



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 320 090**

⑯ Int. Cl.:

C12N 15/19 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **01201544 .2**

⑯ Fecha de presentación : **16.05.1994**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1203775**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **08.05.2002**

④ Título: **Factor quimiotáctico de linfocitos y usos del mismo.**

⑩ Prioridad: **21.05.1993 US 68949**

⑦ Titular/es: **Trustees of Boston University
One Sherborn Street
Boston, Massachusetts 02215, US**

⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2009

⑦ Inventor/es: **Center, David M.;
Cruikshank, William W. y
Kornfeld, Hardy**

⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2009

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 320 090 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

Factor quimiotáctico de linfocitos y usos del mismo.

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere a los factores quimiotácticos de linfocitos.

La CD4, una proteína de adhesión de célula a célula, se expresa en un subgrupo de linfocitos T (Krensky *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2365-2369, 1982; Biddison *et al.*, J. Exp. Med. 156: 1065-1076, 1982; y Wilde *et al.*, J. Immunol. 131: 152-157, 1983), células mononucleares (Stewart *et al.*, J. Immunol. 136: 3773-3778, 1986), y eosinófilos (Rand *et al.*, J. Exp. Med. 173: 1521-1528, 1991). En los linfocitos, la CD4 contribuye a la señalización de receptores de antígeno (Collins *et al.*, J. Immunol. 148: 2159-2162, 1992; Anderson *et al.*, J. Immunol. 139: 678-382, 1987; Eichmann *et al.*, J. Immunol. 17: 643-650, 1987; Walker *et al.*, Eur. J. Immunol. 17: 873-880 1987; y Sleckman *et al.*, Nature 328: 351-353, 1987) mediante la interacción directa con moléculas de Clase II MHC (Doyle *et al.*, Nature 330: 256-259, 1987). Adicionalmente, una linfoquina soluble natural, el factor quimiotáctico de linfocitos (LCF), requiere la expresión en la superficie celular de CD4 para inducir actividad quimioatraventante en monocitos (Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 138: 3817-3823, 1987), eosinófilos (Rand *et al.*, J. Exp. Med. 173: 1521-1528, 1991) y linfocitos T (Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 138: 3817-3823, 1987; Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 146: 2928-2934, 1991). De acuerdo con su actividad quimiotáctica el LCF actúa como un factor de crecimiento de competencia para linfocitos T humanos (Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 138: 3817-3823, 1987).

El LCF es una glicoproteína de 56-kD catiónica que representa la forma tetramérica de cuatro cadenas monoméricas de 14-kD. Los linfocitos T producen el LCF y el mismo es específicamente quimioatraventante para las células T, monocitos y eosinófilos CD4+ (véase, por ejemplo, Berman *et al.* Cell Immunol. 95: 105-112, 1985; Rand *et al.*, JEM 173: 1521-1528, 1991). La secreción de LCF mediante células T CD8+ ocurre (Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 138: 3817, 1987) después de la estimulación mediante mitógenos, antígenos, histamina o serotonina. Los dos últimos son de interés particular porque los mastocitos y basófilos degranulados están presentes en sitios tisulares de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (véase, por ejemplo, Askenase Prog. Allergy 23: 199-320, 1977). La inducción de LCF mediante un producto de un mastocito o un basófilo proporciona un enlace entre la fase mediadora temprana de la respuesta inmune y el desarrollo de la reacción inflamatoria con predominancia de linfocitos T posterior.

Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 146. 2928-2934, 1991 también trata la producción de LCF recombinante en células COS de monos.

35 **Sumario de la invención**

En general, la invención presenta un fragmento del polipéptido factor quimiotáctico de linfocitos Recombinante (LCF), por ejemplo, el LCF producido en un sistema de expresión procariota o baculovirus.

40 “Polipéptido factor quimiotáctico de linfocitos” significa toda o parte de una proteína que se une específicamente al CD4 y señala la cascada mediada por LCF apropiada de acontecimientos biológicos, por ejemplo, un polipéptido capaz de promover o estimular la migración de linfocitos, eosinófilos, monocitos y similares inactivados o activados CD4+. “Polipéptido” significa cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación 45 después de la traducción (por ejemplo, glicosilación).

El fragmento de LCF muestra actividad agonista o antagonista de LCF y es “biológicamente activo”.

50 “Biológicamente activo” significa que posee cualquier actividad que es característica del polipéptido LCF de 130 aminoácidos mostrado en la Figura 2 (SEC ID N°: 1). Debido a que el polipéptido LCF muestra una variedad de propiedades fisiológicas y debido a que tales propiedades se pueden atribuir a partes diferentes de la molécula del polipéptido LCF, un fragmento polipeptídico LCF útil es uno que muestra una actividad biológica en cualquier ensayo biológico de actividad polipeptídica LCF, por ejemplo, los ensayos descritos en este documento. Lo más preferible es que posea el 10%, preferiblemente el 40% o al menos el 90% de la actividad del polipéptido LCF (mostrado en la Figura 2; SEC ID N°: 1), en cualquier ensayo de polipéptido LCF.

55 El fragmento de la invención como una secuencia de aminoácidos como se presenta en los aminoácidos 115-130 ó 116-130 de SEC ID N°: 1 un aminoácido por otro con características similares (por ejemplo, glicina por valina, lisina por arginina y similares) o por una o más sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos no conservativas que no suprimen la actividad biológica del polipéptido. Otras modificaciones útiles incluyen las que aumentan la estabilidad peptídica; tales análogos pueden contener, por ejemplo, una o más uniones no peptídicas (que reemplazan las uniones peptídicas) o D-aminoácidos en la secuencia peptídica.

60 Los análogos pueden diferir de los polipéptidos LCF de origen natural en la secuencia de aminoácidos o pueden estar modificados en modos que no implican la secuencia o ambos. Los análogos de la invención generalmente mostrarán una homología de al menos el 70%, más preferiblemente el 80%, más preferiblemente el 90% y lo más preferible es que sea del 95% o incluso del 99% con un segmento de 20 residuos de aminoácidos, preferiblemente más de 40

residuos de aminoácidos o más preferiblemente la secuencia entera de una secuencia polipeptídica LCF de origen natural.

Las alteraciones en la secuencia primaria incluyen variantes genéticas, tanto naturales como inducidas. También se incluyen los análogos que incluyen residuos diferentes a los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos que no son de origen natural o sintéticos, por ejemplo, β y γ aminoácidos. Alternativamente, se puede conferir estabilidad aumentada mediante la ciclización de la molécula peptídica. Las modificaciones incluyen la derivatización química *in vivo* o *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, metilación, fosforilación, prenilación, isoprenilación, miristilación, carboxilación o glicosilación; la glicosilación se puede modificar, por ejemplo, modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales, por ejemplo, exponiendo el polipéptido a glicosilación que influye en enzimas obtenidas a partir de células que normalmente proporcionan tal procesamiento, por ejemplo, enzimas de glicosilación de mamíferos; la fosforilación se puede modificar exponiendo el polipéptido a enzimas de alteración de la fosforilación, por ejemplo, quinasas o fosfatasas, etc. “Sustancialmente puro” significa que el polipéptido LCF que se proporciona mediante la invención está libre de proteínas y moléculas orgánicas de origen natural al menos en el 60% en peso, con las que se asocia naturalmente. Preferiblemente, la preparación tiene un contenido de polipéptido LCF de al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferible es que sea al menos el 99% en peso. Se puede obtener un polipéptido LCF sustancialmente puro, por ejemplo, por extracción a partir de una fuente natural (por ejemplo, una célula mononuclear de sangre periférica de humano) usando los métodos descritos más adelante o se puede aislar mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido LCF usando las técnicas convencionales de tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, mediante aislamiento de ADNc o ADN genómico que codifica un polipéptido LCF de este tipo o sintetizando químicamente la proteína, fragmento o análogo del mismo. La pureza se puede medir mediante un método apropiado, por ejemplo, análisis de cromatografía en columna, de electroforesis en gel de poliacrilamida o de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

En otro aspecto, la invención presenta ADN sustancialmente puro que codifica un polipéptido LCF (o fragmento polipeptídico o análogo del mismo) como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, el ADN comprende una secuencia nucleotídica sustancialmente idéntica a la secuencia nucleotídica mostrada en la Figura 2 (SEC ID Nº: 2). Además, un ADN de este tipo es un ADNc y codifica un polipéptido LCF de mamífero, por ejemplo, un ser humano. La invención también presenta un vector que incluye tal ADN sustancialmente puro y que es capaz de dirigir la expresión de la proteína codificada por el ADN en una célula que contiene vector. La invención presenta una célula que contiene el ADN sustancialmente puro. La célula puede ser procariota, por ejemplo, *E. coli*.

En incluso otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo sustancialmente puro que se une preferiblemente a un fragmento de LCF que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 115-130 ó 116-130 de la SEC ID Nº: 1.

“Anticuerpo sustancialmente puro”, significa un anticuerpo que está libre de las proteínas y moléculas orgánicas de origen natural en al menos el 60%, en peso, con las que está asociado naturalmente. Preferiblemente, la preparación tiene un contenido de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo LCF de al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 90% y más preferiblemente al menos el 99% en peso. Se puede obtener un anticuerpo LCF sustancialmente puro, por ejemplo, mediante cromatografía por afinidad usando un polipéptido LCF producido recombinantemente y por técnicas convencionales. Adicionalmente, el anticuerpo purificado está suficientemente libre de otras proteínas, carbohidratos y lípidos con los que está naturalmente asociado para permitir la administración terapéutica. Un anticuerpo de este tipo “se une preferiblemente” al fragmento polipeptídico de LCF (o un fragmento o análogo del mismo), es decir, no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas no relacionadas antigenéticamente.

Preferiblemente, el anticuerpo neutraliza la actividad biológica de la proteína a la cual se une. “Neutraliza” significa que bloquea parcialmente o completamente (por ejemplo, la actividad biológica de un polipéptido LCF).

En otros aspectos, los polipéptidos o anticuerpos descritos anteriormente se usan como el ingrediente activo de composiciones terapéuticas. En tales composiciones terapéuticas, el ingrediente activo se formula con un vehículo fisiológicamente aceptable. Estas composiciones terapéuticas se usan en un método para suprimir o mimetizar la respuesta fisiológica mediada por la interacción de LCF-CD4. En particular, estos métodos se usan para reducir una respuesta inmune y/o inflamación. Los compuestos útiles en la práctica del método incluyen, sin limitación, un anticuerpo de fragmento de LCF o un fragmento de LCF o un fármaco y un compuesto orgánico.

La invención proporciona uso del fragmento de LCF o anticuerpo de fragmento en la preparación de un medicamento para el tratamiento de reacciones inmunes de hipersensibilidad y/o inflamación.

Se pretende que las proteínas de la invención se involucren en acontecimientos que conduzcan a inducir la migración de células inmunes especializadas, por ejemplo, eosinófilos, monocitos y linfocitos T, que son constituyentes y mediadores importantes tanto de la respuesta inmune como de la inflamación. Por lo tanto, tales proteínas son útiles para tratar o, alternativamente, para desarrollar medicamentos para tratar reacciones inmunes de hipersensibilidad e inflamación que conciernen a la activación e infiltración posterior de linfocitos T, monocitos y eosinófilos. Los trastornos particulares que se pueden tratar usando las proteínas de la presente invención incluyen, sin limitación, cualquier reacción inmune granulomatosa, por ejemplo, como las producidas por parásitos helmintos invasivos de tejidos, reacciones cutáneas de fase tardía y respiratorias a alérgenos, asma, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis

5 pulmonar intersticial, tuberculosis, artritis reumatoide y lupus eritematoso, rechazo de transplantes de órganos alogenicos, dermatitis por contacto (mediada por células) y enfermedades de la piel inmunológicamente mediadas (por ejemplo penfigoide y penfigoide bulloso). Se puede encontrar un texto exhaustivo sobre los trastornos mencionados anteriormente en Principles of Internal Medicine 12ava. ed. (Wilson *et al.*, McGraw Hill, Inc., N.Y.). Los medicamentos preferidos incluyen antagonistas, por ejemplo, fragmentos peptídicos o anticuerpos o fármacos, que bloquean la función de LCF o de LCF:receptor CD4 interfiriendo con la interacción de LCF:receptor CD4 y cualquier actividad biológica concomitante dirigida por LCF.

10 El fragmento de LCF recombinante también se puede usar como un agente inmunosupresor o como parte de terapia inmunosupresora. En particular, el fragmento de LCF recombinante puede servir para atenuar, interrumpir o evitar la cascada de acontecimientos que eventualmente dan como resultado el rechazo inmunológico de transplantes de tejidos u órganos. Por ejemplo, se puede usar el fragmento de LCF recombinante para atenuar, interrumpir o evitar que un paciente rechace un transplante de riñón, pulmón o transplante combinado de corazón y pulmón o de hígado. Además, el fragmento de LCF recombinante puede ser útil en el diseño de inmunotoxinas que destruyen selectivamente células 15 que portan el receptor CD4+ debido a su capacidad de interactuar y unirse a receptores CD4. Finalmente, el fragmento LCF recombinante se puede usar, solo o en combinación con otros compuestos (por ejemplo factores de crecimiento), para activar y reponer una población de linfocitos CD4 en cualquier paciente con una población disminuida.

20 Otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la descripción siguiente de las realizaciones preferidas de la misma y a partir de las reivindicaciones.

Descripción detallada de los dibujos de las realizaciones preferidas

25 En primer lugar se describirán los dibujos.

La Figura 1 muestra un análisis Northern de LCF a partir de ARN celular total preparado a partir de linfocitos T humanos. Las posiciones de ARN 18S y 28S visualizadas mediante la tinción de bromuro de etidio se muestran en sus flechas respectivas.

30 La Figura 2 muestra la secuencia nucleotídica del ADNc LCF-A (SEC ID N°: 2) y la secuencia de aminoácidos pronosticada de la proteína codificada (SEC ID N°: 1). Los nucleótidos están numerados en el lado izquierdo comenzando con el primer nucleótido del ADNc. El extremo poli A comienza inmediatamente después del último nucleótido indicado (2152) y está omitido. La traducción de la secuencia que codifica LCF putativa se indica debajo de la secuencia nucleotídica correspondiente comenzando con Met. Cada aminoácido está numerado consecutivamente. Un 35 residuo Asn (residuo aminoácido 5) representa un sitio de glicosilación potencial (marcado con un punto). Se subrayan dos secuencias de señal de poliadenilación candidatas.

40 La Figura 3A y la Figura 3B muestran una SDS-PAGE de LCF recombinante expresado en *E. coli* y una traducción *in vitro* de reticulocitos de conejo de ARN sintetizado a partir de ADNc LCF. La Figura 3A muestra una secuencia de proteína LCF recombinante en una SDS-PAGE al 15% seguido de tinción de azul de coomassie. En la Figura 3A, el carril A muestra el sobrenadante bruto a partir de *E. coli* inducida para expresar la proteína LCF, el carril B muestra la proteína LCF generada como una proteína de fusión conjugada a un enlazante de polihistidina purificado por cromatografía de afinidad al níquel y el carril C muestra LCF después de la escisión del Factor Xa. La banda en 17,5 kDa se transfirió, suprimió y sometió a secuenciación de aminoácidos N-terminal. La Figura 3B muestra una 45 traducción *in vitro* de reticulocitos de conejo de ADNc LCF: el producto de proteína marcado con ³⁵S de ADNc LCF traducido por los reticulocitos de conejo se desarrolló en una SDS-PAGE al 15%. En la Figura 3B, el carril A muestra proteína LCF traducida en condiciones de no glicosilación y el carril B muestra LCF traducido en condiciones de glicosilación.

50 La Figura 4 muestra la inmunoprecipitación de LCF recombinante mediante CD4rs. En la Figura 4, el carril 1 muestra 10 µg de LCF recombinante; el carril 2 muestra LCF recombinante incubado con 50 µg de CD4rs inmunoprecipitado con 10 µg de anticuerpo anti CD4 políclonal de conejo; el carril 3 muestra LCF recombinante incubado con 10 µg de CD4rs inmunoprecipitado con anticuerpo anti CD4 políclonal; el carril 4 muestra LCF recombinante incubado con CD4rs (10 µg) inmunoprecipitado con anti IgG políclonal de conejo (10 µg); el carril 5, muestra LCF 55 recombinante incubado con CD4rs e inmunoprecipitado con anti CD4 monoclonal (10 µg); el carril 6 muestra LCF recombinante incubado con CD4rs e inmunoprecipitado con anticuerpo anti CD8 monoclonal (10 µg) y el carril 7, muestra CD4rs (10 µg) incubado con anticuerpo anti CD8 monoclonal.

60 La Figura 5 muestra una curva dosis respuesta de quimiotaxis inducida por LCF recombinante de linfocitos T de sangre periférica humana. En la Figura 5, un asterisco (*) representa la significancia estadística en el p < 0,05 (usando un ensayo T de Student a partir de migración celular control).

65 La Figura 6 muestra quimiotaxis inducida por LCF recombinante en células de hibridoma de células T murinas. Las líneas celulares murinas que expresan CD4 de tipo silvestre (13.13), CD4 truncado (delta-13) o células sin infectar que carecen de expresión de CD4 (155.16) se estimularon mediante LCF recombinante (10⁻⁹ M) (barras abiertas) o anticuerpo 2C11 (10 µg/ml) (barras con rayas horizontales) y se cuantificó la respuesta migratoria. También se muestran (barras sólidas) las células estimuladas mediante LCF recombinante en presencia de un exceso de 100 veces de fragmentos Fab anti-CD4 (10 µg/ml). La migración celular se expresa como la media de diez campos de gran

ES 2 320 090 T3

aumento +/- D.T.. La migración que fue significativamente diferente ($p < 0,05$ mediante el ensayo de T de Student) de la migración celular control (designada como el 100%) se indica mediante asteriscos.

- La Figura 7 muestra la especificidad del LCF recombinante para las células T humanas CD4+ usando análisis FAC.
- 5 Se cultivaron dos $\times 10^6$ linfocitos T humanos durante 24 y 48 horas en presencia de LCF recombinante 10^{-3} M. Las células marcadas dos veces con anticuerpo anti CD4 conjugado con ficoeritrina y anticuerpo anti-IL-2R conjugado con fluoresceína se analizaron en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACscan. El LCF recombinante indujo un aumento en las células CD4+/IL-2R⁺ a partir de un nivel control del 3% (panel superior) al 17% (panel inferior) por 48 horas. El punto de tiempo de 24 horas demostró un aumento de las células del 9%. En ningún momento las células 10 CD4⁻ muestran un aumento en la expresión de IL-2R. Este es un análisis FAC representativo de tres experimentos diferentes. Otros experimentos demostraron aumentos en las células IL-2R⁺ en el punto de tiempo de 48 horas en el 15% y el 19% de las células.

La Figura 8A y la Figura 8B muestran la acumulación de LCF recombinante en condiciones fisiológicas. La 15 Figura 8A muestra una HPLC de tamizado molecular de LCF recombinante marcado con ³⁵S (desarrollado en solución salina tamponada con fosfato, pH 8,0). Las fracciones se recolectaron y analizaron mediante recuento de centelleo (cuadrados abiertos). Se recolectaron muestras paralelas y se ensayaron para la inducción de quimiotaxis de linfocitos (cuadrados sólidos). En la Figura 8B, el carril A y el carril B muestran un autorradiograma de la fracción pico tanto para la radiactividad como para la migración celular (fracción 13 mostrada en la Figura 8A) y el segundo pico de 20 radiactividad que no tuvo actividad quimioatrayente correspondiente (fracción 17 mostrada en la Figura 8A) después de la separación mediante SDS-PAGE, respectivamente.

La Figura 9 muestra una representación de hidrofilicidad de LCF recombinante pronosticada mediante el método de Kyte y Doolittle (Kyte *et al.*, J. Molec. Bio. 157: 105-132 (1982)). Los péptidos se sintetizaron y se generaron 25 antisueros específicos antipeptídicos de conejo para cuatro regiones hidrófilas fundamentales denominadas A, B, C y D.

Polipéptidos LCF

30 Los polipéptidos LCF (el polipéptido LCF de longitud completa se describe en la Figura 2, SEC ID N°: 1) se pueden obtener a partir de cualquier fuente. Estos polipéptidos se usan, por ejemplo, para detectar antagonistas que interrumpen una interacción de LCF:receptor CD4 o una respuesta fisiológica mediada por LCF (véase más adelante). Los fragmentos de LCF son antagonistas candidatos útiles de actividad de LCF:receptor CD4. La eficacia de un antagonista de fragmento de LCF depende de su capacidad para interaccionar con CD4; una interacción de este tipo 35 se puede ensayar fácilmente usando cualquier cantidad de métodos de unión convencionales y ensayos funcionales de receptor CD4 mediados por LCF (por ejemplo, los descritos más adelante).

Los fragmentos de la invención son capaces de interaccionar con el receptor CD4 y mediar la cascada biológica de LCF, es decir agonistas LCF.

40 Estos fragmentos de polipéptidos LCF específicos de interés incluyen una parte del polipéptido LCF que es capaz de interaccionar con el receptor CD4, por ejemplo, todo o parte del extremo N o por ejemplo, un dominio hidrófilo. Basado en el análisis de hidrofilicidad (véase la Figura 9) y los datos de inhibición biológica, la región D hidrófila (véase la Figura 5) es de interés.

45 Tales fragmentos pueden ser útiles como agonistas o antagonistas (como se ha descrito anteriormente) y también son útiles como inmunógenos para producir anticuerpos que neutralizan la actividad de LCF; véase más adelante).

Después se ensaya la interacción con el receptor CD4 y la capacidad de los fragmentos candidatos (por ejemplo, 50 todo o parte del Dominio D; véase, la Figura 9) de inducir una respuesta fisiológica mediada por LCF, es decir, servir como agonistas LCF, mediante ensayos descritos en este documento. También se ensaya la capacidad de los fragmentos de antagonizar la interacción entre LCF y CD4 usando los ensayos descritos en este documento. También se pueden producir análogos de fragmentos de LCF útiles (como se ha descrito anteriormente) y ensayar su eficacia como componentes de detección o antagonistas (usando los ensayos descritos en este documento); tales análogos 55 también se consideran útiles.

A continuación sigue una descripción de la clonación y caracterización de un ADNc LCF humano.

Este ejemplo se proporciona con el propósito de ilustrar la invención y no se debe considerar como limitante.

Aislamiento de ADNc LCF Humano

El gen LCF humano se aisló de la manera siguiente.

65 Se ligó una biblioteca de ADNc de células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas por mitógeno (PBMC) al vector de expresión de células COS pXM (Wong *et al.*, Science 228: 801-815, 1985). Se detectó la actividad quimioatrayente de linfocitos de los sobrenadantes de células transfectadas con plásmidos combinados usando un ensayo de cámara de Boyden modificado (Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 128: 2569-2574, 1982). Los sobrenadantes

recolectados 24 horas después de la transfección se colocaron en pocillos inferiores de microcámaras. Se determinó la migración de células T humanas a través de filtros de nitrocelulosa de $8 \mu\text{m}$ en respuesta a la presencia de estos sobrenadantes, en comparación con el sobrenadante de células COS no transfectadas (sólo vector). Adicionalmente se detectó la capacidad de los sobrenadantes con actividad quimioatraventante de inducir la expresión de IL-2R en células 5 T en reposo mediante análisis FACS de células incubadas con anticuerpo anti-Tac conjugado con fluoresceína y la capacidad de los fragmentos Fab de anticuerpo OKT4 monoclonal de bloquear esta inducción (Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 138: 3817-3723, 1987). Se detectaron siete subclonaciones diferentes, se observó que aproximadamente 10 200 clones por sobrenadante en los sobrenadantes originales que se subclonaron eran positivos. A continuación, los sobrenadantes se subclonaron secuencialmente y se diluyeron hasta que se obtuvo un clon por sobrenadante. Los criterios establecidos para la presencia de sobrenadante que contenía LCF incluían una respuesta positiva a ambos ensayos y, adicionalmente, que la actividad se pudiera bloquear mediante coincubación con fragmentos Fab generados a partir de anticuerpos OKT4 (Ortho Pharmac, Raritan, N. J.). Se aisló un clon único (LCF-7) con estas características y se secuenciaron ambas cadenas mediante el método de terminación de cadena con didesoxinucleótidos (Sanger 15 *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 74: 5463-5467, 1977). El análisis de la secuencia y la transferencia Northern (Figura 1) indicaron que el ADNc LCF-7 no era de longitud completa (correspondiente al nucleótido 441 al 1450 de la secuencia indicada). Después, el ADNc LCF-7 se usó para sondear una segunda biblioteca de ADNc PBMC humano estimulado por mitógeno ligado al bacteriófago lambda ZAP. Se detectaron 125.000 placas con LCF-7 de longitud completa. Después de la detección, se aislaron tres clones que variaban en tamaño de 0,6 a 2,2 kb. Se secuenciaron 20 ambas cadenas del clon más grande (véase la Figura 2; SEC ID Nº: 2). La secuenciación parcial de dos clones más cortos reveló que eran idénticos al LFC-A, pero prolongados incompletamente en la dirección 5'.

Como se ha descrito anteriormente, el ADNc LCF se aisló mediante la detección de una biblioteca de expresión de células COS de células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas por mitógeno (PMBC). Se evaluó la presencia de LCF de los sobrenadantes mediante la inducción de quimiotaxis de células T CD4+ humanas y los 25 cambios de ciclo celular determinados por regulaciones positivas de receptores IL-2 (IL-2R) (Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 138: 3817-3823, 1987). A continuación de cuatro rondas de detección, se identificó un sobrenadante positivo a partir de un clon único de 1-kb. El ADNc LCF se usó para sondear una transferencia northern de ARN total aislado a partir de células T humanas (Figura 1). Se detectó una banda única de 2,2-kb. Para aislar un clon de longitud completa se usó el ADNc LCF de 1-kb para sondear una segunda biblioteca de ADNc PBMC humana estimulada por mitógeno. 30 Se aislaron tres clones y la secuencia del clon más grande se muestra en la Figura 2 y SEC ID Nº: 2.

Dentro del ADNc LCF existe una fase de lectura abierta de 393 pares de bases que se prolonga desde el nucleótido 783 hasta el 1176 que codifica una proteína de 130 residuos con una masa molecular pronosticada de 13.385 daltons. La metionina en el nucleótido 783 está en buen contexto para la iniciación por análisis de Fickett (Fickett, Nucleic 35 Acids Res. 10: 5303-5318, 1982). El único otro sitio de iniciación posible se encuentra cadena abajo y está en fase de lectura, representando el residuo 38 de la secuencia de aminoácidos pronosticada. Existe un sitio de glicosilación N enlazado potencial en la serina localizada cinco residuos después de la metionina inicial. Aunque trabajos previos sugieren que el LCF nativo es una citoquina secretada (Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 128: 2569-2574, 1982), en la secuencia de aminoácidos pronosticada no hay secuencia de señal hidrófoba de consenso; sin embargo, tampoco existe 40 un dominio de transmembrana potencial. Aunque la mayoría de las citoquinas secretadas contienen una secuencia de señal, la ausencia de una secuencia de señal se ha informado tanto para la IL-1 α como para la IL-1 β secretadas. En búsquedas similares de las bases de datos de ácidos nucleicos y proteínas del Genbank no se encontró ninguna 45 secuencia relacionada. Las búsquedas de homología de ADN y proteínas se condujeron usando los programas FASTA, SEARCH, y BLAST en las bases de datos de Genbank y PIR.

45 Aislamiento y Análisis Northern de ARN

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque como se ha descrito previamente (Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 138: 3817-3823, 1987; 50 Cruikshank *et al.*, J. Immunol. 146: 2928-2934, 1991). La población de linfocitos T se purificó mediante adherencia a plástico seguida de adherencia a lana de nylon y finalmente mediante formación de rosetas y centrifugación de eritrocitos de oveja. Las células recuperadas a partir del sedimento eran linfocitos T > del 99% como se determinó mediante análisis de fluorescencia. Los monocitos se purificaron a partir de PBMC usando formación de rosetas de eritrocitos de oveja para agotar los linfocitos T, seguido de adherencia a plástico de las células restantes en el 55 sobrenadante después de la etapa de formación de rosetas. Las células adherentes recuperadas a partir de plástico eran monocitos > del 92% mediante análisis de fluorescencia. Todas las células se lisaron con isotiocianato de guanidinio 4 M frío y se aisló el ARN mediante centrifugación CsCl (Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989). Se cargaron diez μg de ARN de cada muestra en un gel de agarosa-formaldehído al 10% para electroforesis y se transfirieron a la membrana de nylon. Una sonda de ADNc de un fragmento Pst I 704 bp 60 de LCF-7 recombinante se marcó con [^{32}P]dCTP mediante el método de cebadores aleatorios (Feinberg *et al.*, Anal. Biochem. 132: 6-13, 1983) y la transferencia se hibridó con 1×10^6 cpm/ml durante 24 h. Después de la hibridación la mancha de transferencia se lavó con 0,2 X SSC (NaCl 30 mM, citrato de sodio 3 mM, pirofosfato de sodio al 0,05% y lauril sarcosina sódica al 0,1%) a 56°C y la hibridación se visualizó mediante autorradiografía. Como se muestra en la Figura 1, la sonda se hibridó específicamente a un ARN de linfocito de aproximadamente 2,2 kilobases. Esto confirmó 65 que el LCF se expresaba en los linfocitos T e indicó que el clon era de longitud completa.

Expresión y Síntesis del Polipéptido LCF

Los polipéptidos de acuerdo con la invención se pueden producir mediante transformación de una célula hospedadora adecuada con todo o parte de un fragmento de ADNc que codifica LCF (por ejemplo, el ADNc descrito anteriormente) en un vehículo de expresión adecuado.

Los especialistas en el campo de biología molecular entenderán que se puede usar cualquiera de una amplia diversidad de sistemas de expresión para proporcionar la proteína LCF recombinante. La célula hospedadora precisa usada no es crítica para la invención. El polipéptido LCF se puede producir en un hospedador procariota (por ejemplo, *E. coli*) o en un hospedador eucariota (por ejemplo, *S. cerevisiae* o células de mamífero, por ejemplo, células COS1, NIH3T3 y JEG3 o en las células de un artrópodo, por ejemplo células de *Spodoptera frugiperda* (SF9)). Tales células están disponibles a partir de una amplia variedad de fuentes (por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockland, MD; véase también, por ejemplo, Ausubel *et al.*, anteriormente). El método de transfección y la elección del vehículo de expresión dependerán del sistema de hospedador seleccionado. Los métodos de transformación y transfección se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, anteriormente; los vehículos de expresión se pueden elegir a partir de los que se proporcionan, por ejemplo, en Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P.H. Pouwels *et al.*, 1985. Supp. 1987).

Un sistema de expresión LCF preferido es un sistema de expresión procariota como el descrito por Ausubel *et al.* (anteriormente). Por tanto, se generó un fragmento de ADN que contiene la fase de lectura abierta de ADNc LCF con sitios de restricción BamH1 y Nde1 flanqueantes mediante PCR de acuerdo con los métodos convencionales y se ligó al vector de expresión de *E. coli* pT-16b (Novagen). Después este plásmido, pET-16b-ICF, se usó para transformar *E. coli* JM109. Para estimular la producción de LCF recombinante las bacterias transformadas se estimularon con IPTG, se cultivaron en medio de cultivo y posteriormente se lisaron. La proteína recombinante se aisló mediante cromatografía de quelación metálica de acuerdo con los métodos conocidos (véase, por ejemplo, Studier Meth. Enzymol. 185: 60-89, 1990). Después el LCF recombinante se sometió a SDS-PAGE (Figura 3A) y se transfirió a filtros de transferencia Problott (Applied Biosystems). Una banda prominente observada en un peso molecular aparente de 17,5 kDa se escindió y se sometió a secuenciación de aminoácidos N-terminales de acuerdo con técnicas convencionales. Se secuenciaron 25 residuos de aminoácidos en el extremo N del LCF recombinante y se observó que eran idénticos a la secuencia de aminoácidos pronosticada mostrada en la Figura 2 (SEC ID Nº: 1). Aunque la masa de SDS-PAGE de 17,5 kDa es más grande que la esperada de 13,4 kDa basada en la secuencia nucleotídica, es idéntica al patrón de migración de la proteína traducida *in vitro* marcada con ³⁵S (Figura 3B). La discrepancia en la masa determinada mediante SDS-PAGE a partir de la secuencia pronosticada se puede deber a la migración anormal de LCF recombinante en el sistema de gel de acrilamida de SDS.

Otro sistema de expresión de LCF preferido es un sistema de expresión de baculovirus como el descrito por Ausubel *et al.* (anteriormente). El ADN que codifica un polipéptido LCF se inserta en un vector de transferencia apropiado, por ejemplo, pVL1392 (Invitrogen Corp., San Diego, CA). A continuación, el vector se cotransfecta con ADN genómico de baculovirus de tipo silvestre en células de *Spodoptera frugiperda* (SF9) (Colección Americana de Cultivos Tipo Nº de Entrada: CRL 1711) y los virus recombinantes se aíslan mediante técnicas convencionales, por ejemplo, véase Ausubel *et al.* (anteriormente). Se observó que el LCF recombinante producido en un sistema de baculovirus sintetiza una proteína con un peso molecular aparente de 17,5 kDa que es similar a la proteína sintetizada usando el sistema de expresión de *E. coli* mostrado en la Figura 3A y Figura 3B. Se realizó la secuenciación de los primeros cinco residuos de aminoácidos N-terminales del LCF recombinante de baculovirus. Se observó que las secuencias eran idénticas a la secuencia de aminoácidos pronosticada mostrada en la Figura 2 (SEC ID Nº: 1) con una metionina en la posición 783 como el sitio de iniciación.

Alternativamente, se puede producir un polipéptido LCF mediante una línea celular de mamífero establemente transfectada. Están disponibles al público varios vectores adecuados para la transfección estable de células de mamífero, por ejemplo, véase Pouwels *et al.* (anteriormente); los métodos para construir tales líneas celulares también están disponibles al público, por ejemplo, véase Ausubel *et al.* (anteriormente). En un ejemplo, el ADNc que codifica el polipéptido LCF se clona en un vector de expresión que incluye el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR). La integración del plásmido y, por lo tanto, el gen codificante de LCF en el cromosoma de la célula hospedadora se selecciona mediante inclusión de metotrexato 0,01-300 μ M en el medio de cultivo celular (como se ha descrito en Ausubel *et al.*, anteriormente). Esta selección dominante se puede conseguir en la mayoría de tipos celulares. La expresión de proteína recombinante se puede aumentar mediante la amplificación mediada por DHFR del gen transfectado. Los métodos para seleccionar líneas celulares que portan amplificaciones génicas se describen en Ausubel *et al.* (anteriormente); tales métodos implican generalmente cultivo prolongado en medio que contiene niveles gradualmente crecientes de metotrexato. Los vectores de expresión que contienen DHFR comúnmente usados para este propósito incluyen pCVSEII-DHFR y pAd26SV(A) como se ha descrito en Ausubel *et al.* (anteriormente). Cualquier de las células hospedadoras descritas anteriormente o, preferiblemente, una línea celular CHO que carece de DHFR (por ejemplo, células CHO DHFR, Colección Americana de Cultivos Tipo Nº de Entrada CRL 9096) están entre las células hospedadoras preferidas para la selección de DHFR de una línea celular establemente transfectada o amplificación génica mediada por DHFR.

Una vez que el polipéptido LCF recombinante se expresa, se aísla, por ejemplo, mediante el uso de cromatografía de afinidad. En un ejemplo de trabajo, se preparó una columna de afinidad CD4 mediante el acoplamiento de CD4 soluble recombinante (CD4rs) a Sefarosa 4B CNBr de acuerdo con los métodos descritos previamente (véase, por

ejemplo, Cruikshank *et al.*, *Journal of Immunology* 1991). Por tanto, se conjugaron covalentemente 100 μ g de CD4rs a una Sefarosa 4B activada con CNBr (Pharmacia, Piscataway, NJ). A continuación, se generó un transcripto de ARN *in vitro* de LCF y se usó para la traducción *in vitro* con lisado de reticulocitos de conejo en presencia de [35 S] metionina de acuerdo con métodos convencionales. Se aplicó LCF marcado *in vitro* con 35 S a la columna durante 3 horas a 37°C, 5 tiempo en el cual la columna se lavó exhaustivamente con un tampón de lavado (Tris-Cl 0,01 M, pH 8,0, NaCl 0,14 M, NaN₃ al 0,25%, Triton X-100 al 0,5% y desoxicolato de sodio al 0,5%). El LCF se eluyó con una solución de trietanolamina (triethanolamina 50 mM, pH 11, Triton X-100 al 0,1%, NaCl 0,15 M) en tubos que contenían Tris-Cl 1 M, pH 6,7 y se analizó.

10 Una vez aislada, la proteína recombinante puede, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta eficacia. Estas técnicas generales de expresión y purificación polipeptídica también se pueden usar para producir y aislar fragmentos de LCF útiles o análogos (como se ha descrito más adelante). Además, después el elujo se puede, si se desea, desarrollar sobre una SDS-PAGE y visualizar mediante autoradiografía (véanse, por ejemplo, los resultados a partir del experimento anterior presentados en la Figura 3B).

15 Finalmente, los polipéptidos LCF, particularmente los fragmentos de LCF cortos, se pueden producir mediante síntesis química (por ejemplo, mediante el método descrito en *Solid Phase Peptide Synthesis*, 1984, 2da ed., Stewart and Young, eds., Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

20 *Ensayos de Unión y Función de LCF*

Los fragmentos polipeptídicos de LCF o análogos útiles son aquellos que interaccionan con el receptor CD4, por ejemplo, agonistas o antagonistas LCF. Una interacción de ese tipo se puede detectar mediante un ensayo de unión *in vitro* (como se ha descrito más adelante) seguido de análisis funcional. Por tanto, también se pueden ensayar 25 funcionalmente los fragmentos o análogos de los mismos, es decir, su capacidad de unirse al receptor CD4 y de inducir la migración de linfocitos T4+, monocitos, eosinófilos y similares (como se ha descrito más adelante). Estos ensayos incluyen, como componentes, LCF (o un fragmento de LCF o análogo del mismo adecuado) y receptor CD4 soluble recombinante (CD4rs) o una célula que porta un receptor CD4, por ejemplo, un eosinófilo, configurado para permitir la 30 detección de la unión.

30 Un método de ensayo de este tipo es el siguiente. Se produce un polipéptido LCF de longitud completa (fragmento o análogo del mismo) como se ha descrito anteriormente. El componente receptor CD4 se produce o como un componente soluble recombinante o se produce como un componente de membrana mediante una célula, por ejemplo, un linfocito T, un monocito o un eosinófilo.

35 Después, se realizan ensayos *in vitro* para determinar el alcance de LCF (fragmento o análogo del mismo) que se une a CD4rs o células que portan el receptor CD4. Por ejemplo, se realiza preferiblemente un ensayo de células enteras fijando las células que expresan el receptor CD4, por ejemplo, eosinófilos, a un sustrato sólido (por ejemplo, un tubo de ensayo o un pocillo de microtitulación) por medios bien conocidos por los especialistas en la técnica (véase, 40 por ejemplo, Ausubel *et al.* anteriormente) y presentando el polipéptido LCF marcado (por ejemplo, LCF marcado con 125 I). El marcado de LCF, por ejemplo, con 125 I, se realiza de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en el campo. La unión se ensaya mediante el marcador de detección asociado con el componente receptor (y, por lo tanto, asociado con el sustrato sólido y el receptor CD4) mediante técnicas conocidas en el campo.

45 El formato de ensayo puede ser cualquiera de varios formatos adecuados para detectar la unión adecuada, tal como un formato de radioinmunoensayo (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, anteriormente). Preferiblemente, las células que portan el receptor CD4 se inmovilizan sobre un sustrato sólido (por ejemplo, el pocillo de una placa de microtitulación) y se someten a reacción con polipéptido LCF que está detectablemente marcado, por ejemplo, con un marcador radiactivo tal como 125 I o una enzima que se pueda ensayar, por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa 50 de rábano picante. Por tanto, el LCF marcado con 125 I se une a las células y se ensaya su actividad específica; la unión específica se determina mediante la comparación con ensayos de unión realizados en presencia de exceso de polipéptido LCF no marcado.

55 Alternativamente, el polipéptido LCF (fragmento o análogo del mismo) se puede adherir al sustrato sólido (por ejemplo, a una placa de microtitulación usando métodos similares a los que se usan para adherir células para un ensayo ELISA; Ausubel *et al.*, anteriormente) y se puede usar la capacidad del receptor CD4rs marcado de unirse a LCF para detectar la unión específica del receptor CD4rs al LCF inmovilizado.

60 A continuación sigue un ejemplo que demuestra todavía otro método útil para analizar la interacción LCF:CD4. En este método se incubó sobrenadante bruto de *E. coli* que contenía LCF recombinante con 10 μ g de CD4rs durante 1 hora a 4°C. A continuación, el complejo LCF recombinante-CD4 se añadió a perlas de Sefarosa de proteína A que se habían incubado con 1 μ g de anticuerpo políclonal anti CD4 de conejo y se lavó con un tampón adecuado. Después 65 la mezcla se incubó durante 2 horas a 4°C, se lavó cuatro veces con TSB (Tris 0,01 M, (pH 8,0), NaCl 0,14 M y NaN₃ al 0,025%) antes de desarrollarse en un sistema de gel de poliacrilamida SDS al 15%. Después la proteína separada en el gel SDS se transfirió a filtros de transferencia Problott y se sondó usando anticuerpo antipéptido D de conejo (dilución 1:200) (véase también la sección anticuerpos anti LCF más adelante) seguido de anticuerpo anticonejo 125 I-IgG de cabra. Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 4. Como se muestra en la Figura 4, existe una interacción física específica detectable entre LCF recombinante y CD4rs.

5 También se puede ensayar funcionalmente la capacidad del polipéptido LCF (o fragmento o análogo del mismo) de mediar la migración de linfocitos, monocitos, eosinófilos y similares CD4+. Se pueden emplear ensayos de migración usando cualquier célula adecuada, por ejemplo, linfocitos T, monocitos o eosinófilos como se ha descrito (Cruikshank *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 128: 2569-2571; Rand *et al.*, 1992, *J. Exp. Med.* 173: 1521-1528) a continuación. Por ejemplo, se puede ensayar la capacidad de LCF recombinante sintetizado en un sistema de expresión, por ejemplo, sistemas de expresión de *E. coli* o baculovirus (como se ha descrito anteriormente), de inducir migración celular. En un ejemplo de trabajo, se realizó la quimiotaxis de células murinas usando una cámara de quimiotaxis Boyden modificada (Cruikshank *et al.*, *J. Immunol.* 128: 2569-2571). Las células se suspendieron en RPMI 1640 que contenía solución salina tamponada con fosfato al 10% a una concentración de 5×10^6 células/ml. Se usó una membrana de nitrocelulosa de $12 \mu\text{m}$ y las células se incubaron durante 4 horas. A continuación, las membranas se tiñeron con hematoxilina y se deshidrataron usando lavado secuencial con etanol, propanol y finalmente xileno para clarificar los filtros y permitir el recuento celular mediante microscopía de luz. La migración celular se cuantificó mediante el recuento del número de células que habían migrado más allá de $50 \mu\text{m}$. Todos los recuentos se compararon con migración celular control (no estimulada) que se normalizó siempre hasta el 100%. Adicionalmente, todas las muestras se realizaron en duplicado y se realizó el recuento de cinco campos de gran aumento para cada duplicado. La Figura 5 muestra una curva dosis respuesta representativa de proteína generada a partir de un sistema de expresión de *E. coli* (anteriormente). Como se ha indicado a partir de la curva dosis respuesta, se indujo la migración máxima con una concentración de LCF recombinante de 10^{-9} M y DE_{50} de 10^{-11} M.

20 Se realizó el valor estadístico usando Ensayo T de Student (o análisis de modificaciones de varianza cuando se combinaron los datos de experimentos múltiples) y los recuentos estadísticamente diferentes de la migración celular control ($p < 0,05$) se señalan con un asterisco. Se obtuvieron resultados similares cuando se sustituyó LCF producido por *E. coli* por LCF producido por baculovirus.

25 Para demostrar que esta asociación física entre proteínas recombinantes en solución corresponde a una asociación funcional específica entre LCF recombinante y CD4 de superficie celular se examinaron los efectos de LCF recombinante sobre líneas celulares de hibridoma de células T murinas que expresan CD4 humano de longitud completa o truncado (Sleckman *et al.*, 1987, 1988). Se emplearon tres líneas celulares: una línea celular no infectada sin expresión de CD4; una línea celular que expresa CD4 intacto (de tipo silvestre) y una línea celular que expresa CD4 truncado (delta 13) en la que se han suprimido los 31 residuos más distales del extremo citoplásmico de CD4. Las líneas celulares que expresan tanto CD4 intacto como CD4 delta 13 se eligieron por sus niveles comparables de CD4. Como se muestra en la Figura 6 las células que expresaban CD4 intacto migraron en respuesta a la estimulación de LCF recombinante. Las células que carecían de CD4 o que expresaban CD4 delta 13 no respondieron al LCF recombinante. Estas células fueron sensibles a la migración estimulada por el receptor de células T murinas ya que el anticuerpo 2C11 indujo respuestas migratorias del $198\% \pm 4\%$ y el $192\% \pm 3\%$ de las líneas celulares no transfectadas y CD4 delta 13 respectivamente (Figura 6). Estos estudios demuestran que el CD4 se tiene que expresar para la sensibilidad móvil celular inducida por LCF y que se requiere el extremo citoplásmico.

40 La especificidad CD4 para la estimulación de LCF en células T humanas se demostró usando la expresión de IL-2R para identificar células sensibles LCF. Se cultivaron células T mezcladas en presencia de LCF recombinante (10^{-8} M) durante 24 y 48 horas, tiempo en el cual las células se marcaron para su expresión tanto de CD4 como de IL-2R. Como se muestra en la Figura 7, sólo las células que eran CD4+ demostraron un aumento en el IL-2R expresado en superficie. En este experimento particular se observó un aumento en IL-2R para el 17% de las células CD4+. Esto indica no sólo la especificidad LCF para células CD4+, sino también sugiere que el LCF recombinante sólo actúa sobre un subgrupo de células CD4+.

50 Finalmente, la cromatografía por tamiz de peso molecular de LCF recombinante muestra que la mayoría de la actividad quimioatrayente se eluye en la región de 50-60 kDa. Este pico de actividad quimioatrayente se corresponde con el perfil de elución de LCF recombinante marcado con ^{35}S sometido a cromatografía idéntica como se muestra en la Figura 8A y en la Figura 8B. En la región 14-18 kDa estuvo presente un pequeño pico de radiactividad con quimioactividad no correspondiente. La fracción pico tanto de quimiotaxis como de radiactividad (fracción 13) y la fracción que contiene sólo radiactividad (fracción 17) se aplicaron a SDS-PAGE y se sometieron a autorradiografía. Las proteínas LCF de cada fracción aparecieron como bandas únicas en 17,5 kDa (Figura 8B). Estos datos sugieren que en condiciones fisiológicas el LCF existe predominantemente como un multímero enlazado no covalentemente, pero puede existir algo de LCF como monómeros. Sin embargo, se cree que la forma multimérica posee actividad quimioatrayente.

Detección de Compuestos que Inhiben la Interacción LCF:CD4

60 Anteriormente se ha descrito la detección de compuestos que antagonizan la interacción entre LCF y el receptor CD4, evitando de este modo o reduciendo la cascada de acontecimientos mediados por esa interacción. Los antagonistas químicos del LCF que se unen al LCF o al LCF/receptor CD4 o al receptor CD4 sin desencadenar una respuesta se usan para reducir, atenuar o interferir con los efectos de LCF o agonistas de LCF entrecruzados o fragmentos polipeptídicos de LCF biológicamente activos o análogos del mismo que actúan para estimular o activar los acontecimientos mediados por LCF de la respuesta inmune y la inflamación.

Estos antagonistas incluyen, sin limitación, por ejemplo, LCF entrecruzado, LCF sintético, anticuerpos anti LCF u otros fármacos, por ejemplo compuestos orgánicos.

Por tanto, el polipéptido LCF se puede usar para preparar compuestos que tengan tendencia a neutralizar o impedir su actividad. Por ejemplo, un enfoque concierne a la identificación de los sitios activos de LCF, seguido de la alteración de esos sitios de la secuencia de aminoácidos de LCF mediante sustitución de aminoácidos dentro del sitio activo por otros aminoácidos, para que el péptido no pierda su afinidad de unión por el receptor CD4, pero que después de unirse 5 no sea capaz de promover la actividad y, de ese modo, bloquear el efecto de LCF. También se puede bloquear, atenuar o interferir con la actividad de LCF, mediante el uso de anticuerpos, por ejemplo, antagonistas monoclonales o químicos del LCF. Estos antagonistas químicos incluyen cualquier compuesto orgánico o cualquiera de los otros compuestos mencionados anteriormente, que se pueden ensayar o detectar por la capacidad de interferir con los acontecimientos mediados por LCF:CD4 por los métodos que siguen.

10 Los elementos de la detección son polipéptido LCF (o un fragmento o análogo adecuado del mismo) y CD4rs o una célula que expresa el receptor CD4, por ejemplo, linfocitos, monocitos, eosinófilos y similares CD4+, configurados para permitir la detección de la unión. Se puede producir un polipéptido LCF de longitud completa (fragmento o análogo del mismo) y CD4rs como se ha descrito anteriormente.

15 La unión de LCF a su receptor se puede ensayar mediante cualquier método adecuado (como se ha descrito anteriormente). Por ejemplo, las células que expresan el receptor CD4, por ejemplo, eosinófilos, se inmovilizan sobre un sustrato sólido (por ejemplo, el pocillo de una placa de microtitulación) y se someten a reacción con polipéptido LCF detectablemente marcado (fragmento o análogo del mismo) como se ha descrito anteriormente. La unión se ensaya 20 mediante el marcador de detección asociado con el componente receptor (y, por lo tanto, asociado con el sustrato sólido). La unión de polipéptido LCF recombinante de longitud completa marcado a células que portan el receptor CD4 se usa como un "control" frente al que se miden los ensayos de antagonistas. Los ensayos de antagonistas implican la incubación de células portadoras de receptor CD4 con una cantidad apropiada de antagonista candidato, por ejemplo, 25 un anticuerpo o un compuesto orgánico. A esta mezcla, se añade una cantidad equivalente de LCF marcado. Un antagonista útil en la invención interfiere con LCF marcado que se une a las células portadoras de receptor inmovilizadas. Alternativamente, se puede unir un antagonista pero no activar una respuesta biológica.

30 Posteriormente, si se desea, se puede ensayar la capacidad de un antagonista de interferir con la función LCF, es decir, de interferir específicamente con la unión de LCF marcado sin dar como resultado una transducción de señal normalmente mediada por un polipéptido LCF de longitud completa.

35 Los antagonistas candidatos apropiados incluyen por ejemplo, los polipéptidos FEAW (Phe-Glu-Ala-Trp en los aminoácidos 96-99) y RKSLQSKETTAAGDS (Arg-Lys-Ser-Leu-Gln-Ser-Lys-Glu-Thr-Thr-Ala-Ala-Gly-Asp-Ser en los aminoácidos 116-130) véase por ejemplo, SEC ID N°: 1 los análogos de LCF y otros péptidos así como compuestos no peptídicos y anticuerpos anti polipéptido LCF diseñados u obtenidos a partir del análisis de la interacción LCF/receptor CD4 o la estructura primaria de LCF.

Anticuerpos Anti Polipéptido LCF

40 El LCF humano (o fragmentos o análogos) se puede usar para aumentar los anticuerpos útiles en la invención; tales polipéptidos se pueden producir mediante técnicas sintéticas recombinantes o peptídicas (véase, por ejemplo, Solid Phase Peptide Synthesis, anteriormente; Ausubel *et al.*, anteriormente). Los péptidos se pueden acoplar a una proteína transportadora tal como KLH como se ha descrito en Ausubel *et al.*, anteriormente. El péptido-KLH se mezcla con adyuvante de Freund y se inyecta en cerdos de guinea, ratas, burros y similares o preferiblemente conejos. Los 45 anticuerpos se pueden purificar mediante cromatografía por afinidad a antígeno peptídico.

50 Por ejemplo, el análisis de Kyte-Doolittle (Kyte, J. Molec. Bio. 157: 105-132, 1982) de la secuencia de aminoácidos pronosticada reveló cuatro regiones hidrófilas fundamentales (Figura 9). Basándose en la representación de hidrofilicidad de LCF, se generaron anticuerpos de conejo para los polipéptidos sintéticos de las cuatro regiones hidrófilas fundamentales a partir de los residuos 3-11, 47-58, 68-81 y 115-130 (denominados en la Figura 9 como A, B, C, D, respectivamente). Los antisueros policlonales específicos peptídicos se identificaron mediante ELISA para cada péptido y después se purificaron mediante cromatografía en Sefarosa proteína A. En un ejemplo que demuestra la utilidad de tales anticuerpos, se determinó que los anticuerpos generados para la región D bloquearon la migración inducida por LCF recombinante (10^{-9} M) desde el $194\% \pm el 7\%$ (media \pm de D.T., N=4) hasta el $112\% \pm el 5\%$ en el sistema 55 de ensayo indicador de quimiotaxis (descrito anteriormente). Además, se observó que el anticuerpo antipéptido D era adecuado para transferencia Western e identificó la misma banda de 17,5 kDa que se observó a continuación de la tinción de proteína en la Figura 3A y Figura 3B.

60 Alternativamente, se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando polipéptidos LCF descritos anteriormente y tecnología de hibridomas convencional (véase, por ejemplo, Kohler *et al.*, Nature, 256: 495, 1975; Kohler *et al.*, Eur. Immunol. 6: 511, 1976; Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol., 6: 292, 1976; Hammerling *et al.*, In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981; Ausubel *et al.*, anteriormente). Por tanto, en un ejemplo, los anticuerpos monoclonales para LCF (fragmentos o análogos del mismo) se pueden cultivar en Balb/C u otras cepas similares de ratones mediante inmunización con preparaciones purificadas o parcialmente purificadas de LCF (fragmentos o análogos del mismo). Se pueden extraer los bazo de estos ratones y condensar sus linfocitos con una línea celular de mieloma de ratón. Después de la detección de híbridos mediante técnicas conocidas, se aislará un híbrido estable que produce anticuerpos contra LCF (fragmentos o análogos del mismo). Tal actividad se puede demostrar mediante la capacidad del anticuerpo de evitar la unión del LCF con marcaje radioactivo (por ejemplo, 125 I-LCF) al receptor

ES 2 320 090 T3

CD4. Después se puede examinar la capacidad del anticuerpo monoclonal de evitar la actividad biológica de LCF, por ejemplo, la migración celular (como se ha descrito anteriormente). Una vez producidos, se ensaya p el reconocimiento polipeptídico LCF específico de los anticuerpos policlonales o monoclonales por transferencia Western o análisis de inmunoprecipitación (mediante métodos descritos en Ausubel *et al.*, anteriormente). Los anticuerpos que reconocen 5 específicamente un polipéptido LCF (fragmento o análogo del mismo) se considera que son candidatos probables de antagonistas útiles o tales anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, en un inmunoensayo para supervisar el nivel de polipéptido LCF producido por un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Se considera que los anticuerpos que antagonizan la unión de LCF/receptor CD4 o la función del receptor CD4 mediada por LCF son antagonistas útiles en la invención.

10 *Estimulación de la División Celular Usando LCF y un Factor de Crecimiento*

Se ha descubierto que el LCF recombinante induce la expresión de receptores celulares, por ejemplo, IL-2R, que 15 posteriormente dejan que una células portadora del receptor, por ejemplo, una célula T competente responda a su factor de crecimiento afín, por ejemplo, IL-2. En un ejemplo de trabajo, se estimularon células T humanas con LCF recombinante (se usó un intervalo de concentración de 10^{-5} M a 10^{-10} M con resultados similares, se muestran los datos para 10^{-8} M) durante 24 horas, momento en el que se añadió rIL-2 (2 U/ml) o anti-CD3 (OKT3, 50 ng/ml) a los 20 cultivos celulares. Cuatro días después de la adición de rIL-2 o anticuerpos OKT3 se ensayó la proliferación celular mediante la captación de 3 H timidina. Promediando los resultados de los tres experimentos mostrados en la Tabla 1, que muestra los efectos de LCF recombinante sobre la incorporación de timidina inducida por anti-CD3 y rIL-2, la 25 preincubación de LCF recombinante dio como resultado una sensibilidad de IL-2 potenciada. Las células T humanas no aumentan la incorporación de 3 H timidina a continuación de la incubación con LCF recombinante solo a las 24 ó 48 horas, pero a continuación de la preincubación con LCF recombinante, las células T estimuladas con rIL-2 aumentan la incorporación de 3 H timidina de 1,079 cpm a 13,818 cpm. Sin embargo, en los cultivos celulares tratados con LCF recombinante la respuesta proliferativa al anticuerpo anti-CD3 se redujo aproximadamente en el 50% de 21,257 cpm para la estimulación anti-CD3 sola hasta 12,047 cpm en células estimuladas con LCF recombinante.

Por tanto, en el ejemplo dado se incubaron células T humanas con LCF recombinante durante 24 horas antes de 30 la estimulación con el factor de crecimiento de células T interleuquina 2. La incubación anterior de células T con LCF recombinante dio como resultado un aumento de cinco veces en la incorporación de 3 H-timidina (síntesis de ADN) a las 72 horas en comparación con el LCF recombinante o rIL-2 solos. Esta sinergia fue específica para IL-2 ya que la incubación previa de células T con LCF recombinante disminuyó la incorporación posterior de 3 H-timidina en respuesta a los antígenos de células T (véase respuestas anti-CD3).

35

TABLA 1

<u>Estímulo</u>	<u>Exp. 1</u>	<u>Exp. 2</u>	<u>Exp. 3</u>
Control	983±145	1074±326	946±197
LCF (10^{-8} M)	1203±284	1054±212	982±301
Anti-CD3 (50 ng/ml)	22485±1077	20496±998	20792±1048
rIL-2 (1 U/ml)	2381±185	2594±464	2508±4071
LCP + anti-CD3*	12497±1038	11739±335	11905±1127
LCP + rIL-2*	12664±2802	15037±1088	13753±2068

*Los cultivos se estimularon con LCF durante 24 horas antes de la adición de anticuerpo anti-CD3 o rIL-2. Los cultivos se condujeron durante un total de 5 días.

60 *Terapia*

Los medicamentos particularmente adecuados para el tratamiento de enfermedades de respuestas inmunes de hipersensibilidad e inflamatorias son los fragmentos antagonistas solubles descritos anteriormente formulados en un 65 tampón apropiado tal como solución salina fisiológica. Además, los anticuerpos anti polipéptido LCF (fragmentos o análogos del mismo) producidos como se ha descrito anteriormente se pueden usar como medicamentos. Nuevamente, los anticuerpos se administrarían en un tampón farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina fisiológica). Si es apropiado, la preparación de anticuerpos se puede combinar con un adyuvante adecuado. De forma

similar, los métodos de la invención prevén la identificación de un compuesto orgánico útil para antagonizar la interacción LC4:CD4, una vez identificado y aislado un compuesto de este tipo después se puede formular en un tampón apropiado y usarse como un medicamento.

5 Adicionalmente, los medicamentos adecuados para el uso de LCF o agonistas de LCF como agentes inmunosupresores o como medicamento para estimular la expansión de células portadoras de receptor CD4+ (como se ha descrito anteriormente) se formulan en un tampón apropiado tal como solución salina fisiológica. Nuevamente, estas formulaciones se administrarían en un tampón farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina fisiológica).

10 Generalmente, la composición terapéutica se administrará por vía intravenosa, en una dosis eficaz para estimular la activación de nuevas poblaciones de linfocitos CD4; para inducir anergia (véase la tabla anteriormente) e inhibir el rechazo en transplantes y para atenuar una respuesta inmune de hipersensibilidad e inflamación, por ejemplo, asma.

15 Alternativamente, puede ser conveniente administrar el medicamento por vía oral, por vía nasal, o por vía tópica, por ejemplo como un líquido o una pulverización como un producto principal o como un vector viral que transporta ADNc LCF. Nuevamente, las dosis son como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la dosis del compuesto para tratar cualquiera de los trastornos mencionados anteriormente varía dependiendo de la forma de administración, la edad y el peso corporal del sujeto y el estado del sujeto que se tiene que tratar y finalmente lo decidirá el médico tratante o el veterinario. La cantidad del compuesto activo que ha determinado el médico tratante o el veterinario 20 se denomina en este documento una "cantidad terapéuticamente eficaz". Los compuestos de la invención se pueden administrar a un mamífero, por ejemplo, un paciente humano en una dosis de 0,5 µg/kg/día hasta 5 mg/kg/día.

25 El efecto sinérgico entre LCF recombinante y factor de crecimiento (por ejemplo, IL-2) se podría inducir mediante la administración secuencial de LCF recombinante (0,5 µg/kg a 5 mg/kg seguido a las 24 horas por dosis similares o rIL-2).

30 Las composiciones terapéuticas de la invención se pueden usar para reducir los trastornos descritos en este documento en cualquier mamífero, por ejemplo, seres humanos, animales domésticos o ganado. Cuando se trata un mamífero no humano, el polipéptido fragmento de LCF o el anticuerpo empleado es preferiblemente, pero no necesariamente, específico para esa especie.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un fragmento factor quimiotáctico de linfocitos (LCF), que tiene una secuencia de aminoácidos como se ha expuesto en los aminoácidos 115-130 ó 116-130 de la SEC ID N°: 1.
- 10 2. Un anticuerpo sustancialmente puro que se une específicamente a un péptido seleccionado entre los aminoácidos 115-130 ó 116-130 de la SEC ID N°: 1.
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo neutraliza la actividad biológica de dicho fragmento de LCF.
- 20 4. Una composición terapéutica que comprende como un ingrediente activo un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, formulándose dicho ingrediente activo en un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 25 5. Una composición terapéutica que comprende como un ingrediente activo el fragmento de LCF de acuerdo con la reivindicación 1, formulando dicho ingrediente activo en un vehículo fisiológicamente aceptable.
6. El uso del fragmento de LCF de acuerdo con la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de reacciones inmunes de hipersensibilidad y/o inflamación.
- 20 7. Una composición farmacéutica para el tratamiento de reacciones inmunes de hipersensibilidad y/o inflamación, comprendiendo dicha composición el fragmento de LCF de acuerdo con la reivindicación 1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 090 T3

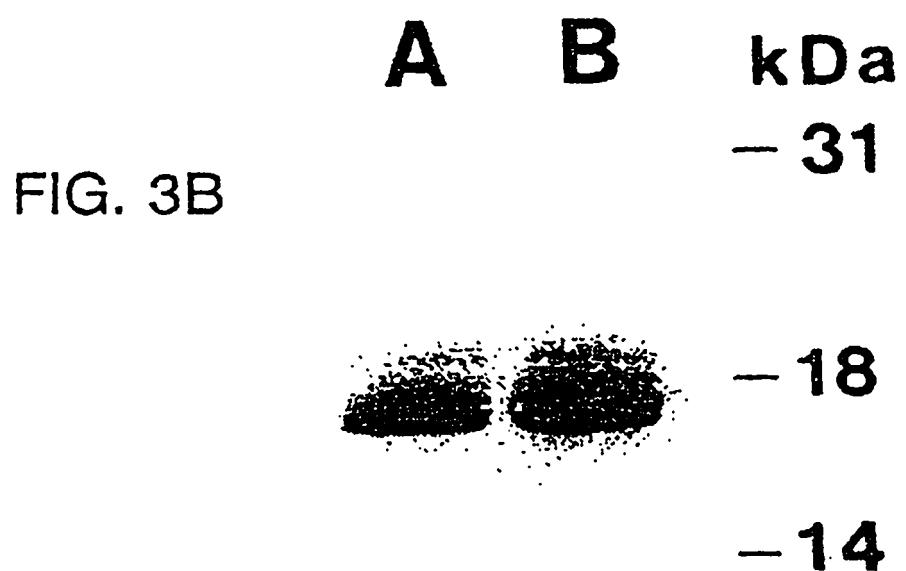
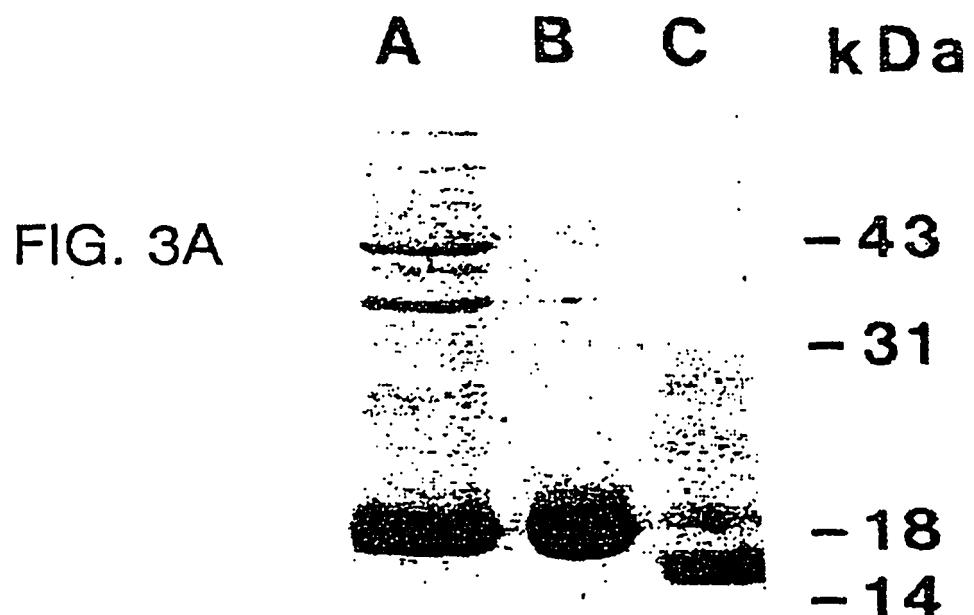
28S \rightarrow

18S \rightarrow

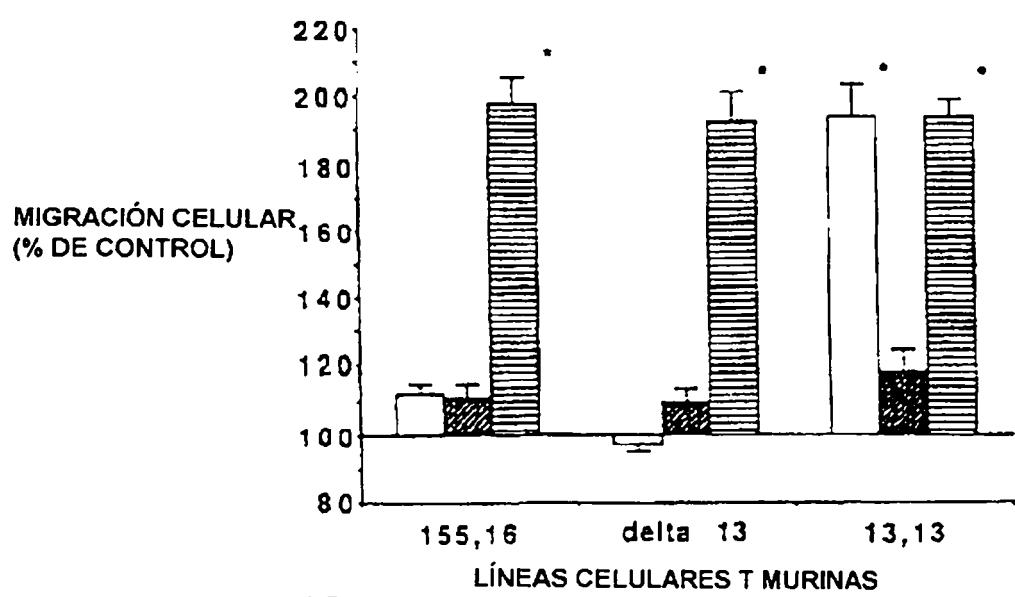
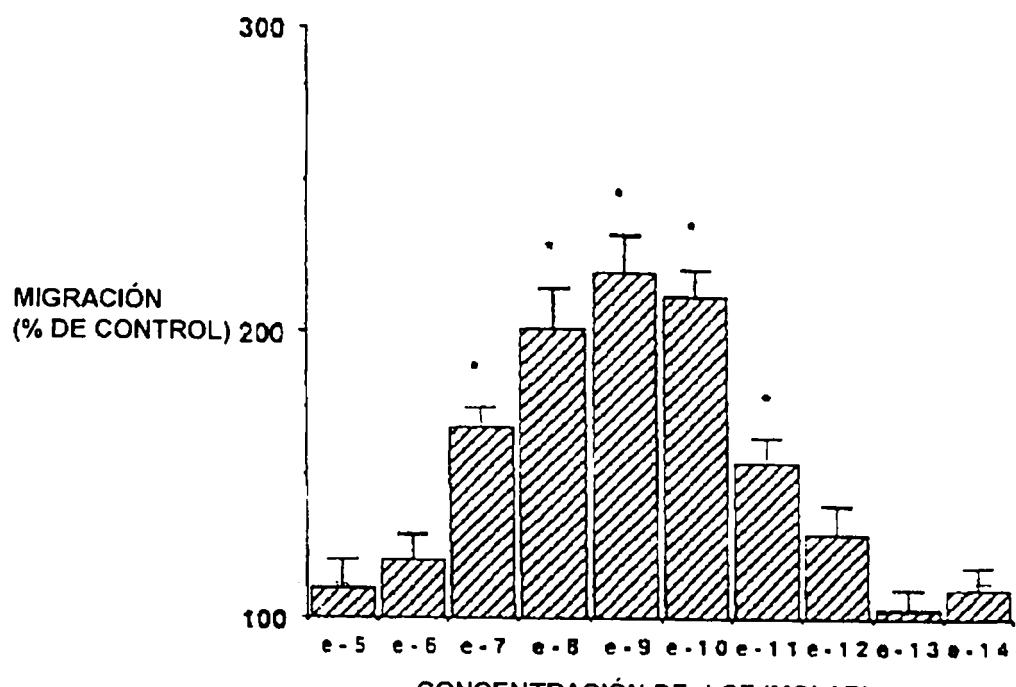
FIG. 1

1 TTCCCTGGAGACGCTGTCAACACAGGGCTGACCAATCTCAAGGCCCAGTGGCTCAAGATGCCCT
 60 AGCCAGCGAGCAGCGAGCTTCCCCCTGACCAGGTCCCAGTCCTGTGAGACGAAAGCTACT
 119 TGACCAAAAGACCAAGCAAACCTCTATTCATCACCAAGCCACTGTCACTGGCTGTCACTGAA
 178 ATCCCTGCTGTGCCCCATCTCTATCTCCCTGTGCCCCAGACTCCCTGCCATCCCCAAGC
 237 CAGGGGCATCTCCAACATCATCATCCAACGAAGACTCAGCTGCAATGGTTCTGCTGAA
 296 ACATCTGCCTTGGACACCGGGTTCTGCTCAACCTTCAGAGCTGAGAGAAATAACAGA
 355 CGGTCTCACGGAAAGCAAGGAACCGATGATGGGACCAAGCTTCCCTCAGTCGGTCA
 414 GTCCGTTATCTCCCTGCTGACCTCAAGAAATTAAAAAACTCATCGAGGAGGTCAAGG
 473 TTCTGGATGAAGCAACATTAAGCAATTAGACGGCATCCATGTACCCATCTACACAG
 532 CAGGAAGGTGCGTCTGGTTCACTTGGCAGGAGGAGCAGATCTAGAAAACAAAGGT
 591 GATTACGGTTCAACAGTGTTCACATGGGCTGGGCTCCCAGGAAGGGACTATTCAAGA
 650 AGGGCAATGAGGTCTTCCATCACGGCAAGTCCTCAAGGGCAACGACCATGAT
 709 GCCTGGCCATCCTCCGCCAGCTGGAGAGCCCAGGCAAGCTGATTGTCAACAGGA
 768 GCTGACTCCAGAGCC ATG CCC GAC CTC TCC ACT GAC TCT GCA
 1 - Met Pro Asp Leu Asn Ser Ser Thr Asp Ser Ala
 816 GCC TCA GCC TCT GCA GCC AGT GAT GTT TCT GTA GAA TCT ACA GCA
 12 Ala Ser Ala Ser Ala Ser Asp Val Ser Val Glu Ser Thr Ala
 861 GAG GCC ACA GTC TGC ACG GTG ACA CTG GAG AAG ATG TCG GCA CGG
 27 Glu Ala Thr Val Cys Thr Val Thr Leu Glu Lys Met Ser Ala Gly
 906 CTG GGC TTC AGC CTG GAA CGA GGG AAG CGC TCC CTA CAC CGA GAC
 42 Leu Gly Phe Ser Leu Glu Gly Gly Lys Ser Leu His Gly Asp
 951 AAC CCT CTC ACC ATT AAC AGG ATT TTC AAA GGA GCA CCC TCA GAA
 57 Lys Pro Leu Thr Ile Asn Arg Ile Phe Lys Gly Ala Ala Ser Glu
 996 CAA AGT GAG ACA GTC CAG CCT GGA GAT GAA ATC TTG CAG CTG GGT
 72 Glu Ser Glu Thr Val Glu Pro Gly Asp Glu Ile Leu Glu Leu Gly
 1041 GGC ACT GCC ATG CAG CGC CTC ACA CGG TTG GAA CCC TGG AAC ATC
 87 Gly Thr Ala Met Glu Gly Leu Thr Arg Phe Glu Ala Trp Asn Ile
 1086 ATC AAG GCA CTC CCT GAT GGA CCT GTC ACC ATT GTC ATC AGG AGA
 102 Ile Lys Ala Leu Pro Asp Gly Pro Val Thr Ile Val Ile Arg Arg
 1131 AAA AGC CTC CAG TCC AAG GAA ACC ACA GCT GCT GGA GAC TCC TAG
 117 Lys Ser Leu Glu Ser Lys Glu Thr Thr Ala Ala Gly Asp Ser -
 1176 CCAGGACATGCTGAAGCCAAAGCCATAACACACAGCTAACACACAGCTCCATAACCG
 1235 CTGATTCTCAGGGTCTCTGCTGCCGCCCCACCCAGATGGGGAAACCAAGGTGGGCTT
 1294 CCCAGTGGCTGCTGCCAGGCCAGACCTTCTAGGAGGCCACCCAGCAAAAGGTTGTC
 1353 CTAAATAAGGGCAGAGTCACACTGGGGCAGCTGATAACAATTGCAAGACTGTGAAAAA
 1412 GAGAGCTTAATGATAATATTGTTGCCCCACAAATAAAATGGATTATTAGAATTCCATA
 1471 TGACATTCTGCTGGCTTCCCAAAATCTTCAACTGACTGTAACTGTCATGATTCAC
 1530 CCCCAAAACTGACATTATTCTCATCATCTCCATGTCGGCAGAGATTGGAAATG
 1589 GGCAGCTCATCTCTGCTCCACTTGGCATCAGCTGGGCTCATGCAAGTCATGCCAAGGC
 1648 TGGGACCACCTGAGATCATTCATCTACATCTGGCGGTTGATGTTGGCTGGAAACTCA
 1707 CCTGGGGCTGCTGCCCTGAATGCTTATAGCTGGCTCTCCTGTTGGCTCCTCA
 1766 CAAATGGTCTCGATCCCCAGGATGAGCATCCCAGGATGCGAAGAGCCACGTAGAAG
 1825 CTGGCATCTTCTTATACCTTGGCTTGGAAAGTTGCATGGCATGCACTCCACCATACTCC
 1884 ATCAAGTTAGAGCTGACACAAACCTGGCTGGGTTAAGGGGAGAGGAAATAATGCTGGGG
 1943 TCATTTATGAAAAATAACAGTTGTCACATGAAACATTGCAAAATTGTTTGGTGGCA
 2002 TTGGAGAACTTAATCCTAGGGAAAGGCTGGACAGTGTGCCCCACAGAAGGAAACCACCGTGTATATGAGG
 2061 GCACCAAGCTCAAAGCGTGGACAGTGTGCCCCACAGAAGGAAACCACCGTGTATATGAGG
 2120 GTATCAAAATAAAATTGCTACTACTTACCAACC

FIG. 2



ES 2 320 090 T3



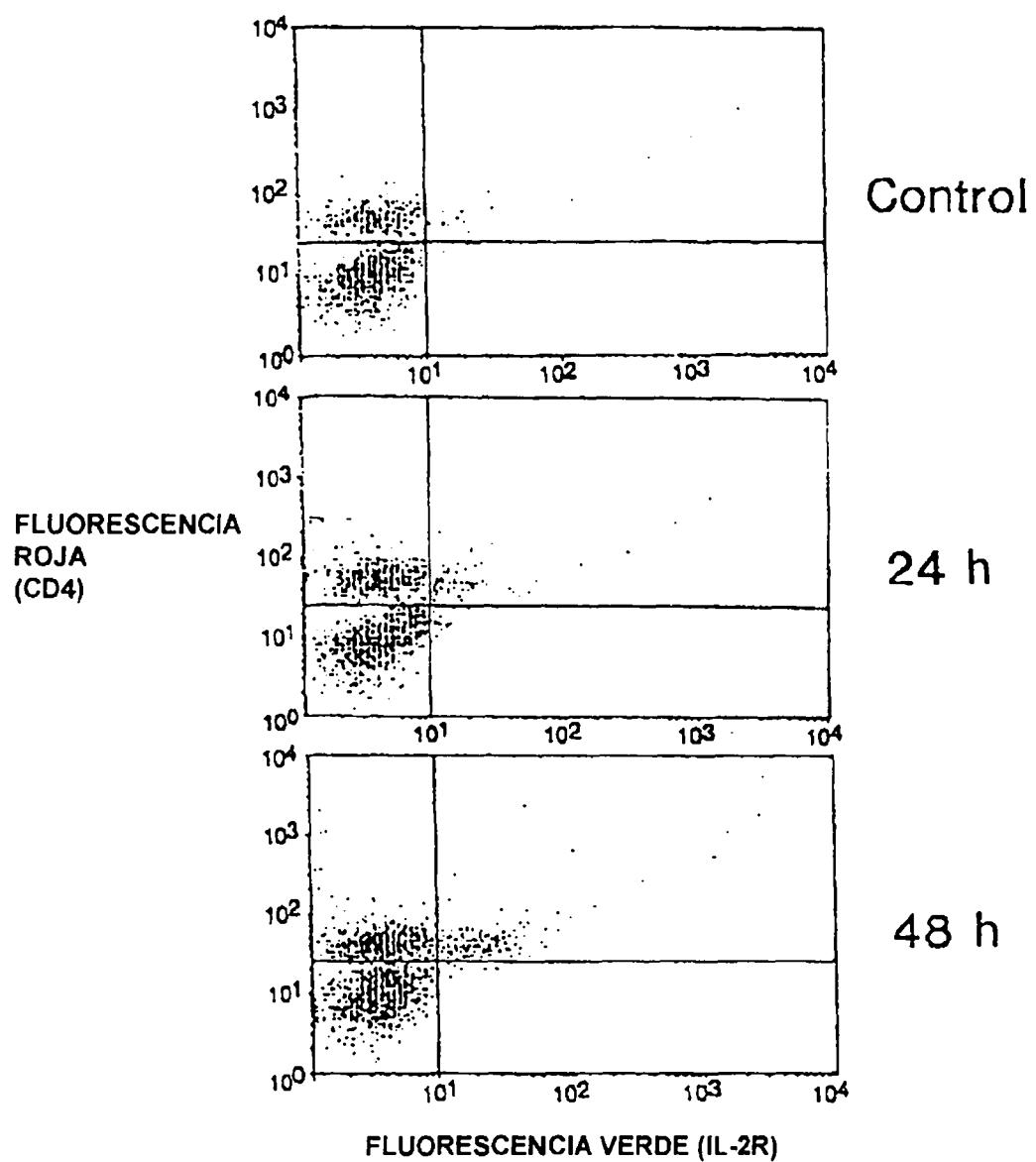
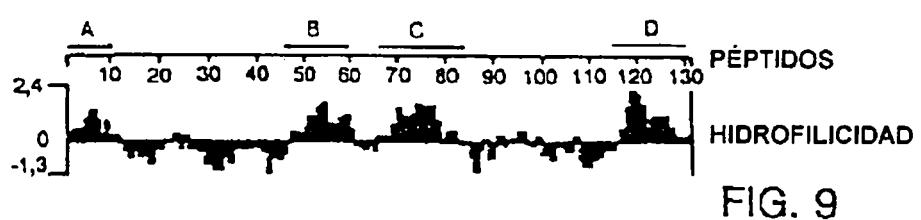
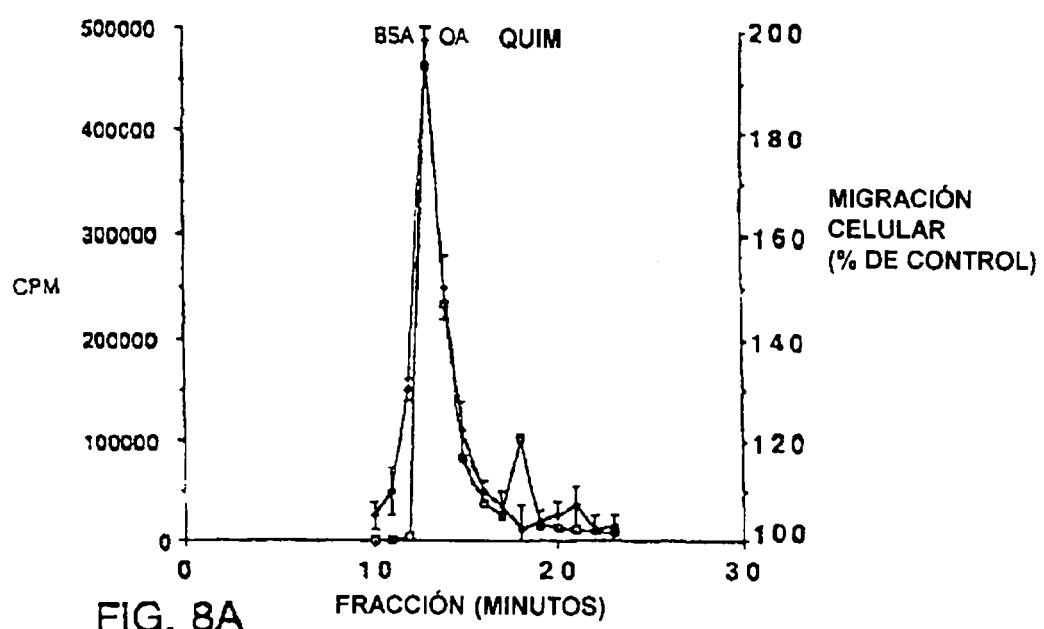


FIG. 7



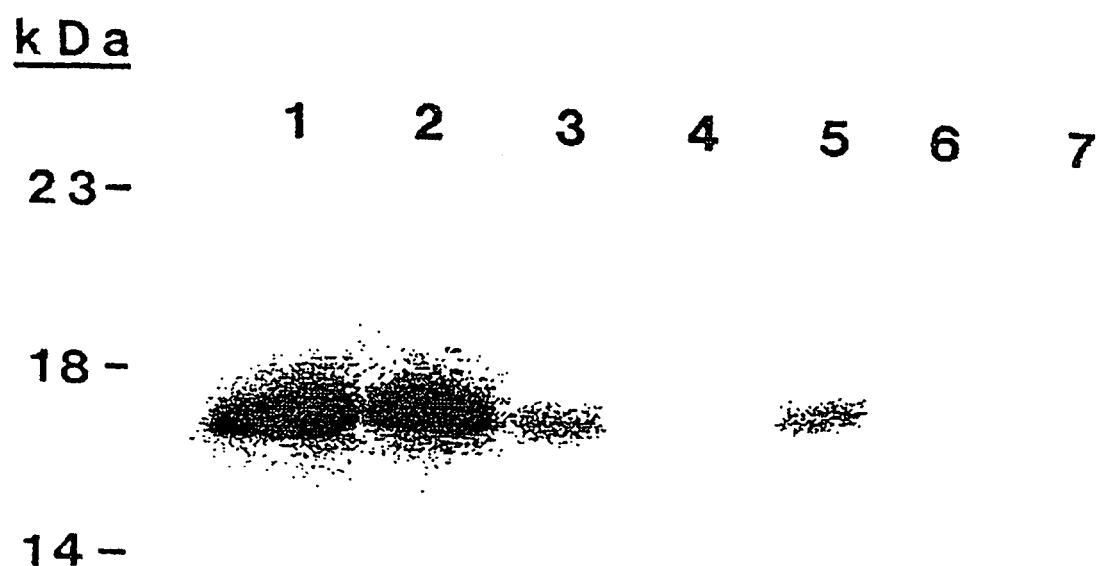


FIG. 4

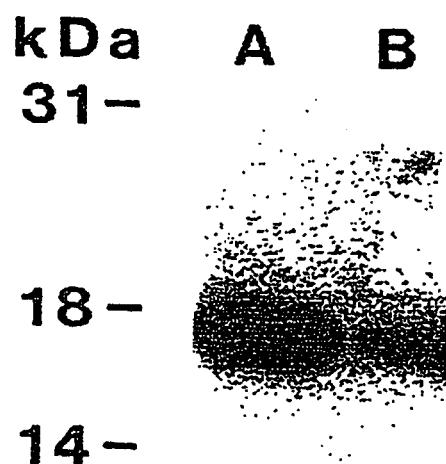


FIG. 8B

LISTA DE SECUENCIAS

1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: POLIPÉPTIDOS DE FACTOR QUIMIOTÁCTICO DE LINFOCITOS Y USOS DE LOS MISMOS
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- 15 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR
- (A) TIPO DE SOPORTE: Disquete de 3.5", 1,44 Mb
- (B) ORDENADOR: IBM PS/2 Modelo 50Z o 55SX
- (C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS (Versión 5.0)
- (D) SOFTWARE: WordPerfect (Versión 5.1)
- 20 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- 25 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/068.949
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 21 de mayo de 1993

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 1

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 130
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) TIPO DE CADENA: N/D
- (D) TOPOLOGÍA: N/D
- 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 1:
- Met Pro Asp Leu Asn Ser Ser Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Ser Ala
 5 10 15
 Ala Ser Asp Val Ser Val Glu Ser Thr Ala Glu Ala Thr Val Cys Thr
 20 25 30
 Val Thr Leu Glu Lys Met Ser Ala Gly Leu Gly Phe Ser Leu Glu Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gly Ser Leu His Gly Asp Lys Pro Leu Thr Ile Asn Arg Ile
 50 55 60
 Phe Lys Gly Ala Ala Ser Glu Gln Ser Glu Thr Val Gln Pro Gly Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Leu Gln Leu Gly Gly Thr Ala Met Gln Gly Leu Thr Arg Phe
 85 90 95
 Glu Ala Trp Asn Ile Ile Lys Ala Leu Pro Asp Gly Pro Val Thr Ile
 100 105 110
 Val Ile Arg Arg Lys Ser Leu Gln Ser Lys Glu Thr Thr Ala Ala Gly
 115 120 125
 Asp Ser
 130

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 2

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 2050
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 55 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 320 090 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2:

5	TTCTCGAGA GCTGTCATCA CAGGCTGAGG AATCTCAGG CCCAGTGCTC AAGATGCCCA	60
10	GGCAGCGAGC ACGGAGCTTC CCCCTGACCA GGTCCCCGTC CTGTGAGACG AAGCTACTTG	120
15	ACGAAAAGAC CAGCRAACTC TATTCTATCA CCACCCAGTG TCATCGGCTG TCATGAAATC	180
20	CTTGCTGTGC CTTCCATCTT CTATCTCTC TGCCCGAGCT CCCCTGATCC CCAAGGCAGG	240
25	GGCATCTCCA ACATCATCAT CCAACGAAGA CTCAGCTGCA AATGGTTCTG CTGAAACATC	300
30	TGCCCTGGAC ACGGGGTTCT CGCTCAACCT TTCAAGAGCTG AGAGAAATAA CAGAGGGTCT	360
35	CACGGAAAGCC AAGGAAGACG ATCATGGGGA CCACACTTCC TTCAGTCTGG TCAGTCCGTT	420
40	ATCTCCCTGC TGAGCTCAGA AGAATTAAA AATCTCATCG AGGAGGTGAA GGTTCTGGAT	480
45	GAAGCAGCAT TAAAGCAATT AGACCCGATC CAGTCACCA TCTTACACAA GGAGGAAGGT	540
50	CGTGGCTTTCG GTTCAGCTT GGCAGGGAGGA GCAGATCTAG AAAAAAGGT GATTACGGTT	600
55	CACAGAGTGT TTCCAAATGG GCTGGCTCC CAGGAAGGGAA CTATTCAGAA GGGCAATGAG	660
60	GTTCCTTCCA TCAACCGCAA CTCTCTCAAG GGGACCAACGC ACCATGATGC CTTGGCCATC	720
65	CTCCTCCCAAG CTGGAGAGCC CAGGCAAGCT GTGATTGTCA CAGGAGCT GACTCCAGAG	780
	CCATGCCCCA CCTCAACTCC TCCACTGACT CTGCAGGCTC AGCCTCTGCA CCCAGTGATG	840
	TTTCTGTAGA ATCTACAGCA GAGGCCACAG TCTGCACGGT CACACTGGAG AAGATCTGG	900
	CAGGGCTGGG CTTCAAGCCTC GAAGGAGGGAA AGGGCTCCCT ACACGGAGAC AAGCCTCTCA	960
	CCATTAAACAG GATTTTCAAA GGAGCAGCCT CAGAACAAAG TGAGACAGTC CAGGCTGGAG	1020
	ATGAAATCTT CGAGCTGGT CGCACTGCCA TGCAGGGCCT CACACGGTTG GAGCCCTCGA	1080
	ACATCATCAA GGCACCTCCCT GATGGACCTG TCACGATTGT CTCAGGAGA AAGACCTCC	1140
	AGTCCACAGGA AACCAACAGCT GCTGGAGACT CCTAGGCAGG ACATGCTGAA CCCAAAGCCA	1200
	ATAACACACAA CCTAACACAC ACCTCCCCATA ACCGCTGATT CTCAGGGTCT CTGCTGCGGC	1260
	CCCACCCAGA TCGGGGAAAG CACAGGTGGG CTTCGGAGTG GCTGCTGCC AGGGCCAGAC	1320
	CTTCTAGGAC CCCACCCAGC AAGGGTTGT TCCTAAATAA AGGGCAGAGT CACACTGGGG	1380
	CGCTGTATAC AATTTGAGA CTGTGTAAAA AGAGAGCTT AATGATAATAT TGTGGTGCCA	1440
	CAAAATAAT CGATTTATAA CAATTCATA TGACATTCAT GCCTGGCTTC GCAAAATGTT	1500
	TCAGTACTG TAACTGTGTC ATGATTCAAC CCCAACAGT GACATTIAAT TTTCTCATGA	1560
	ATCTCCAAATC TCGGAAATGGG CACCTCATCT CTGCTCCACT TCCGATCAGC	1620
	TGGGCTCATG CAAGTCATG CAAGGGCTGG GACCACCTGA GATCAATCAC TCATACATCT	1680
	GGCCCTTGAT GTGGGCTGGG AACTCACCTG CGGCTGGTGG CCTGAAATGCT TATAGGTGGC	1740
	CTCTCTTGT TGCCTGGGT CCTCACAA TGGTGTCTGG AATCCCAGGA TGAGCATCCC	1800
	AGGATGCCAA GAGCCACCTA GAAGCTCCAT CTTCCTTATA CCTTTCCTT GGAAGCTGCCA	1860
	TGGCATCACCC TCCACCCATAC TCCATCAGTT AGAGCTGACA CAACCTGCC TGGGTTTAAG	1920
	GGGAGAGGAA ATATTCCTGG GGTCAATTAT CAAAATAAC GTTTCTCACCA TGAAACATTT	1980
	GCAAAAATTGT TTTGGTTTG AATGGAGAAC TAACTCTAGG GAAGGGTGTG GGAGCCAGTA	2040
	AATAGAGGAG TACAGTGTAA GCACCAAGCT CAAGGGTGG ACAGGTGTGC CGACAGAAGG	2100
	AACCAAGCTG TATATGAGGG TATCAATAA AATGCTACT ACCTTACCAAC	2150