiocina radiomarcada mediante el receptor de quimiocina disminuye significativamente a bajas concentraciones molares de ChBP-59-HIS (Fig. 6). La afinidad de ChBP-59-HIS, según lo determinado con este planteamiento, parece mayor para CCL3/MIP-1 α (la CE_{50} para la inhibición fue 12 pM) que para CCL2/MCP-1 y CCL5/RANTES (la CE_{50} para la inhibición estuvo en el intervalo micromolar para ambas quimiocinas CC). Esto parece indicar una posible preferencia de unión de ChBP-59 para algunas quimiocinas CC.

Finalmente, ChBP-59-HIS puede inhibir eficazmente la quimiotaxia inducida por la quimiocina CC, en particular quimiotaxia inducida por CCL3/MIP-1 α y quimiotaxia inducida por CCL5/RANTES de L1.2-CCR5. Nuevamente, la cantidad de células migradas tras la exposición a la quimiocina CC disminuyó en forma proporcional con la concentración de ChBP-59-HIS añadida en este ensayo, en consecuencia inhibiendo la interacción de las células con la quimiocina CC. Este efecto es particularmente importante, ya que se puede lograr a bajas concentraciones molares de ChBP-59-HIS (inferiores a 10^{-10} M; Fig. 7).

Ejemplo 4

Caracterización de la actividad de ChBP-59 in vivo

Materiales y métodos

a) Animales

En todos estos experimentos se usaron ratones macho Balb/C o C57B6 (18-22 g). Los animales se alojaron en un ambiente controlado por temperatura con libre acceso a agua y alimento.

b) Reclutamiento de células peritoneales

Ratones Balb/c o C57B6 macho de 8 a 12 semanas de vida recibieron una inyección intraperitoneal de 200 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) o MIP-1 α humano (0,5 mg/Kg) diluido en 200 μ l de PBS. Para ensayar la inhibición, se administraron dosis s.c. que oscilaban entre 0,15 y 5 mg/kg de ChBP-59 en 200 μ l de PBS, 45 min antes de la administración de MIP-1 α humano (0,5 mg/kg i.p.). Los ratones se sacrificaron 18 h después de la inyección, se les lavó la cavidad peritoneal dos veces con 3 mL de PBS enfriado con hielo, y se mezcló el lavaje total de los ratones individuales. Los recuentos celulares totales se realizaron en una cámara Neubauer, usando tinción de Turk. Los recuentos de células diferenciales se realizaron en preparaciones de citospina (Shandon III) teñidas con May Grunwald-Giemsa, usando criterios morfológicos estándar para identificar tipos de células. Los resultados se presentan como el número de células por cavidad (Fig. 8 y Fig. 9).

c) Microscopia intravital

Para cada experimento, se administró 0,15 mg/Kg de MIP-1 α humano en 0,1 mL de PBS localmente, por inyección s.c. debajo de la piel escrotal derecha, usando una aguja de 30G, 1 h antes de la exteriorización. Para ensayar la inhibición, se preparó solución de ChBP-59 (0,5 mg/kg) más MIP-1 α (0,15 mg/Kg) en 100 μ l de PBS, 15 min antes de la administración de la inyección intraescrotal. El cremáster izquierdo se preparó luego para microscopia intravital. En síntesis, se realizó una incisión en la piel del escroto para exponer el músculo cremáster izquierdo, que luego se extirpó cuidadosamente de la fascia asociada. Se realizó una incisión a lo largo sobre la superficie ventral del músculo cremáster, usando un cauterio. El testículo y el epidídimo se separaron del músculo subyacente y se transfirieron a la cavidad abdominal. El músculo entonces se esparció sobre un pedestal para visualización ópticamente clara y se aseguró en los bordes con una sutura de 4-0. El tejido expuesto se bañó con solución salina tamponada con bicarbonato sódico caliente (pH 7,4). Se usó un microscopio intravital (Olympus BX50F4; Japón) con un lente objetivo de 20x y una pieza ocular de 10x para examinar la microcirculación cremastérica. Se utilizó una videocámara (5100 HS; Panasonic, Osaka, Japón) para proyectar las imágenes en un monitor, y las imágenes se grabaron para reproducción usando una videocasetera convencional.

Se seleccionaron vénulas cremastéricas individuales, no ramificadas (25-40 μ , de diámetro) y, para minimizar la variabilidad, se observó la misma sección de vénula cremastérica en todo el experimento. Se determinó el número de leucocitos rodantes, adherentes y emigrados fuera de línea durante la reproducción en vídeo. Los leucocitos rodantes se definieron como células que se mueven a una velocidad menor que aquella de los eritrocitos dentro de un vaso determinado. El flujo de células rodantes se midió como el número de células rodantes que pasan por un punto determinado en

la vénula por minuto. Un leucocito se consideró adherente si permanecía durante por lo menos 30 s, y se cuantificó la adhesión leucocitaria total como el número de células adherentes dentro de una longitud de 100 μm de vénula. La emigración de leucocitos se definió como el número de células en el espacio extravascular dentro del área de 50 μm de distancia de la vénula. Solamente las células adyacentes y claramente fuera del vaso bajo estudio se contaron como emigradas. Al final de cada experimento, se extrajo sangre completa por punción cardíaca. Los recuentos de células totales se realizaron en una cámara Neubauer modificada, usando tinción de Turk. Los resultados se presentan en la Fig. 10.

d) Sensibilización e inducción de reclutamiento de células Th2 en los pulmones

Se inmunizaron ratones por vía intraperitoneal con 2500 huevos isoled *S. mansoni* en los días 0 y 7 del protocolo. En el día 14, los ratones recibieron una prueba de provocación intranasal con 10 μg en 10 μL de PBS para localizar la respuesta a las vías respiratorias. Los ratones se sometieron nuevamente a la prueba de provocación 6 días más tarde por administración intratraqueal de 10 μg en 25 μL de PBS o con PBS solo (vehículo). Para ensayar la inhibición, se administró ChBP-59 (0,5 mg/kg) s.c., 45 min antes y 24 h después de la prueba. Cuarenta y ocho h después de la inyección, los ratones fueron sacrificados y los pulmones se llenaron *in situ* con 0,3 mL de PBS estéril con una cánula traqueal. Se extrajo fluido de los pulmones después de un masaje suave para extraer las células, y se recogió en un tubo de plástico sobre hielo. Este procedimiento se repitió tres veces, y las suspensiones celulares recuperadas de cada animal se mezclaron para ratones individuales. Los recuentos de células totales se realizaron en una cámara Neubauer modificada, usando tinte de Turk. Los recuentos de células diferenciales se realizaron en preparaciones de citospina (Shandon III) teñidas con May Grunwald-Giemsa usando criterios morfológicos estándar para identificar los tipos de células. Los resultados se presentan como el número de células por pulmones (véase Fig. 11).

e) Inflamación de las vías respiratorias inducida por OVA

Para inducir respuestas de las vías respiratorias a OVA, los ratones se sensibilizaron con una inyección s.c. de 10 μg de OVA precipitada en 2 mg de hidróxido de aluminio (2%) en un volumen total de 200 μL . Catorce días después de la sensibilización, los ratones recibieron PBS o una solución de OVA al 1% diluida en PBS con aerosol durante 20 min. Para ensayar la inhibición, se administró ChBP-59 (0,5 mg/kg) s.c. 45 min antes y cada 12h después de la prueba de provocación con antígeno. Cuarenta y ocho horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados y se llenaron los pulmones *in situ* con 0,3 mL de PBS estéril mediante una cánula traqueal. Se extrajo fluido de los pulmones después de masajear suavemente para extraer células y se recogió en un tubo de plástico sobre hielo. Este procedimiento se repitió tres veces, y las suspensiones celulares recuperadas de cada animal se mezclaron para ratones individuales. Los recuentos de células totales se realizaron en una cámara Neubauer modificada, usando tinte de Turk. Los recuentos de células diferenciales se realizaron en preparaciones de citospina (Shandon HI) teñidas con May Grunwald-Giemsa, usando criterios morfológicos estándar para identificar tipos de células. Los resultados se presentan como el número de células por pulmones (véase Fig. 12).

f) Lesión pulmonar inducida por bleomicina

Bajo anestesia, (cetamina 3,2 mg/ratón y xilazina 0,16 mg/ratón), se instiló 0,125 U Bleomicina (Bonar, Laboratorio Sintética, Brasil) en 30 μL PBS en la tráquea de ratón con una aguja 25-G insertada entre los anillos cartilaginosos de la tráquea. Los animales control recibieron solución salina sola. El sitio de traqueotomía se suturó, y se dejó que los animales se recuperaran. Para ensayar la inhibición, se administró ChBP-59 (0,5 mg/kg) s.c. 45 min antes y cada 12 h después de la instilación con bleomicina. Dos u ocho días después de la instilación, los ratones fueron sacrificados y se llenaron los pulmones *in situ* con 0,3 mL de PBS estéril mediante una cánula traqueal. Se extrajo fluido de los pulmones después de masajear suavemente para extraer las células, y se recogió en un tubo de plástico sobre hielo. Este procedimiento se repitió tres veces, y las suspensiones celulares recuperadas de cada animal se mezclaron para ratones individuales. Los recuentos de células totales se realizaron en una cámara Neubauer modificada, usando tinte de Turk. Los recuentos de células diferenciales se realizaron en preparaciones de citospina (Shandon III) teñidas con May Grunwald-Giemsa, usando criterios morfológicos estándar para identificar los tipos de células. Los resultados se presentan como el número de células por pulmones (véase Fig. 13).

g) Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como error estándar de la media. Los datos normalizados se analizaron por análisis ANOVA de un factor, y las diferencias entre los grupos se determinaron usando Student-Newman-Keuls como prueba posterior. Un valor $p < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

Se ensayó la capacidad de ChBP-59 de inhibir el reclutamiento de células inducido por MIP-1 α en la cavidad peritoneal. En una dosis única de 1,5 mg/kg, la inhibición más significativa se observó para los granulocitos, que no es el caso en el sistema humano en el que MIP-1 α recluta predominantemente monocitos. Se realizó un segundo experimento con dosis que oscilaban entre 0,15 y 5 mg/kg en dos cepas de murino, Balb/C y C57B6. El número de eosinófilos reclutados en los ratones Balb/C fue insuficiente para cuantificar su inhibición, pero se observó buena inhibición de neutrófilos en ambas cepas en todas las dosis, y se seleccionó 0,5 mg/kg para los experimentos subsiguientes. La microscopía intravital confirmó que ChBP-59 inhibía las tres etapas implicadas en el proceso de reclutamiento, rodaje, adhesión y emigración.

Debido a la inhibición potente del reclutamiento de eosinófilos, se ensayó la capacidad de ChBP-59 de inhibir el reclutamiento de estas células en el pulmón, en un modelo de sensibilización de Th2, como también en inflamación pulmonar inducida por ovalbúmina. En ambos casos, se observó inhibición potente del reclutamiento de eosinófilos, con poco efecto sobre las células mononucleares. Ya que la inflamación pulmonar inducida por bleomicina es mediada por granulocitos neutrófilos, también se ensayó en este modelo, y se observó inhibición significativa de neutrófilos tanto en los días 2 como 8 después de la sensibilización.

Estos resultados permiten la interpretación de que sería probable inhibir el reclutamiento mononuclear en seres humanos.

En consecuencia, se puede concluir que ChBP-59 es una nueva proteína que tiene propiedades de unión a la quimiocina CC, inhibiendo así la acción de las quimiocinas. Esta proteína se puede aplicar útilmente en medicina humana como compuesto antiinflamatorio, como también en problemas de indicaciones médicas y veterinarias relacionadas con los efectos parasíticos de garrapatas, incluyendo agentes infecciosos transmitidos por garrapatas. Las moléculas basadas en las proteínas de la invención que interfieren con la función de dichas proteínas podrían romper el ciclo vital de la garrapata, controlar los ectoparásitos y sus patógenos, o reducir la capacidad de las garrapatas de transmitir los organismos causantes de la enfermedad.

TABLA I

Aminoácido	Grupo sinónimo	Grupos sinónimos más preferidos
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp

ES 2 321 122 T3

TABLA II

5	Aminoácido	Grupo sinónimo
	Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
10	Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, lle, D-Met, D-lle, Orn, D-Orn
15	Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
	Pro	D-Pro, ácido L-1-tioazolidina-4-carboxílico, ácido D-o L-1-oxazolidina-4-carboxílico
20	Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
	Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
25	Val	D-Val, Leu, D-Leu, lle, D-lle, Met, D-Met, AdaA, AdaG
	Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, beta-Ala, Acp
30	lle	D-lle, Vat, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
35	Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D- Trp, Trans-3,4 o 5-fenilprolina, AdaA, AdaG, cis-3,4 o 5-fenilprolina, Bpa, D-Bpa
	Tyr	D-Tyn Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
40	Cys	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
	Gln	D-GIn, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
45	Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-GIn
	Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D- Met, lle, D-lle, Orn, D-Orn
50	Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-GIn
	Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-GIn
55	Met	D-Met, S--Me--Cys, lle, D-lle, Leu, D-Leu, Val, D-Val

ES 2 321 122 T3

TABLA III

Cebador	Secuencia (5'-3')
59-attB1 directo	AAGCAGGCTTCGCCACCATGACGTTTAAGGCTTGCATTG
59-attB2 inverso	GTGATGGTGTGATGGTATTCTTCTTGTCTCGCCAATTG
GCP directo	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGCCACC
GCP inverso	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAATGGTGAT GGTGATGGTG
PEAK12F	GCCAGCTTGGCACTTGATGT
pEAK12R	GATGGAGGTGGACGTGTCAG
pDEST8F	TCTTCTACGGCAAGGTGCTG
pDSST8R	AAGCAAGTAAACCTCTACA

Secuencia subrayada

= secuencia Kozak

Negrita

= codón de comienzo / codón
de finalización

Secuencia Itálica

= marcador His

Referencias

Alarcon-Chaidez F J *et al.*, *Parasite Immunol*, 25: 69-77, 2003.

Alcami A, *Nat Rev Immunol*, 3: 36-50, 2003.

Aljamali M N *et al.*, *Insect Mol Biol*, 12: 299-305, 2003.

Alouani S, *Methods Mol Biol*, 138: 135-141, 2000.

Anguita J *et al.*, *Immunity*, 16: 849-859, 2002.

Baggiolini M *et al.*, *Annu Rev Immunol*, 15: 675-705, 1997.

Baggiolini M, *J Intern Med*, 250: 91-104, 2001.

Beck C G *et al.*, *J Biol Chem*, 276: 43270-43276, 2001.

Ben-Bassat A, *Bioprocess Technol.*, 12:147-159, 1991.

Brown A *et al.*, *J Pept Sci*, 2:40-46, 1996.

Bums J M *et al.*, *J Biol Chem.*, 277:2785-2789, 2002.

Bursill C A *et al.*, *Circulation*, 110: 2460-2466, 2004.

Chuang V T *et al.*, *Pharm Res.*, 19: 569-577, 2002.

Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628, 1991.

Cleland J L *et al.*, *Curr Opin Biotechnol*, 12: 212-9, 2001.

ES 2 321 122 T3

- Coleman R et al.**, *Drug Discov Today*, 6: 1116-1126, 2001.
- Dougherty D A**, *Curr Opin Chem Biol*, 4: 645-52, 2000.
- 5 **Fernandez E J y Lolis E**, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42:469-499, 2002.
- Ferreira B R y Silva J S**, *Vet Immunol Immunopathol*, 64: 279-293, 1998.
- Gendel S M**, *Ann NY Acad SCI*, 964: 87-98, 2002.
- 10 **Gillespie R D et al.**, *J Immunol*, 166: 4319-4326, 2001.
- Godessart N y Kunkel S L**, *Curr Opin Immunol*, 13: 670-675, 2001.
- 15 **Goding**, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp.59-103.
- Gotebiowski A et al.**, *Curr Opin Drug Discov Devel*, 4: 428-34, 2001.
- Graslund T et al**, *Protein Expr Purif.*, 9: 125-132, 1997.
- 20 **Greenwald R B et al.**, *Adv Drug Deliv Rev*, 55: 217-250, 2003.
- Gwakisa P et al.**, *Vet Parasitol*, 99:53-61, 2001.
- 25 **Harris J M y Chess R B**, *Nat Rev Drug Discov*, 2: 214-221, 2003.
- Hill C A y Gutierrez J A**, *Med Vet Entomol*, 17: 224-227, 2003.
- Holt L J et al.**, *Trends Biotechnol*, 21:484-490, 2003.
- 30 **Hoogenboom y Winter**, *J. Mol. Biol*, 227:381, 1991.
- Hruby V J y Balse P M**, *Curt Med Chem*, 7: 945-970, 2000.
- 35 **Kipriyanov S M y Le Gall F**, *Mol Biotechnol*, 26:39-60, 2004.
- Kohler et al**, *Nature* 256: 495, 1975.
- Jensen K K et al.**, *J Virol*, 77: 624-630, 2003.
- 40 **Jones et al.**, *Nature*, 321:522-525, 1986.
- Li A**, *Drug Discov Today*, 6: 357-366, 2001.
- 45 **Lindow M et al**, *Trends Pharm Sci*, 24: 126-130, 2003.
- Loetscher P y Clark-Lewis I**, *J Leukoc Biol*, 69: 881-884, 2001.
- Luo B y Prestwich G D**, *Exp Opin Ther Patents*, 11: 1395-1410, 2001.
- 50 **Madden R D et al.**, *Exp Appl Acarol*, 32: 77-87, 2004.
- Marshall S A et al.**, *Drug Disc Today*, 8: 212-221, 2003.
- 55 **Marks et al.**, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991.
- Mulenga A et al.**, *Microbes Infect*, 2: 1353-1361, 2000.
- Murphy L R et al**, *Protein Eng*, 13:149-152, 2000.
- 60 **Murrell A et al.**, *Mol Phylogenet Evol*, 21: 244-258, 2001.
- Nilsson J et al.**, *Protein Expr Purif*, 11: 1-16, 1997.
- 65 **Pearson W R**, *Methods Mol Biol.*, 132:185-219, 2000.
- Pillai O y Panchagnula R**, *Cur Opin Chem Biol*, 5: 447-451, 2001.

ES 2 321 122 T3

Presta L, *Curr Opin Struct Biol*, 13: 519-525, 2003.

Pyo R et al., *Am J Pathol*, 164: 2289-2297, 2004.

5 **Rapoport T A et al.**, *Annu Rev Biochem.*, 65:271-303, 1996.

Rogov S I y Nekrasov A N, *Protein Eng*, 14: 459-463, 2001.

Scatchard G., *Ann NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949.

10 **Schellekens H**, *Nat Rev Drug Disc*, 1: 457-462, 2002.

Seet B T et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9008-9013, 2001.

15 **Ullmann A J et al.**, *Exp Appl Acarol*, 28: 107-126, 2002.

Vaitukaitis et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 33, p. 988, 1971.

Valenzuela J G, *Am J Trop Med Hyg*, 66: 223-224, 2002.

20 **Vasserot A P et al.**, *Drug Disc Today*, 8: 118-126, 2003.

Van **Valkenburgh H A y Kahn R A**, *Methods Enzymol.*, 344:186-193, 2002.

25 **Villain M et al.**, *Chem Biol*, 8: 673-679, 2001.

Wang H et al., *Exp Appl Acarol* 1999, 23: 969-975, 1999.

Ward et al., *Nature* 341 :544, 1989.

30 **Webb L M et al**, *FASEB J*, 18: 571-573, 2004.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- a) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 (SEC ID NO: 5);
- b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 maduro (SEC ID NO: 6);
- c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS (SEC ID NO: 17);
- d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS maduro (SEC ID NO: 18);
- e) una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico capaz de hibridación a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de a), b), c) o d) bajo condiciones moderadamente rigurosas, codificando dicho ácido nucleico una proteína que se une a una quimiocina CC;
- f) una proteína por lo menos aproximadamente 70% idéntica en secuencia de aminoácidos a una proteína de a), b), c) o d), y que se une a una quimiocina CC;
- g) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c), d), o) o f), en donde el fragmento se une a una quimiocina CC.

2. El polipéptido según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:

- a) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 (SEC ID NO: 5);
- b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 maduro (SEC ID NO 6);
- c) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS (SEC ID NO: 17);
- d) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS maduro (SEC ID NO: 18);
- e) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c) o d), en donde el fragmento se une a una quimiocina CC.

3. Un mutante activo de una proteína según se ha definido en la reivindicación 1 ó 2 en donde en el mutante se han añadido, eliminado o sustituido uno o más residuos aminoácido y en donde el mutante se une a una quimiocina CC.

4. El mutante activo de una proteína según la reivindicación 3, **caracterizado** porque dicho mutante contiene:

- a) un residuo Cisteína en la posición correspondiente a los residuos 32, 49, 53, 66, 85, 90, 95 y 104 de ChBP-59, de acuerdo con la SEC ID NO: 5; y
- b) un sitio de glucosilación en la posición correspondiente a Asparagina 39, 54 y 62 de ChBP-59, de acuerdo con la SEC ID NO:5.

5. Una proteína de fusión que comprende una proteína según se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, operativamente unida a una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas entre las siguientes: un dominio extracelular de una proteína unida a una membrana, una región constante de inmunoglobulina, un dominio de multimerización, una hormona de la proteína heterodimérica, un péptido de señal, una señal de exportación y una secuencia de marcador.

6. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque dicho polipéptido está modificado post-traduccionamente.

7. La proteína según la reivindicación 6, **caracterizada** porque dicha proteína está glucosilada.

8. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque dicha proteína está en la forma de una fracción activa, precursor, sal, derivado, conjugado, complejo, o está PEGilada.

9. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 9, seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 (SEC ID NO: 5);

b) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 maduro (SEC ID NO: 6);

5 c) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS (SEC ID NO: 17);

d) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS maduro (SEC ID NO: 18);

10 e) una molécula de ácido nucleico capaz de hibridación a una molécula de ácido nucleico de a), b), c) o d) bajo condiciones rigurosas, y que codifica una proteína que se une a una quimiocina CC;

f) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína por lo menos aproximadamente 70% idéntica en secuencia de aminoácidos a una proteína de a), b), c) o d), y que se une a una quimiocina CC;

15 g) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende un fragmento de una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico de a), b) c), d), e) o f), en donde el fragmento se une a una quimiocina CC; y

20 h) una variante degenerada de una molécula de ácido nucleico de a), b), c), d), e), f) o g).

11. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 10, en la que dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en:

25 a) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 (SEC ID NO: 5);

b) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59 maduro (SEC ID NO 6);

30 c) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS (SEC ID NO: 17);

d) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ChBP-59-HIS maduro (SEC ID NO: 18);

e) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c) o d), en donde el fragmento se une a una quimiocina CC;

35 f) un mutante activo de una proteína de a), b), c) o d), en donde en el mutante se han añadido, eliminado o sustituido uno o más residuos aminoácido y en donde el mutante se une a una quimiocina CC; y

40 g) una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión comprende una proteína de a), b), c), d), e) o f) operativamente unida a una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas entre las siguientes: un dominio extracelular de una proteína unida a una membrana, una región constante de inmunoglobulina, un dominio de multimerización, un péptido de señal, una señal de exportación, una secuencia de marcador.

45 12. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizada** porque la quimiocina CC es CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 alfa y/o CCL2/MCP-1.

13. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que dicha molécula es una molécula de DNA, particularmente una molécula de cDNA.

50 14. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 9, en la que dicha molécula comprende o es una secuencia de DNA de la SEC ID NO: 3 ó 15.

55 15. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 9, en la que dicha molécula comprende o es una secuencia de DNA de la SEC ID NO: 4 ó 16.

60 16. Un oligonucleótido que comprende un fragmento de un ácido nucleico según la reivindicación 10 u 11, seleccionado del grupo que consiste en oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud.

17. Un vector de clonación o expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15.

65 18. Un vector de expresión según la reivindicación 17, que además comprende un promotor operativamente unido asociado a dicha molécula de ácido nucleico, en particular un promotor específico de tejido, constitutivo o inducible.

ES 2 321 122 T3

19. Una célula hospedante transformada o transfectada con un vector de expresión según la reivindicación 17 ó 18.

20. Una célula que ha sido genéticamente modificada para producir una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

21. Un procedimiento para preparar un polipéptido, que comprende cultivar una célula hospedante según la reivindicación 19 ó 20, bajo condiciones que permiten o promueven la expresión.

22. El procedimiento según la reivindicación 21, que además comprende purificar la proteína.

23. El procedimiento según la reivindicación 21 ó 22, que además comprende formular la proteína para administración a seres humanos.

24. Un animal no humano, transgénico que expresa una proteína de unión a la quimiocina CC, **caracterizado** porque las células de dicho animal contienen una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, o un vector de expresión de la reivindicación 17 ó 18.

25. Un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

26. Un anticuerpo según la reivindicación 25, que es un anticuerpo monoclonal.

27. El anticuerpo según la reivindicación 25 ó 26, que es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, o un fragmento de anticuerpo tal como Fab, F(ab)², scFv o un anticuerpo de dominio.

28. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 18, o una célula según las reivindicaciones 19 ó 20, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

29. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición según la reivindicación 28, para uso como medicamento.

30. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición según la reivindicación 28, para uso en la regulación de una respuesta inmunitaria o inflamatoria en un mamífero.

31. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición según la reivindicación 28, para uso en el tratamiento o la prevención de trastornos relacionados con la quimiocina CC en animales.

32. El uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, como ingrediente activo en la elaboración de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno inmunitario o inflamatorio en un mamífero.

33. El uso según la reivindicación 32, **caracterizado** porque el trastorno inmunitario o inflamatorio es causado por CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 alfa o CCL2/MCP-1.

34. El uso según la reivindicación 32 ó 33, en el que el trastorno inmunitario o inflamatorio es una enfermedad autoinmunitaria, una infección, una enfermedad alérgica, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad metabólica, una enfermedad gastrointestinal, una enfermedad neurológica, septicemia, una enfermedad relacionada con rechazo a trasplantes o una enfermedad fibrótica.

35. El uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la preparación de un medicamento para la vacunación de un mamífero contra parásitos, virus o bacterias.

36. Un estuche para detectar una quimiocina CC o un análogo, una proteína o un receptor de unión a la quimiocina, la interacción de la quimiocina CC y una proteína de unión a la quimiocina CC, o antagonistas o agonistas de dicha interacción, que comprende un reactivo de detección y por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

a) Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 9;

b) Un oligonucleótido según la reivindicación 16;

c) Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y

d) Un anticuerpo según la reivindicación 25, 26 ó 27.

37. Un método para detectar una quimiocina CC o un análogo *in vitro* o *in vivo*, una proteína o un receptor de unión a la quimiocina CC, la interacción de una quimiocina CC y una proteína de unión a la quimiocina CC, o antagonistas

ES 2 321 122 T3

o agonistas de dicha interacción, en donde dicho método comprende poner en contacto una muestra con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

- a) Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 9;
- b) Un oligonucleótido según la reivindicación 16;
- c) Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y
- d) Un anticuerpo según la reivindicación 25, 26 ó 27.

Figura 1

```

1  GGCCATTACGGCCGGGGGCACATCCACAGGTTTCAGTATTAG
   CTGATTGACGTCGTTAGTGGAATTCAACTTGTTTAGCACT

82  ATG ACG TTT AAG GCT TGC ATT GCC ATC ATA
1   MET THR PHE LYS ALA CYS ILE ALA ILE ILE

112 ACT GCA CTT TGT GCA ATG CAA GTT ATA TGT
11  THR ALA LEU CYS ALA MET GLN VAL ILE CYS

142 GAA GAT GAT GAA GAT TAT GGA GAC TTA GGA
21  GLU ASP ASP GLU ASP TYR GLY ASP LEU GLY

172 GGA TGC CCA TTT TTA GTT GCT GAG AAT AAA
31  GLY CYS PRO PHE LEU VAL ALA GLU ASN LYS

202 ACA GGG TAC CCG ACA ATC GTG GCG TGT AAA
41  THR GLY TYR PRO THR ILE VAL ALA CYS LYS

232 CAA GAC TGC AAT GGT ACA ACC GAG ACT GCT
51  GLN ASP CYS ASN GLY THR THR GLU THR ALA

262 CCA AAC GGC ACA CGT TGC TTT TCG ATT GGT
61  PRO ASN GLY THR ARG CYS PHE SER ILE GLY

392 GAT GAA GGA CTC AGA AGA ATG ACG GCA AAC
71  ASP GLU GLY LEU ARG ARG MET THR ALA ASN

322 CTT CCT TAC GAC TGC CCT CTA GGA CAA TGC
81  LEU PRO TYR ASP CYS PRO LEU GLY GLN CYS

352 AGT AAT GGA GAC TGC ATT CCC AAG GAA ACA

```

ES 2 321 122 T3

91 SER ASN GLY ASP **CYS** ILE PRO LYS GLU THR

382 TAC GAG GTA TGC TAC AGA CGC AAT TGG CGA

101 TYR GLU VAL **CYS** TYR ARG ARG ASN TRP ARG

412 GAC AAG AAG **AAT TAA**

111 ASP LYS LYS ASN stop

427 GAATGACCTGATTCCTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 2

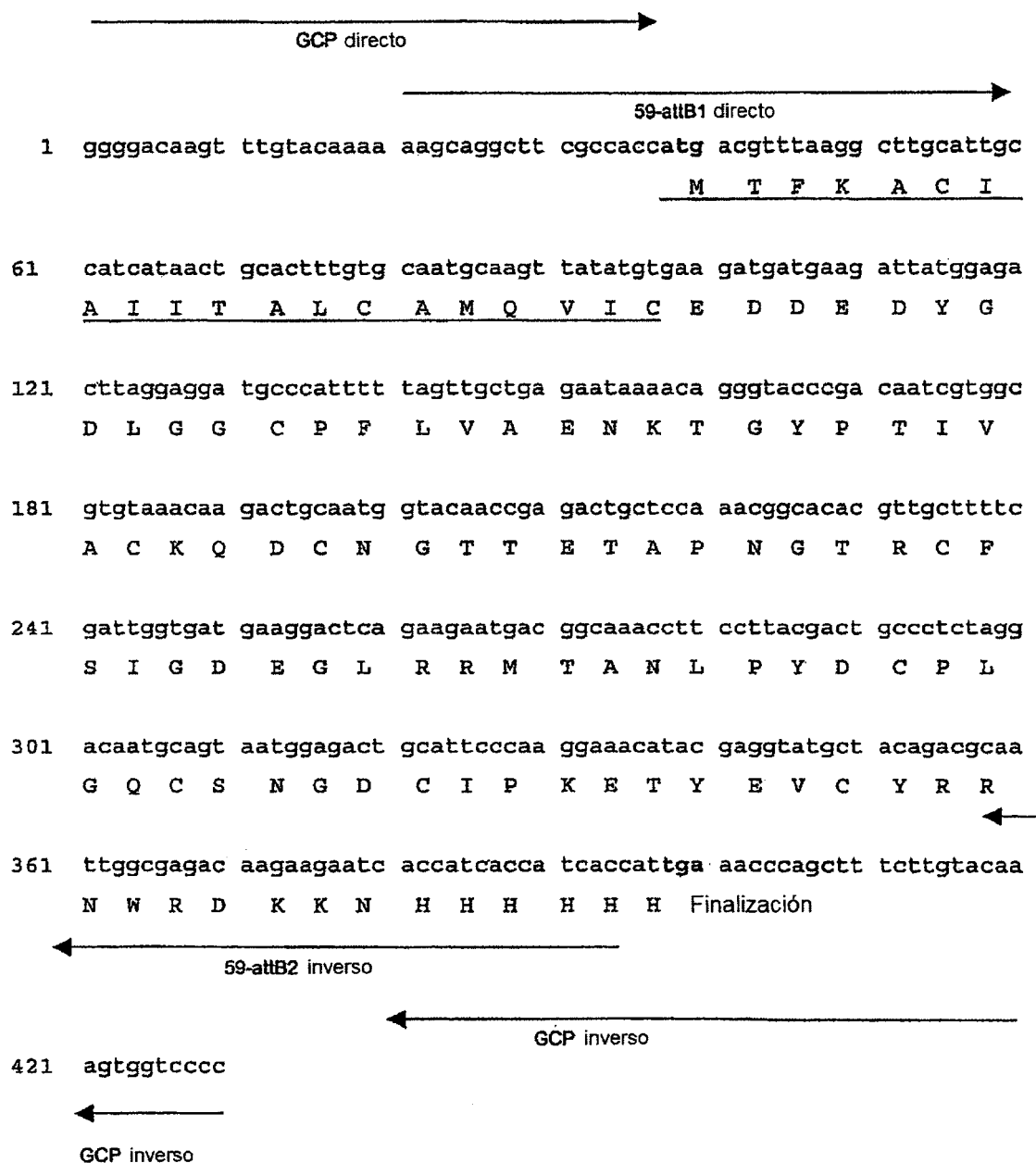


Figura 3
A

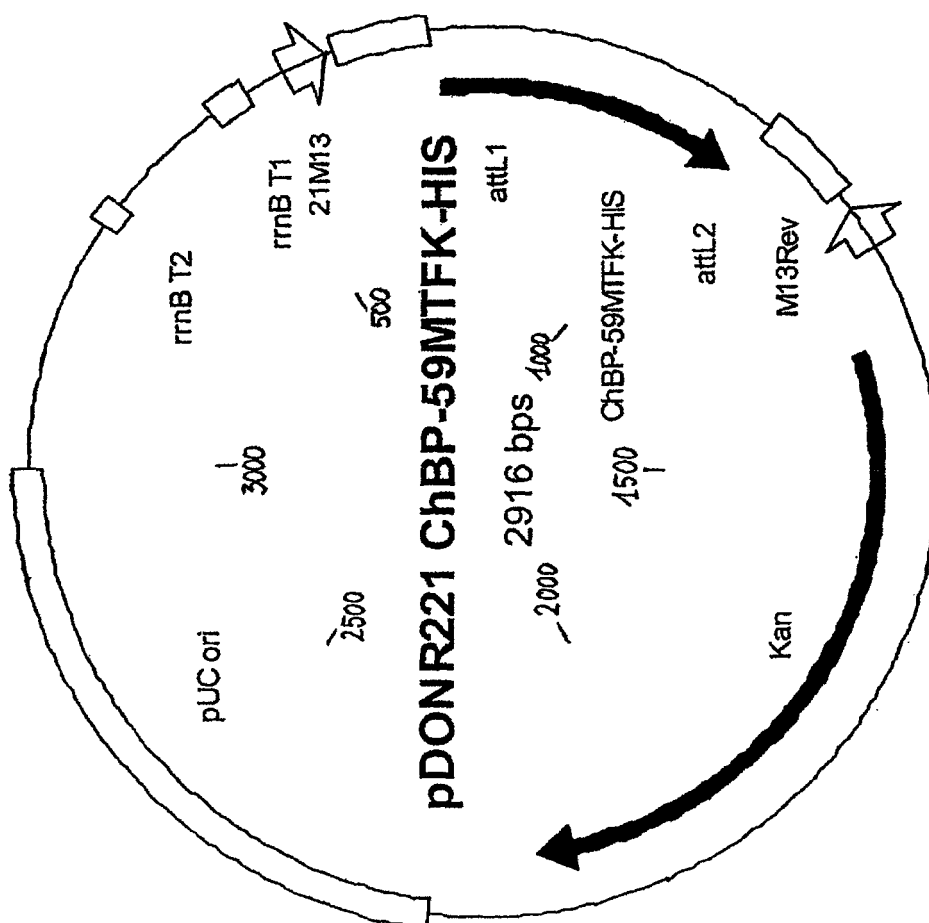
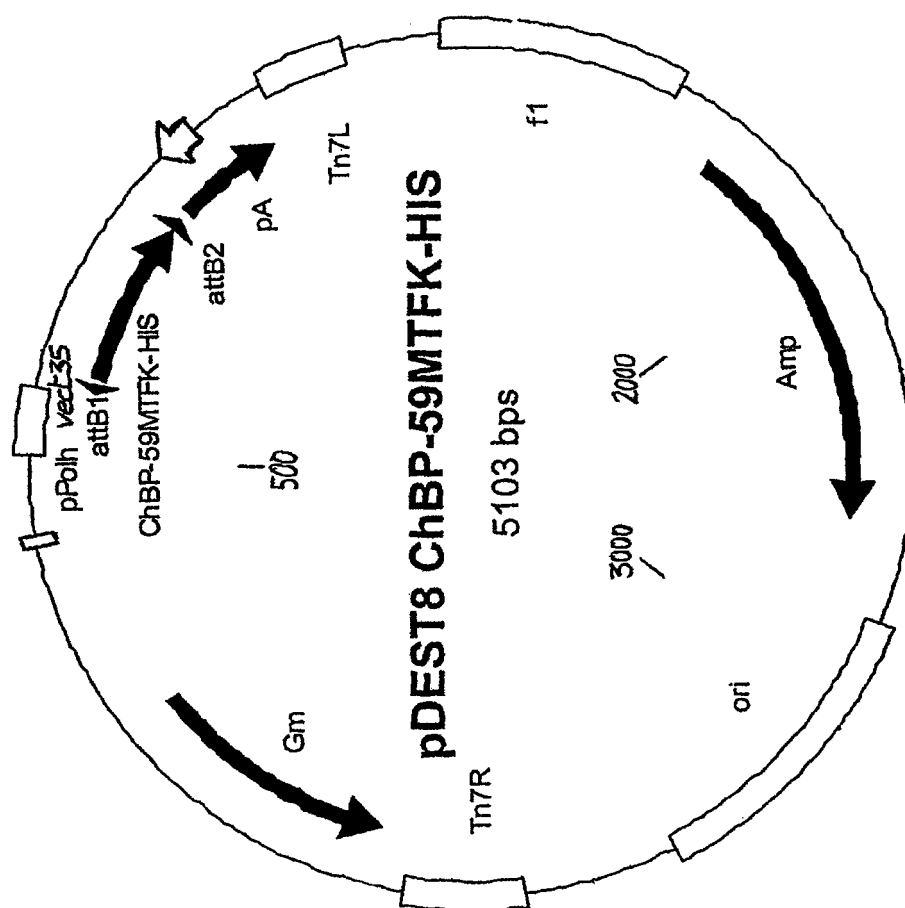


Figura 3
B



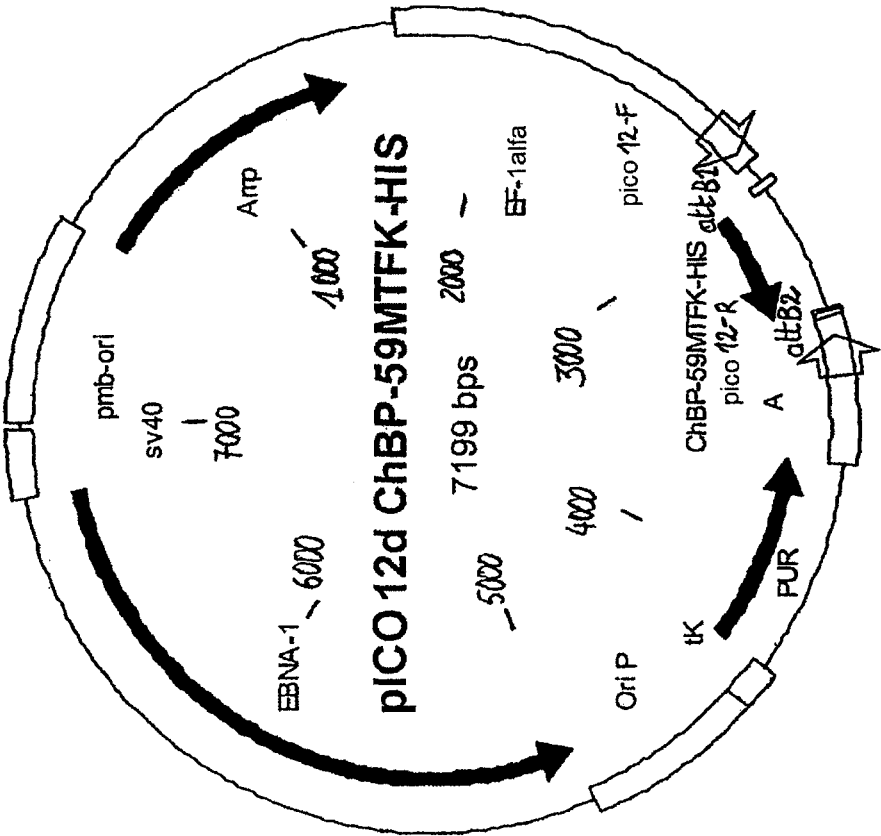


Figura 3
C

Figura 4



Figura 5

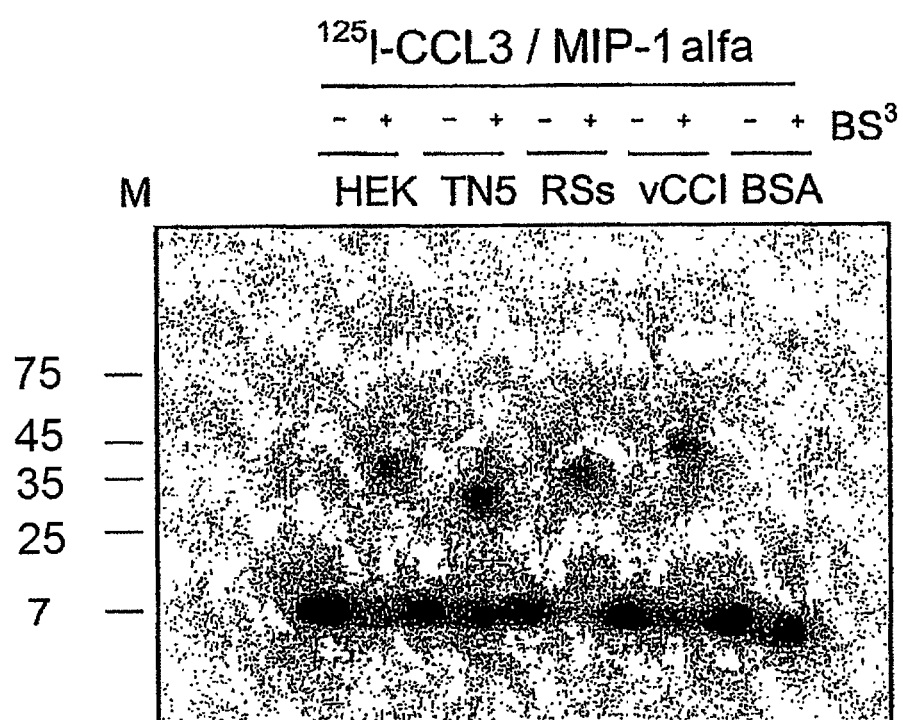
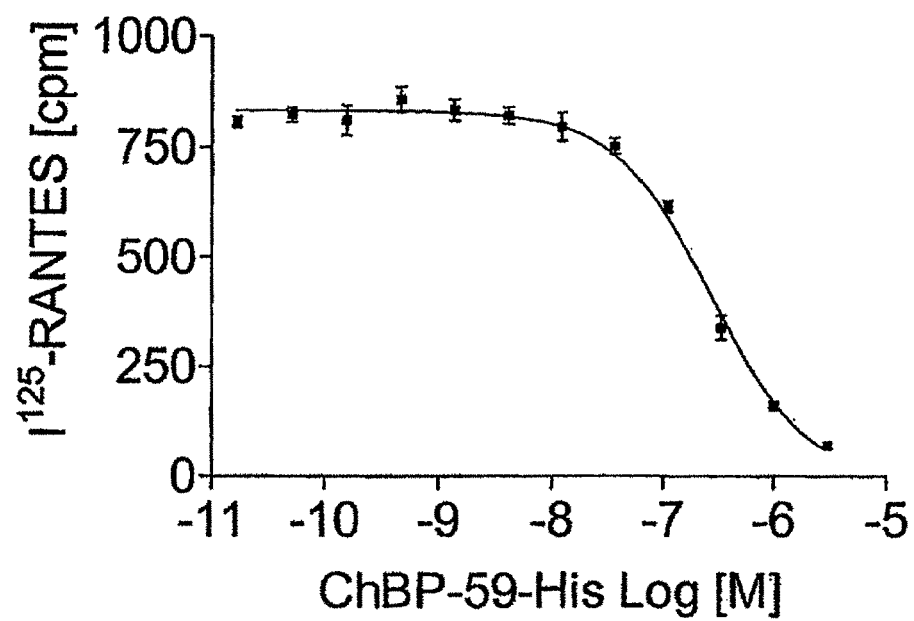
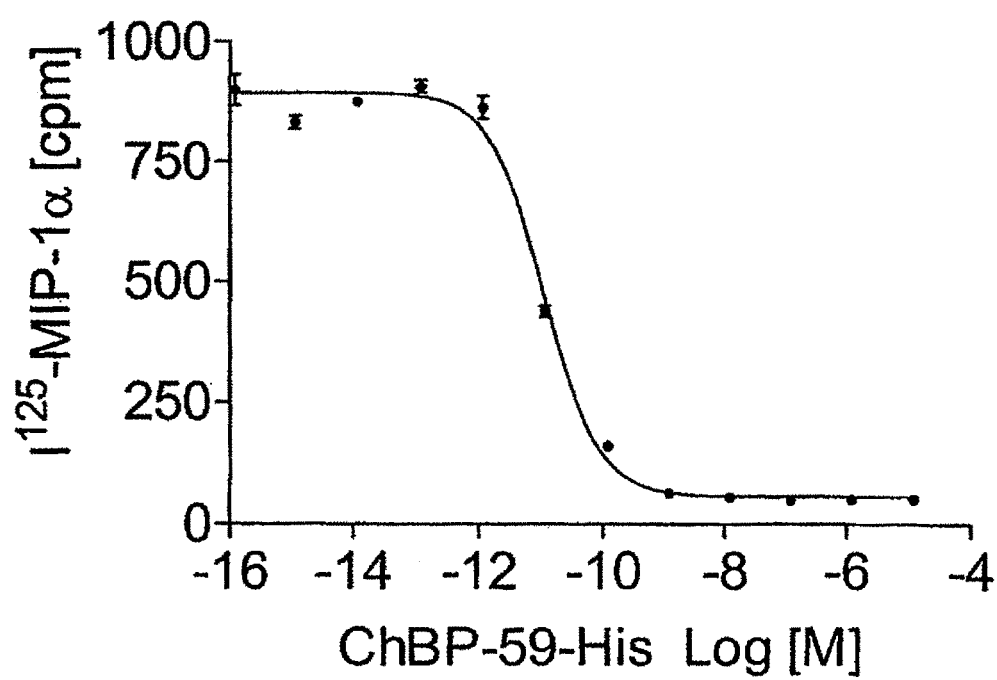


Figura 6

A)



B)



c)

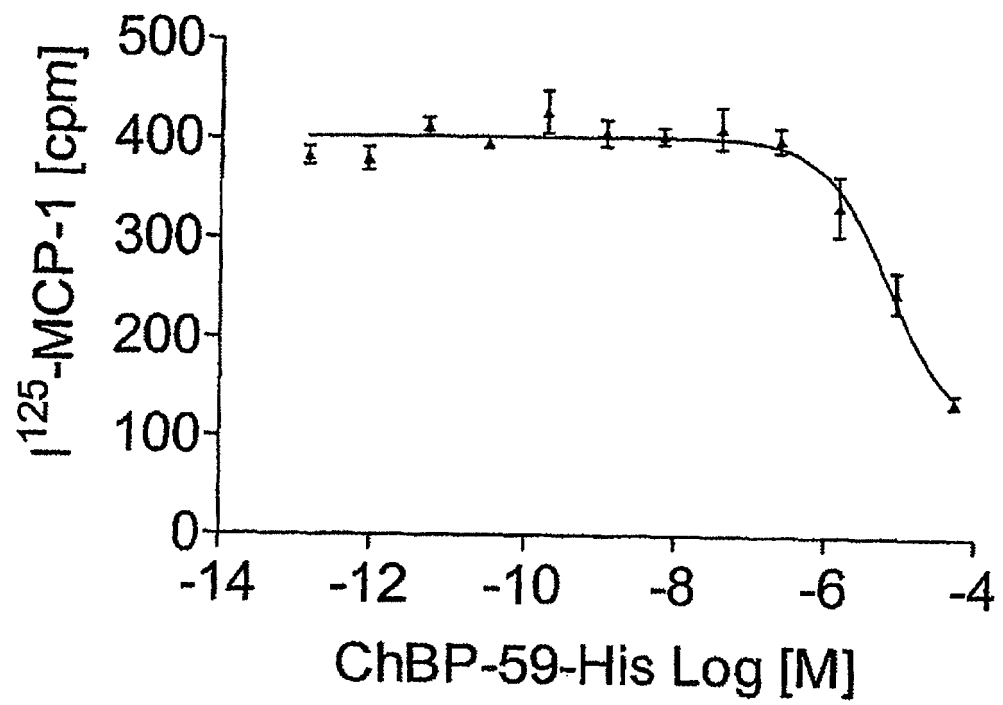


Figura 7

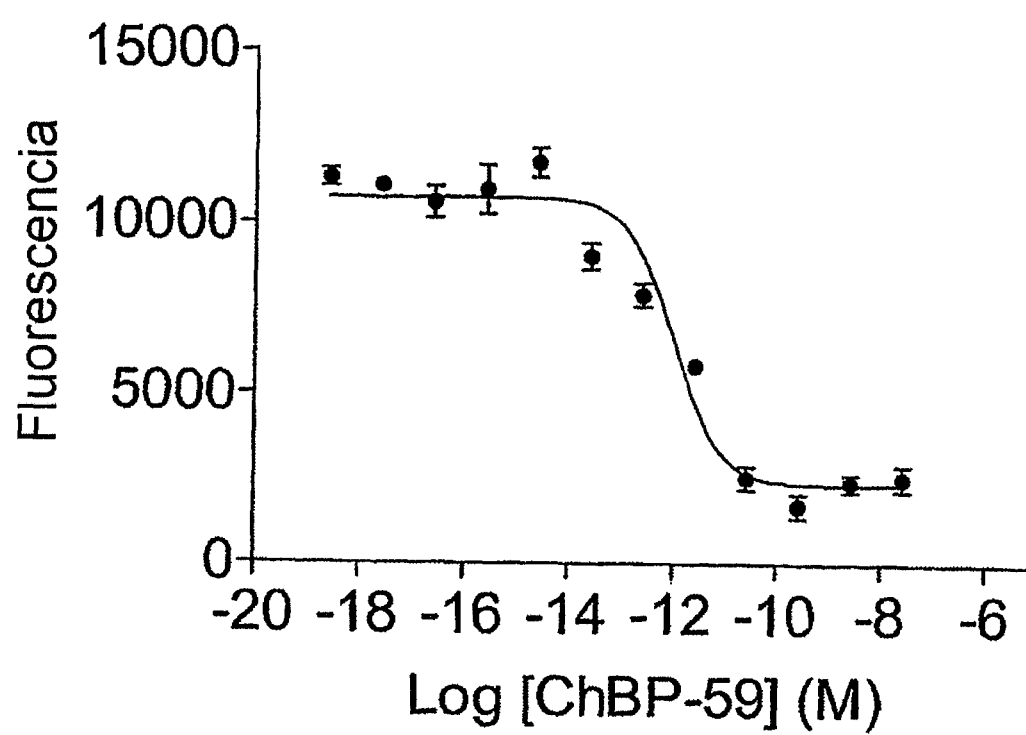
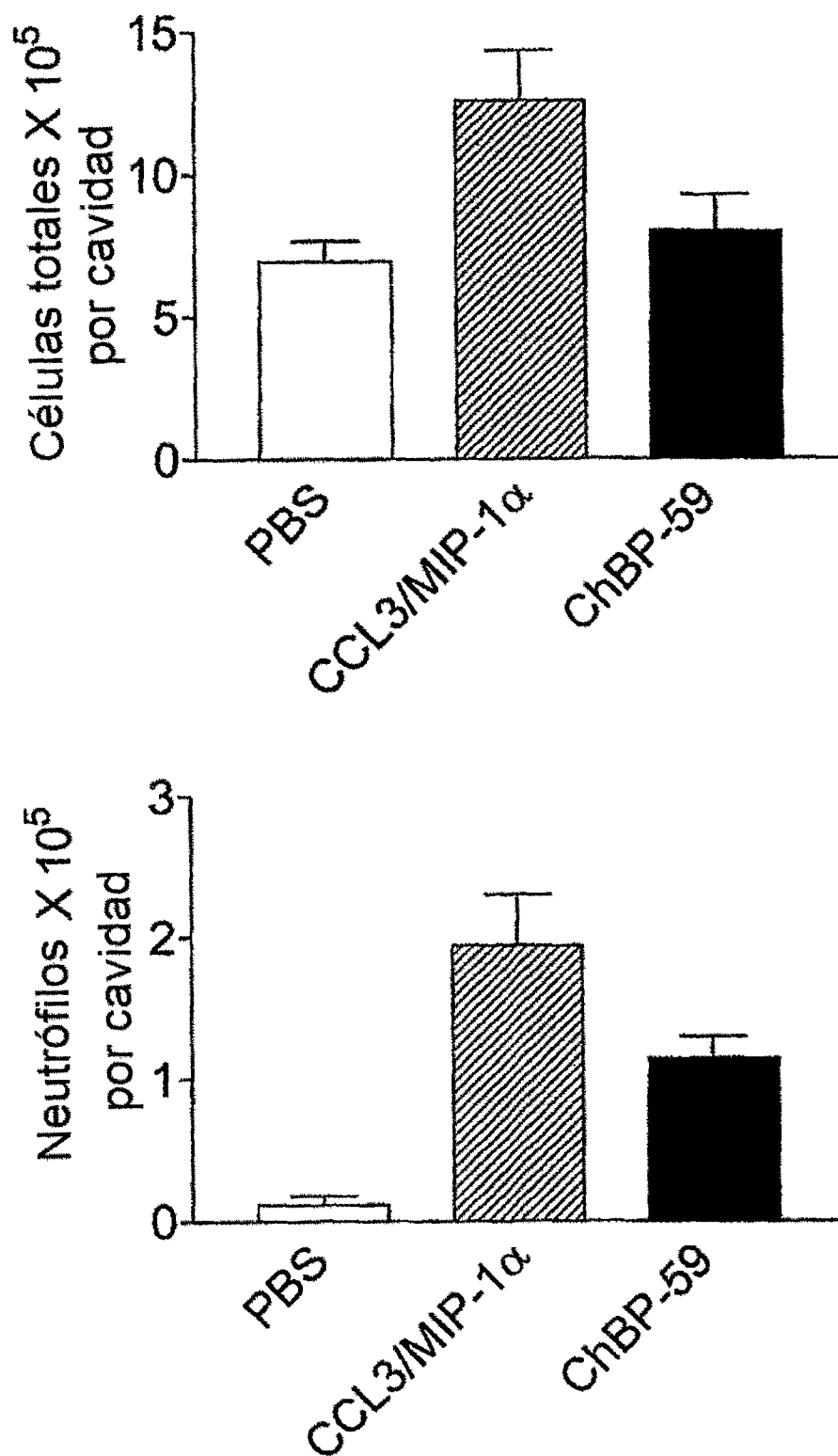


Figura 8



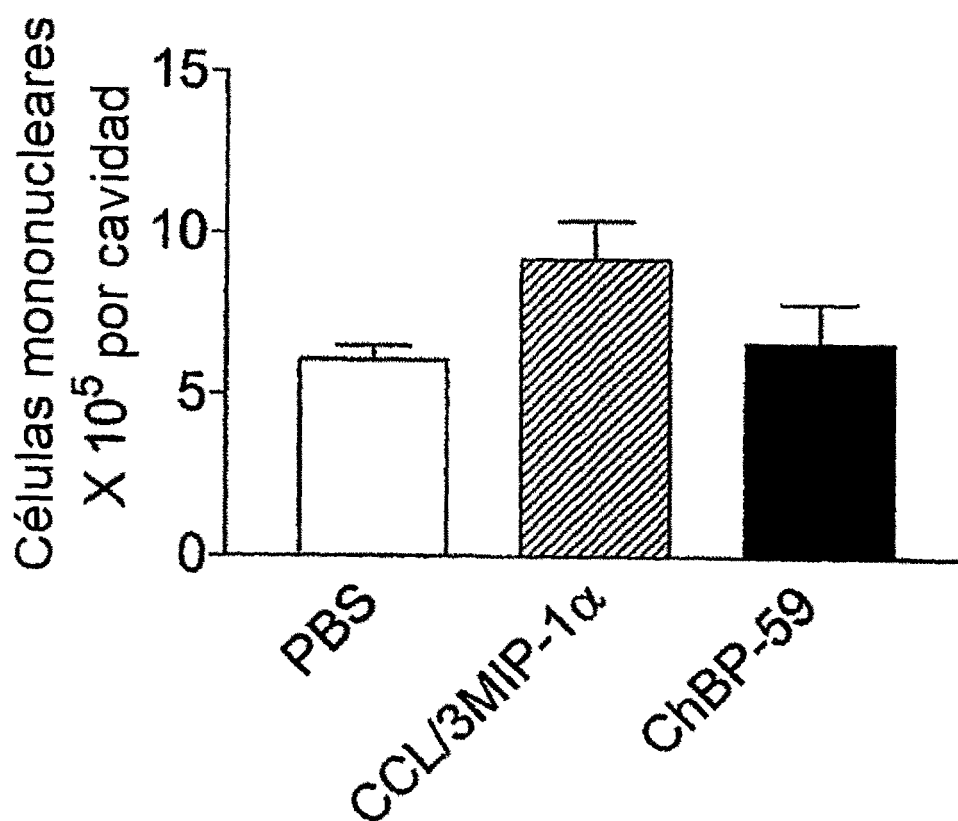
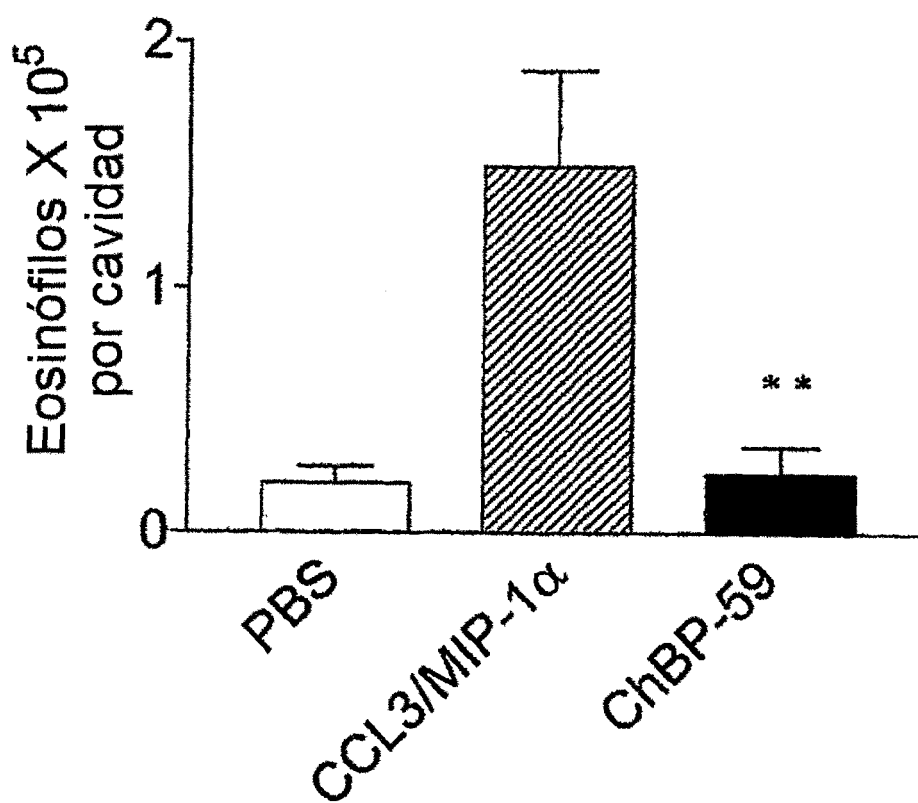
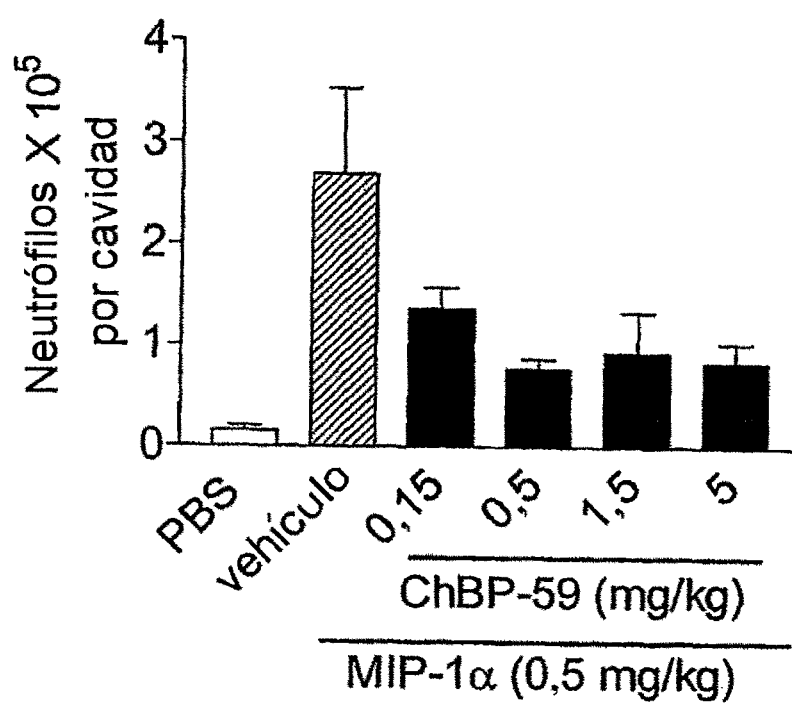


Figura 9

A



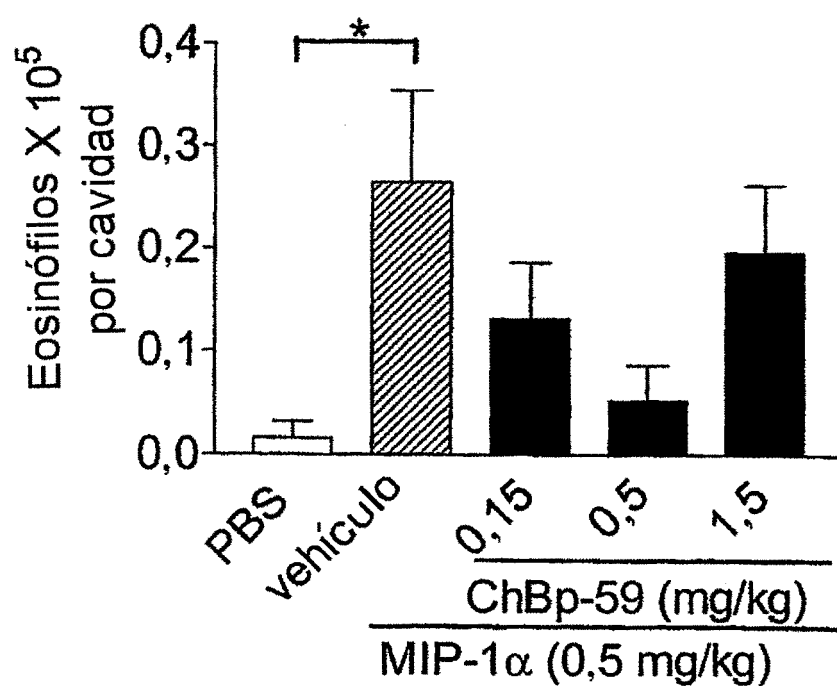
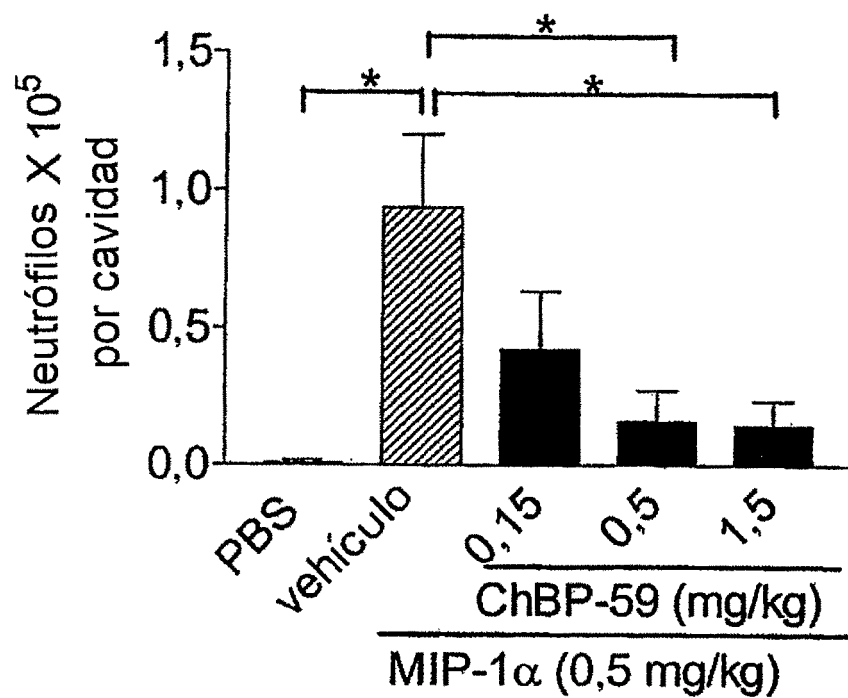
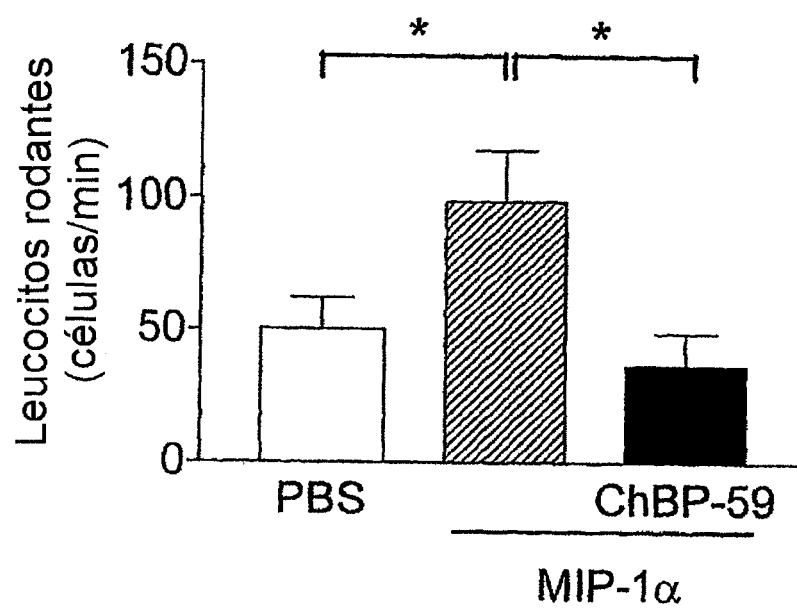
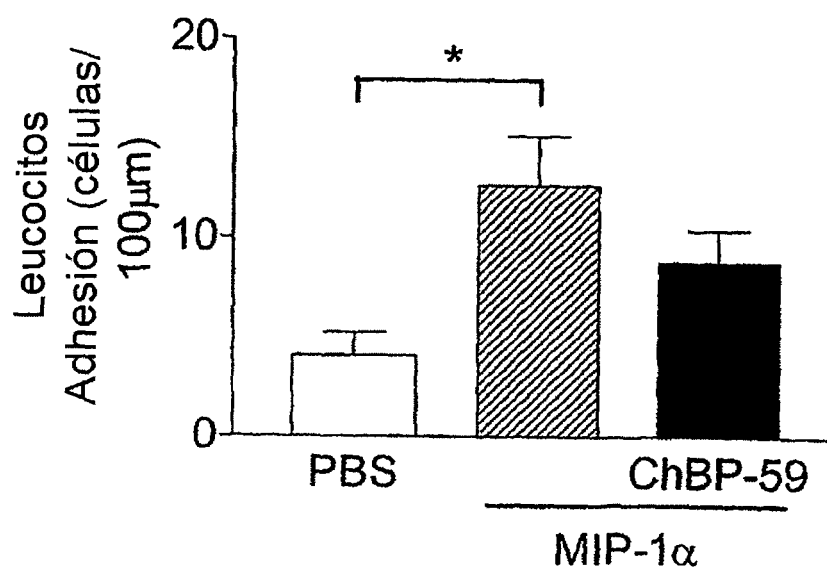
B

Figura 10

A



B



C

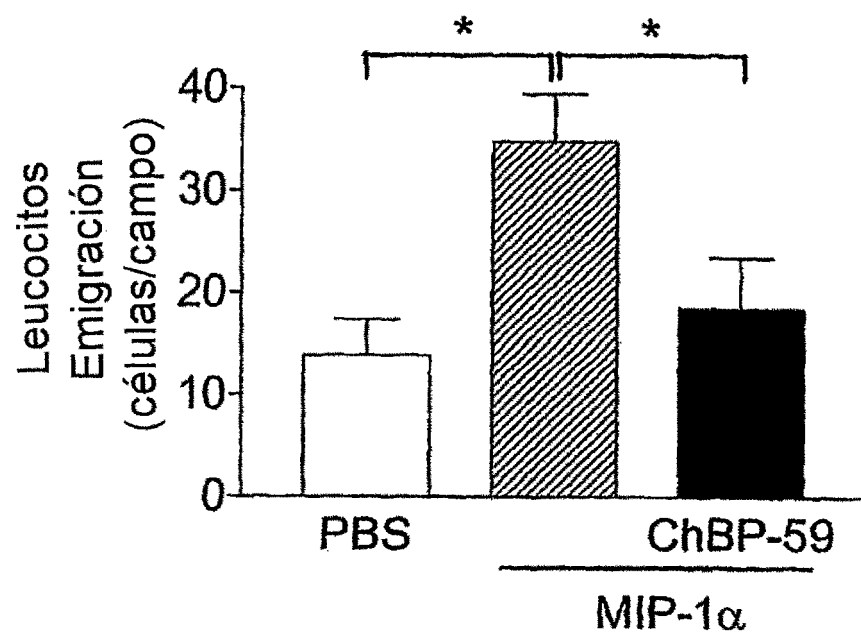
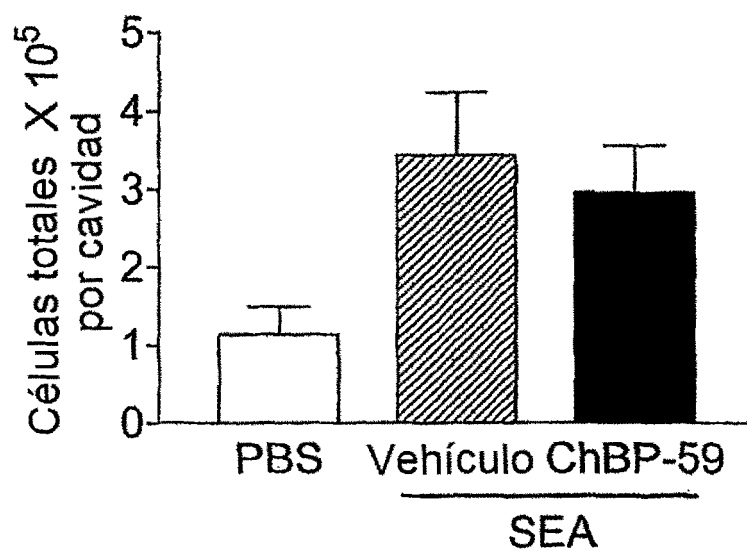
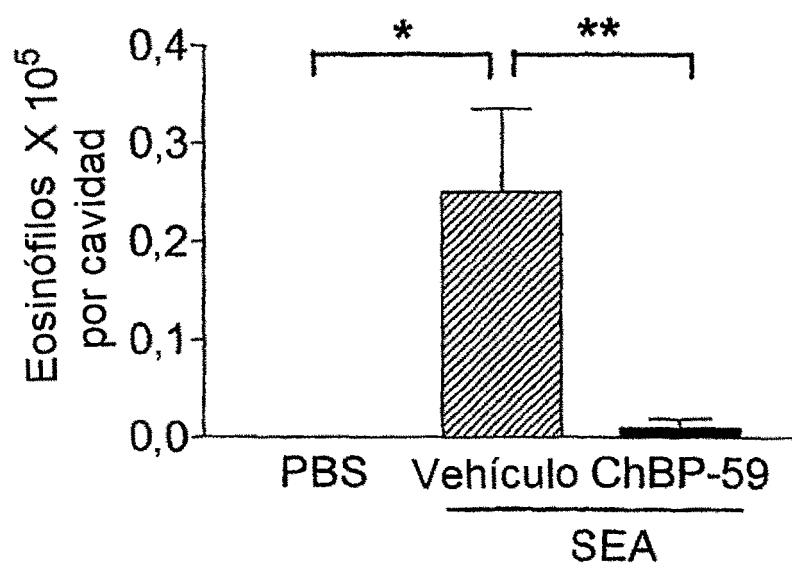


Figura 11

A



B



C

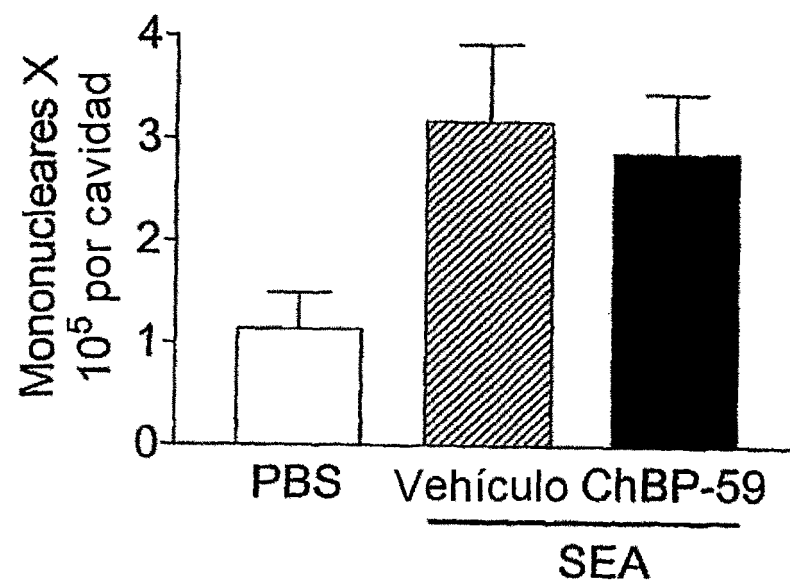
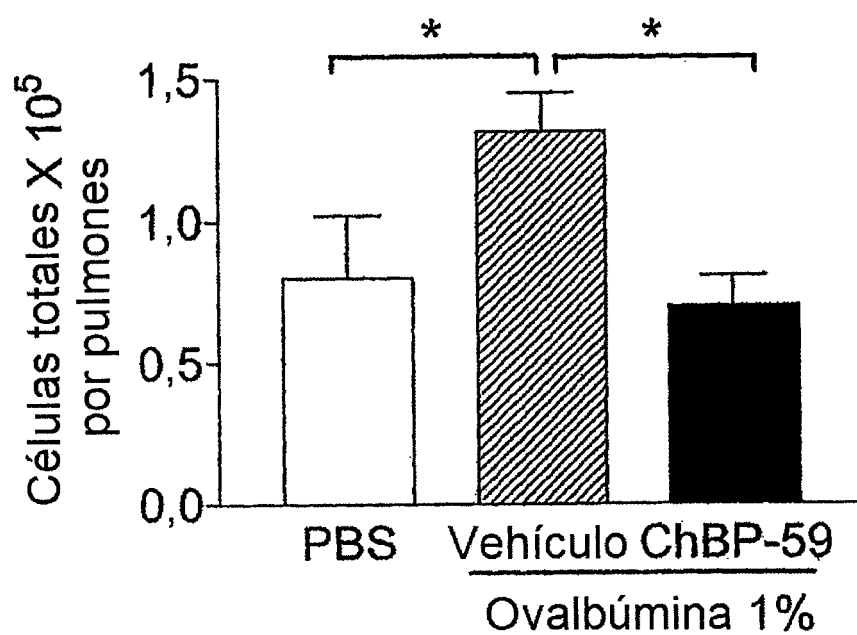
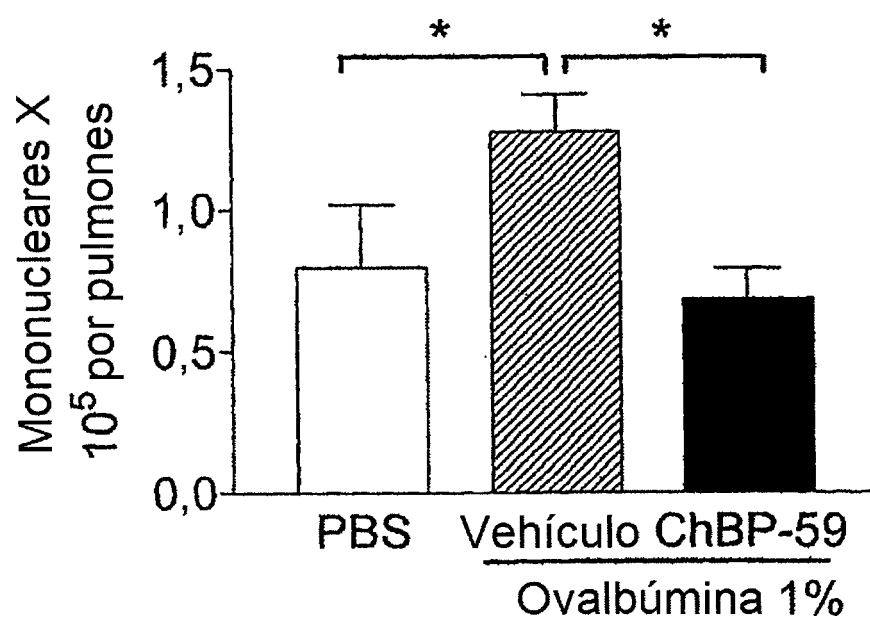


Figura 12

A



B



C

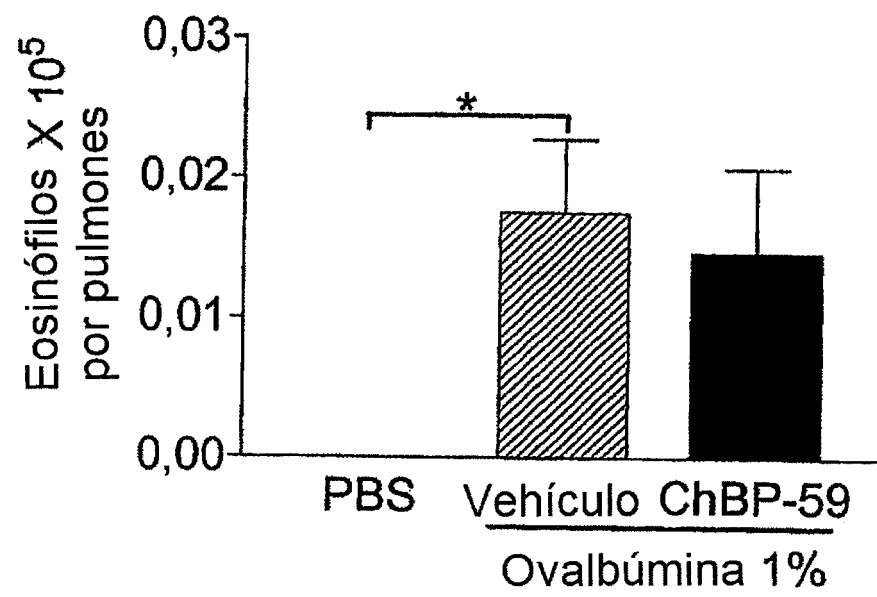
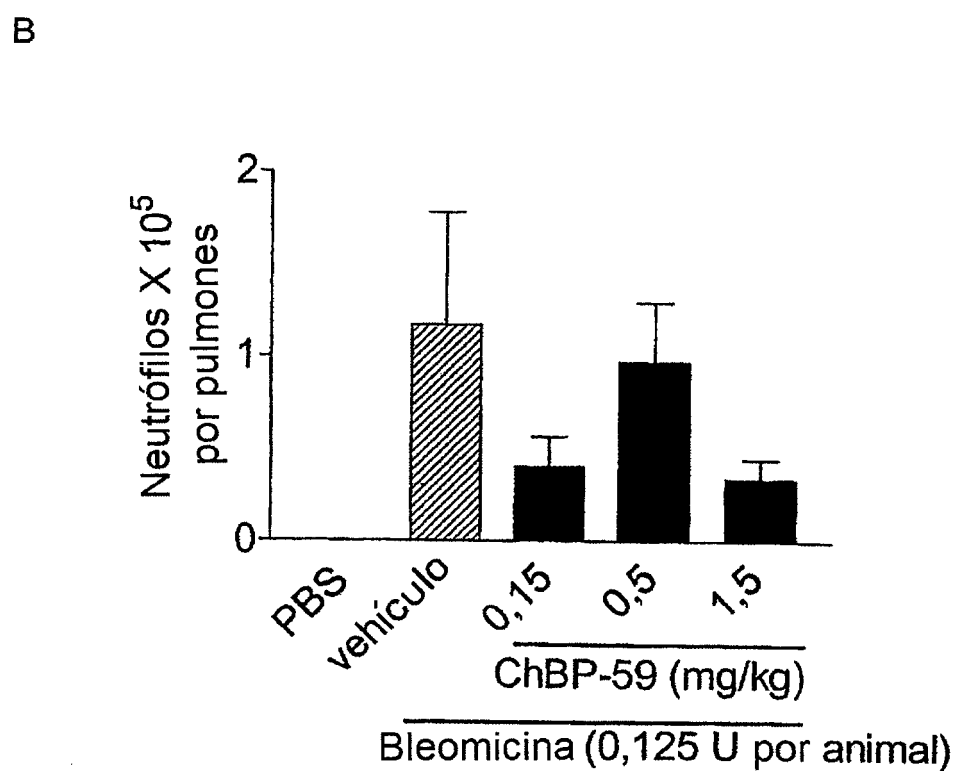
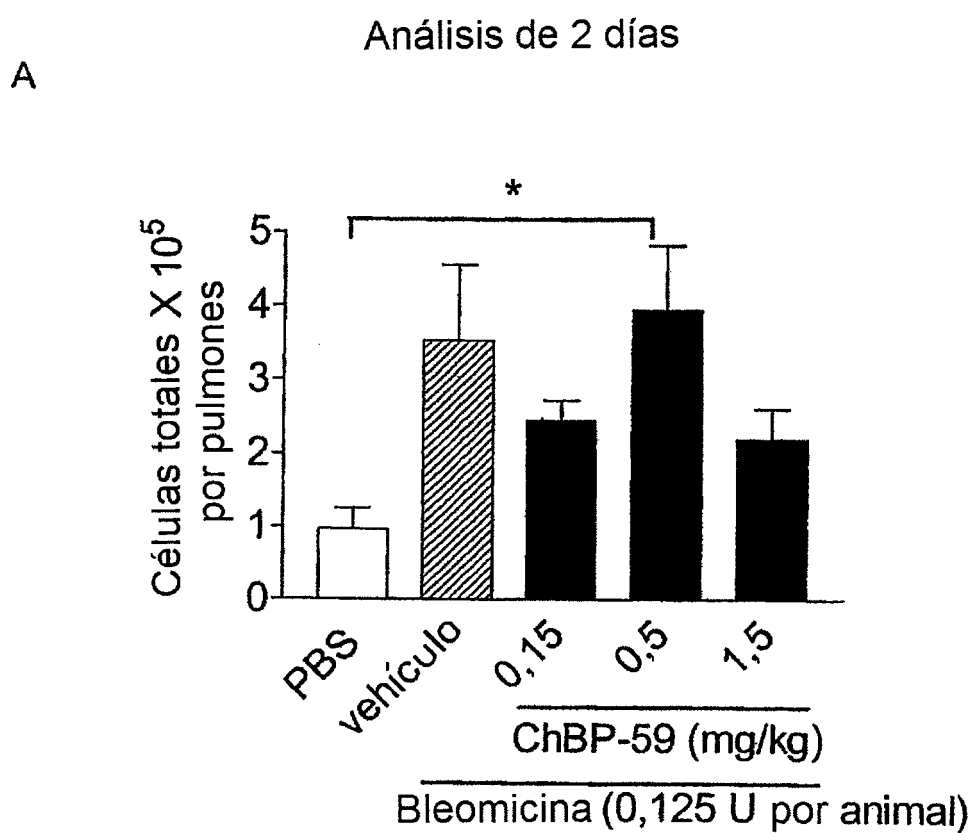


Figura 13



C

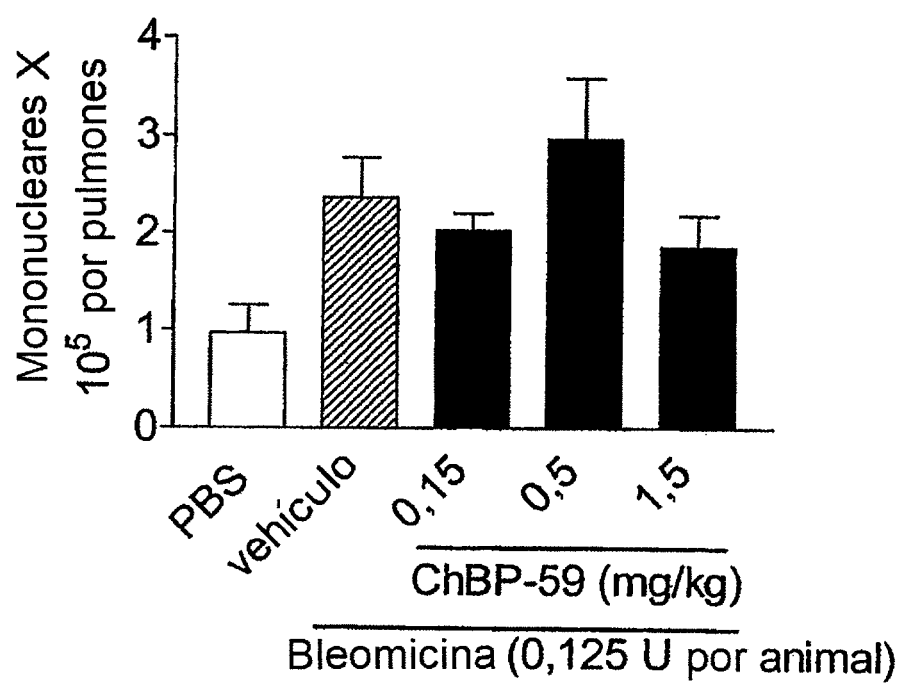
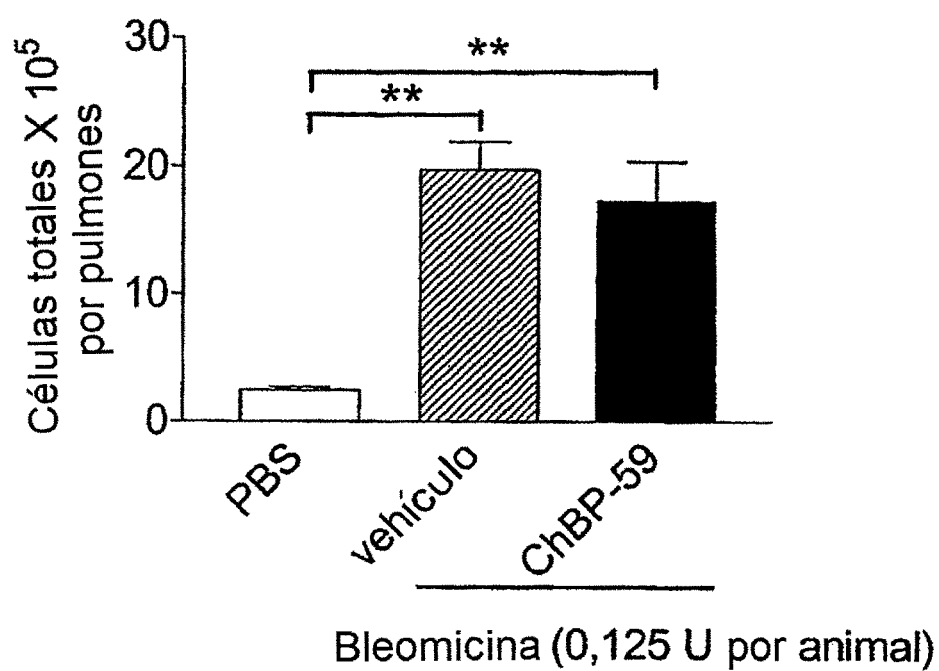


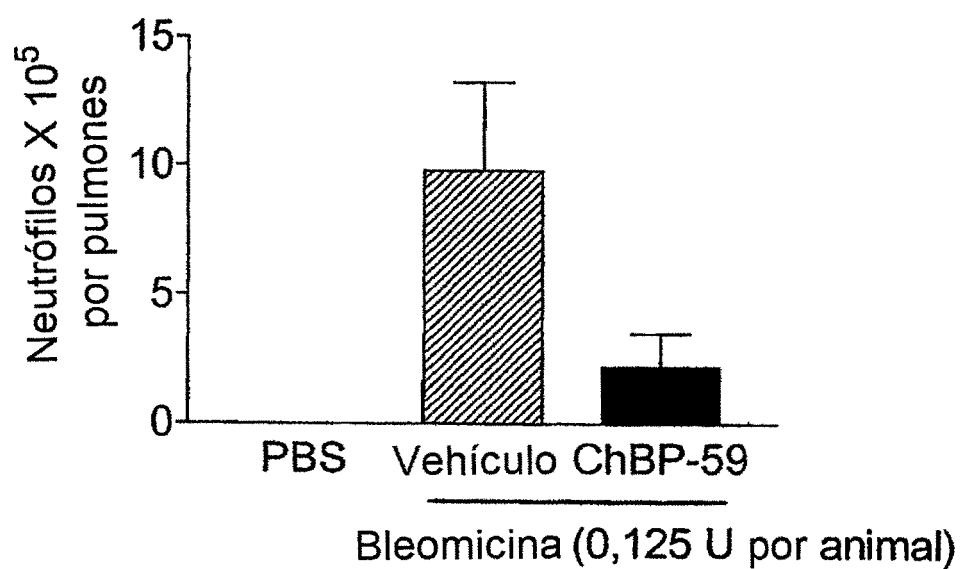
Figura 13 Continuación

Análisis de 8 días

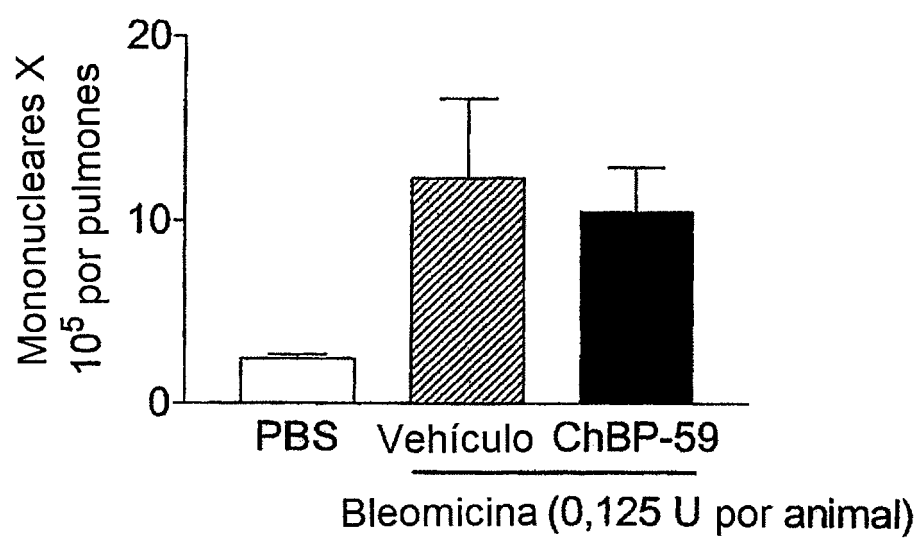
A



B



C



ES 2 321 122 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.
 5 <120> NUEVAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A LAS QUIMIOCINAS CC
 <130> WO1015
 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.1
 10 <210> 1
 <211> 247
 <212> PRT
 15 <213> *Ectromelia virus*
 <400> 1

 20 Met Lys Gln Tyr Ile Val Leu Ala Cys Ile Cys Leu Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15

 25 Ile Pro Thr Ser Leu Gln Gln Ser Phe Ala Ser Ser Cys Thr Glu Glu
 20 25 30

 30 Glu Asn Asn His His Met Gly Ile Asp Val Ile Ile Lys Val Thr Lys
 35 40 45

 35 Gln Asp Gln Thr Pro Thr Asn Asp Lys Ile Cys Gln Ser Val Thr Glu
 50 55 60

 40 Val Thr Glu Ser Glu Asp Asp Gly Val Ser Glu Glu Val Val Lys Gly
 65 70 75 80

 45 Asp Pro Thr Thr Tyr Tyr Thr Val Val Gly Gly Gly Leu Arg Met Asn
 85 90 95

 50 Phe Gly Phe Thr Lys Cys Pro Gln Ile Lys Ser Ile Ser Glu Ser Ala
 100 105 110

 55 Asp Gly Asn Thr Val Asn Ala Arg Leu Ser Ser Val Ser Pro Met Tyr
 115 120 125

 60 Gly Ile Glu Ser Pro Ala Ile Thr His Glu Glu Ala Leu Ala Met Ile
 130 135 140

 65

ES 2 321 122 T3

Asn Asp Cys Ala Val Ser Ile Asn Ile Lys Cys Ser Glu Glu Glu Lys
145 150 155 160

5

Asp Ser Asn Ile Lys Thr His Pro Val Leu Gly Ser Asn Ile Ser His
165 170 175

10

Lys Lys Val Arg Tyr Glu Asp Ile Ile Gly Ser Thr Ile Val Asp Ile
180 185 190

15

Lys Cys Val Lys Asp Leu Glu Phe Ser Val Arg Ile Gly Asp Met Cys
195 200 205

20

Lys Glu Ala Ser Glu Leu Glu Val Lys Asp Gly Phe Lys Tyr Ile Asp
210 215 220

25

Gly Ser Val Ser Glu Gly Ala Thr Asp Asp Thr Ser Leu Ile Asp Ser
225 230 235 240

Thr Lys Leu Lys Ala Cys Val
245

30

<210> 2

<211> 744

<212> DNA

35

<213> *Ectromelia virus*

<400> 2

40

atgaaacaat atatcgctcct ggcattgcata tgccctggcgg cagctgctat ccctaccagt 60

cttcagcaat cattcgcac ctcgtgtacg gaagaagaaa acaaccatca tatgggaatc 120

45

gatgttatta tcaaagtcac caagcaagac caaacaccga ctaatgataa gatttgtcaa 180

tcagtaaccg aagttacaga gtctgaagac gatgggggat ccgaagaagt cgtaaaagga 240

gatcccacca cttattacac tgctcgtcggg ggagggtctga gaatgaactt tggattcacc 300

50

aaatgtcctc agattaaatc catctcagaa tccgctgatg gaaacacagt gaatgctcgg 360

ttgtctagcg tctctccaat gtacggcatt gaatctccag ccatcactca tgaagaagct 420

55

cttgctatga tcaacgactg tgcgggtgtct atcaatatca aatgtagtga agaagagaaa 480

gacagcaaca tcaagacca tccagtactc ggggtctaaca tctctcataa gaaagtgagg 540

60

tacgaagata tcatcggttc aacgatcgtc gatataaaat gtgtcaagga tctagagttt 600

agcgttcgta tcggagacat gtgcaaggaa gcatctgaac ttgaagtcaa ggatggattc 660

aagtatatcg acggatcggg atctgaagggt gcaaccgatg atacttcact catcgattca 720

65

acaaaactca aagcgtgtgt ctga 744

ES 2 321 122 T3

<210> 3

<211> 460

<212> DNA

5 <213> *Rhipicephalus sanguineus*

<400> 3

```

10      ggccattacg gccgggggca catccacagg ttcagtatta gctgattgac gtogttagtg      60
      gaattcaact tgttttagcac tatgacgttt aaggcttgca ttgccatcat aactgcactt      120
15      tgtgcaatgc aagttatatg tgaagatgat gaagattatg gagacttagg aggatgccca      180
      ttttttagttg ctgagaataa aacaggggtac ccgacaatcg tggcgtgtaa acaagactgc      240
20      aatggtacaa ccgagactgc tccaaacggc acacgttgct tttcgattgg tgatgaagga      300
      ctcagaagaa tgacggcaaa ccttccttac gactgccctc taggacaatg cagtaatgga      360
      gactgcattc ccaaggaaac atacgaggta tgctacagac gcaattggcg agacaagaag      420
25      aattaagaat gacctgattc ctggaaaaaa aaaaaaaaaa      460

```

30 <210> 4

<211> 342

<212> DNA

35 <213> *Rhipicephalus sanguineus*

<400> 4

```

40      atgacgttta aggcttgcat tgccatcata actgcacttt gtgcaatgca agttatatgt      60
      gaagatgatg aagattatgg agacttagga ggatgcccat ttttagttgc tgagaataaaa      120
45      acaggggtacc cgacaatcgt ggcgtgtaaa caagactgca atggtacaac cgagactgct      180
      ccaaacggca cacgttgctt ttcgattggg gatgaaggac tcagaagaat gacggcaaac      240
50      cttccttacg actgccctct aggacaatgc agtaatggag actgcattcc caaggaaaca      300
      tacgagggtat gctacagacg caattggcga gacaagaaga at      342

```

55 <210> 5

<211> 114

<212> PRT

60 <213> *Rhipicephalus sanguineus*

65

ES 2 321 122 T3

<400> 5

5 Met Thr Phe Lys Ala Cys Ile Ala Ile Ile Thr Ala Leu Cys Ala Met
1 5 10 15

10 Gln Val Ile Cys Glu Asp Asp Glu Asp Tyr Gly Asp Leu Gly Gly Cys
20 25 30

15 Pro Phe Leu Val Ala Glu Asn Lys Thr Gly Tyr Pro Thr Ile Val Ala
35 40 45

20 Cys Lys Gln Asp Cys Asn Gly Thr Thr Glu Thr Ala Pro Asn Gly Thr
50 55 60

25 Arg Cys Phe Ser Ile Gly Asp Glu Gly Leu Arg Arg Met Thr Ala Asn
65 70 75 80

30 Leu Pro Tyr Asp Cys Pro Leu Gly Gln Cys Ser Asn Gly Asp Cys Ile
85 90 95

35 Pro Lys Glu Thr Tyr Glu Val Cys Tyr Arg Arg Asn Trp Arg Asp Lys
100 105 110

Lys Asn

<210> 6

<211> 94

<212> PRT

<213> *Rhipicephalus sanguineus*

<400> 6

45 Glu Asp Asp Glu Asp Tyr Gly Asp Leu Gly Gly Cys Pro Phe Leu Val
1 5 10 15

50 Ala Glu Asn Lys Thr Gly Tyr Pro Thr Ile Val Ala Cys Lys Gln Asp
20 25 30

55 Cys Asn Gly Thr Thr Glu Thr Ala Pro Asn Gly Thr Arg Cys Phe Ser
35 40 45

60 Ile Gly Asp Glu Gly Leu Arg Arg Met Thr Ala Asn Leu Pro Tyr Asp
50 55 60

65 Cys Pro Leu Gly Gln Cys Ser Asn Gly Asp Cys Ile Pro Lys Glu Thr
65 70 75 80

70 Tyr Glu Val Cys Tyr Arg Arg Asn Trp Arg Asp Lys Lys Asn
85 90

ES 2 321 122 T3

	<210> 7	
	<211> 39	
	<212> DNA	
5	<213> Constructo sintético	
	<400> 7	
10	aagcaggctt cgccaccatg acgtttaagg ctgcattg	39
	<210> 8	
	<211> 37	
15	<212> DNA	
	<213> Constructo sintético	
	<400> 8	
20	gtgatgggtga tggatgattct tctgtctcgc ccaattg	37
	<210> 9	
25	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> Constructo sintético	
30	<400> 9	
	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgccacc	37
35	<210> 10	
	<211> 51	
	<212> DNA	
40	<213> Constructo sintético	
	<400> 10	
45	ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt tcaatgggtga tggatgatgt g	51
	<210> 11	
	<211> 20	
50	<212> DNA	
	<213> Constructo sintético	
	<400> 11	
55	gccagcttgg cacttgatgt	20
	<210> 12	
60	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Constructo sintético	
65	<400> 12	
	gatggaggtg gacgtgtcag	20

ES 2 321 122 T3

	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Constructo sintético	
	<400> 13	
10	tctctacgg caaggtgctg	20
	<210> 14	
	<211> 20	
15	<212> DNA	
	<213> Constructo sintético	
	<400> 14	
20	aagcaagtaa aacctctaca	20
	<210> 15	
25	<211> 430	
	<212> DNA	
	<213> Constructo sintético	
30	<400> 15	
35	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgccaccatg acgtttaagg cttgcattgc	60
	catcataact gcactttgtg caatgcaagt tatatgtgaa gatgatgaag attatggaga	120
	cttaggagga tgcccatttt tagttgctga gaataaaaca gggtagccga caatcgtggc	180
40	gtgtaaacia gactgcaatg gtacaaccga gactgctcca aacggcacac gttgcttttc	240
	gattgggtgat gaaggactca gaagaatgac ggcaaaccctt ccttacgact gccctctagg	300
45	acaatgcagt aatggagact gcattcccaa ggaaacatac gaggtatgct acagacgcaa	360
	ttggcgagac aagaagaatc accatcacca tcaccattga aaccagctt tcttgtaaa	420
50	agtgggtcccc	430
	<210> 16	
55	<211> 360	
	<212> DNA	
	<213> Constructo sintético	
60		
65		

ES 2 321 122 T3

<400> 16

```

5      atgacgttta aggcttgcat tgccatcata actgcacttt gtgcaatgca agttatatgt      60
      gaagatgatg aagattatgg agacttagga ggatgcccac ttttagttgc tgagaataaa      120
      acaggggtacc cgacaatcgt ggcgtgtaaa caagactgca atggtacaac cgagactgct      180
10     ccaaaccggca cacgttgctt ttcgattggt gatgaaggac tcagaagaat gacggcaaac      240
      cttccttacg actgccctct aggacaatgc agtaatggag actgcattcc caaggaaaca      300
15     tacgaggtat gctacagacg caattggcga gacaagaaga atcaccatca ccatcaccat      360

```

<210> 17

20 <211> 120

<212> PRT

<213> Constructo sintético

25 <400> 17

```

30     Met Thr Phe Lys Ala Cys Ile Ala Ile Ile Thr Ala Leu Cys Ala Met
      1          5          10          15

      Gln Val Ile Cys Glu Asp Asp Glu Asp Tyr Gly Asp Leu Gly Gly Cys
35     20          25          30

      Pro Phe Leu Val Ala Glu Asn Lys Thr Gly Tyr Pro Thr Ile Val Ala
40     35          40          45

      Cys Lys Gln Asp Cys Asn Gly Thr Thr Glu Thr Ala Pro Asn Gly Thr
45     50          55          60

      Arg Cys Phe Ser Ile Gly Asp Glu Gly Leu Arg Arg Met Thr Ala Asn
50     65          70          75          80

      Leu Pro Tyr Asp Cys Pro Leu Gly Gln Cys Ser Asn Gly Asp Cys Ile
55     85          90          95

      Pro Lys Glu Thr Tyr Glu Val Cys Tyr Arg Arg Asn Trp Arg Asp Lys
60     100         105         110

      Lys Asn His His His His His His
65     115         120

```

65 <210> 18

<211> 100

<212> PRT

ES 2 321 122 T3

<213> Constructo sintético

<400> 18

5	Glu Asp Asp Glu Asp Tyr Gly Asp Leu Gly Gly Cys Pro Phe Leu Val	1 5 10 15
10	Ala Glu Asn Lys Thr Gly Tyr Pro Thr Ile Val Ala Cys Lys Gln Asp	20 25 30
15	Cys Asn Gly Thr Thr Glu Thr Ala Pro Asn Gly Thr Arg Cys Phe Ser	35 40 45
20	Ile Gly Asp Glu Gly Leu Arg Arg Met Thr Ala Asn Leu Pro Tyr Asp	50 55 60
25	Cys Pro Leu Gly Gln Cys Ser Asn Gly Asp Cys Ile Pro Lys Glu Thr	65 70 75 80
30	Tyr Glu Val Cys Tyr Arg Arg Asn Trp Arg Asp Lys Lys Asn His His	85 90 95
35	His His His His	100
40		
45		
50		
55		
60		
65		