



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 288 305**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/19 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97940941 .4**

(86) Fecha de presentación : **10.09.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0925358**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.1999**

(54) Título: **Receptor de quimiocinas CXCR3, anticuerpos, ácidos nucleicos y métodos de uso.**

(30) Prioridad: **10.09.1996 US 709838**
31.03.1997 US 829839

(73) Titular/es: **Theodor-Kocher Institute**
Freiestrasse 1
3012 Bern, CH
MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, Inc.

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2008

(72) Inventor/es: **Loetscher, Marcel;**
Moser, Bernhard;
Qin, Shixin y
Mackay, Charles, R.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2008

(74) Agente: **Toro Gordillo, Ignacio María**

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

DESCRIPCIÓN

Receptor de quimiocinas CXCR3, anticuerpos, ácidos nucleicos y métodos de uso.

5 Antecedentes

Las quimiocinas constituyen una familia de citocinas pequeñas que se producen durante la inflamación y regulan el reclutamiento de leucocitos (Baggiolini, M. *et al.*, *Adv. Immunol.* 55: 97-179 (1994); Springer, T. A., *Annu. Rev. Physiol.* 57: 827-872(1995); y Schall, T. J. y K. B. Bacon, *Curr. Opin. Immunol.* 6: 865-873 (1994)). Las quimiocinas pueden inducir selectivamente la quimiotaxis de los elementos formes de la sangre (distintos de los glóbulos rojos), incluyendo leucocitos tales como neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, y linfocitos, tales como células T y células B. Además de estimular la quimiotaxis, las quimiocinas pueden inducir selectivamente otros cambios en células que responden a ellas, incluyendo cambios en la forma celular, aumentos transitorios de la concentración de iones de calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), exocitosis de gránulos, regulación por incremento de integrinas, formación de lípidos bioactivos (por ejemplo, leucotrienos) y explosión respiratoria, asociada a la activación de leucocitos. Por tanto, las quimiocinas son desencadenantes tempranos de la respuesta inflamatoria, provocando la liberación de mediadores inflamatorios, quimiotaxis y extravasación a los sitios de infección o inflamación.

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

Las quimiocinas CC y CXC actúan a través de receptores que pertenecen a una super familia de receptores acoplados a proteínas G de siete dominios transmembrana (Murphy, P. M., *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 593-633 (1994); Gerard, C. y N. P. Gerard, *Curr. Opin. Immunol.*, 6: 140-145 (1994)). Esta familia de receptores acoplados a proteínas G (serpentinos) comprende un gran grupo de proteínas integrales de membrana, que contienen siete regiones que atraviesan toda la membrana. Los receptores se acoplan a proteínas G, que son proteínas heterotriméricas reguladoras que pueden unirse a GTP y mediar la transducción de señales desde los receptores acoplados, por ejemplo, mediante la producción de mediadores intracelulares.

Los receptores de quimiocinas pueden dividirse en dos grupos: receptores de quimiocinas CC 1 a 5 (CCR1-5), que se unen a quimiocinas CC, y receptores de quimiocinas CXC 1 a 4 (CXCR1-4), que se unen a quimiocinas CXC. En general, los receptores de quimiocinas CC se encuentran en varios tipos de leucocitos, y son importantes para la migración de monocitos, eosinófilos, basófilos, y células T (Qin, S., *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 26: 640-647 (1996); Carr, M. W., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9): 3652-3656 (1994); Taub, D. D., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95(3): 1370-1376 (1995); Neote, K. *et al.*, *Célula*, 72: 415-425 (1993); Gao, J.-L. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 177: 1421-1427 (1993); Charo, I. F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 2752-2756 (1994); Myers, S. J., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270: 5786-5792 (1995); Combadiere, C. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270 (27): 16491-16494 (1995); y Corrección, *J. Biol. Chem.*, 270: 30235 (1995); Ponath, P. D. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 183: 2437-2448 (1996); y Daugherty, B. L. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 183: 2349-2354 (1996); Power, C. A. *et al.*, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 19495-19500 (1995); Hoogewerf, A. J. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 218: 337-343 (1996); Samson, M. *et al.*, *Biochemistry*, 35: 3362-3367 (1996)). Por el contrario, los dos receptores de IL-8, CXCR1 y CXCR2, están muy restringidos a neutrófilos y son importantes para la migración de los neutrófilos (Baggiolini, M., *et al.*, *Adv. Immunol.*, 55: 97-179 (1994)). Los receptores de IL-8, CXCR1 (IL-8R1, receptor de interleucina-8 tipo 1; Holmes, W. E. *et al.*, *Science*, 253: 1278-1280 (1991)) y CXCR2 (IL-8R2, receptor de interleucina-8 tipo 2; Murphy, P. M. y H. L. Tiffany, *Science*, 253: 1280-1283 (1991)) reconocen el motivo Glu-Leu-Arg (ELR) NH2-terminal, un epítopo de unión esencial observado en las quimiocinas CXC que inducen la quimiotaxis de los neutrófilos (Clark-Lewis, I. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 23128-23134(1991); Hébert, C. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 18989-18994 (1991); y Clark-Lewis, I. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3574-3577 (1993)).

Al contrario que los monocitos y granulocitos, las respuestas de los linfocitos frente a las quimiocinas no se entienden bien. Notablemente, ninguno de los receptores de especificidad conocida parece restringirse a linfocitos y, por tanto, las quimiocinas que reconocen estos receptores no pueden tenerse en cuenta para acontecimientos tales como el reclutamiento selectivo de linfocitos T que se observa en los estados inflamatorios mediados por células T. Además, aunque se han identificado y clonado varias proteínas con similitud de secuencia significativa y similar distribución en tejidos y subpoblaciones de leucocitos para los receptores de quimiocinas conocidos, los ligandos para estos receptores siguen sin definirse. Por tanto, estas proteínas se denominan receptores huérfanos. La caracterización

ES 2 288 305 T3

del/de los ligando(s) de un receptor, es esencial para la comprensión de la interacción de las quimiocinas con sus células diana, los acontecimientos estimulados por esta interacción, incluyendo quimiotaxis y activación celular de los leucocitos, y el desarrollo de tratamientos basados en la modulación de la función de los receptores.

5 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos y métodos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Las proteínas o polipéptidos, tal como se definen en el presente documento pueden ser proteínas del receptor de IP-10/Mig de mamífero (por ejemplo, un primate tal como un ser humano) aislado y/o recombinante denominadas receptor 3 de quimiocinas CXC (CXCR3) y variantes del mismo. Las proteínas CXCR3 recombinantes y variantes pueden producirse en células huésped tal como se describe en el presente documento. Una proteína CXCR3 o variante de la misma se caracteriza por la unión selectiva (por ejemplo, unión de alta afinidad) de una o más quimiocinas, tales como IP-10 y/o Mig, y/o la capacidad de inducir (una o más) respuesta(s) celular(es) (por ejemplo, quimiotaxis, exocitosis, liberación de uno o más mediadores inflamatorios).

10 Los ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican para una proteína CXCR3 o variante de la misma de un mamífero (por ejemplo, un primate tal como un ser humano) se describen en el presente documento solamente con fines ilustrativos. Los constructos de ácido nucleico recombinantes, tales como plásmidos o vectores retrovirales, que contienen un ácido nucleico que codifica para una proteína o una variante de la misma se describen en el presente 15 documento solamente con fines ilustrativos. Los ácidos nucleicos y constructos pueden usarse para producir proteínas de receptores recombinantes y células huésped que comprenden un constructo. El ácido nucleico puede codificar para un ácido nucleico antisentido que puede hibridar con un segundo ácido nucleico que codifica para una proteína CXCR3 y que, cuando se introduce dentro de las células, puede inhibir la expresión del receptor.

20 La invención se refiere a anticuerpos tal como se definen anteriormente reactivos frente a receptores CXCR3, que 25 pueden producirse usando las proteínas o variantes de las mismas (por ejemplo, un péptido) o células que expresan la proteína del receptor o variante como inmunógeno, por ejemplo. Tales anticuerpos o fragmentos de los mismos son útiles en aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación, incluyendo la purificación y el estudio de 30 proteínas de receptores, identificación de células que expresan el receptor de superficie, y la clasificación o recuento de células. Por tanto, la presente invención abarca el uso de un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento (por ejemplo, AcM 1C6 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) en el tratamiento (incluyendo profilaxis) o diagnóstico, y el uso de tales anticuerpos o fragmentos para la fabricación de un medicamento para su 35 uso en el tratamiento de enfermedades o estados tal como se describe en el presente documento.

35 La presente invención también abarca métodos tal como se definen anteriormente de identificación de ligandos del receptor, inhibidores (por ejemplo, antagonistas) o promotores (por ejemplo, agonistas) de la función del receptor. En una realización, se usan células huésped adecuadas que se han sometido a ingeniería genética para expresar una 40 proteína de receptor o una variante codificada por un ácido nucleico introducido dentro de dichas células en un ensayo para identificar y evaluar la eficacia de los ligandos, inhibidores o promotores de la función del receptor. Tales células también son útiles en la evaluación de la función de la proteína o polipéptido del receptor expresado.

45 Según la presente invención, pueden identificarse ligandos, inhibidores y promotores de la función del receptor en un ensayo adecuado, y evaluarse adicionalmente para determinar su efecto terapéutico. Los inhibidores de la función del receptor pueden usarse para inhibir (reducir o evitar) la actividad del receptor, y los ligandos y/o promotores pueden usarse para inducir (desencadenar o potenciar) la función del receptor normal cuando esté indicado. Los anticuerpos de la invención pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias incluyendo enfermedades autoinmunitarias y rechazo de injerto, que comprende administrar un inhibidor de la función del receptor a un individuo (por ejemplo, un mamífero).

50 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos determinada a partir del inserto de 1670 pb de un ADNc que codifica un receptor de IP-10/Mig humano denominado CXCR3, que se aisló a partir de una biblioteca de 55 ADNc de células T CD4⁺ (KT30) (SEQ ID NO: 1). Un marco de lectura abierto (69-1175) codifica para una proteína prevista de 368 aminoácidos (SEQ ID NO: 2). Se ubican una posible señal de poli-A y un sitio de poli-A en las posiciones 1534-1539 y 1624-1670, respectivamente.

La figura 2 es una ilustración de la traducción conceptual del marco de lectura abierto de la secuencia de la figura 1, que codifica para un receptor de IP-10/Mig humano (SEQ ID NO: 2). Las puntas de flecha indican posibles sitios de glucosilación unida a N y las líneas horizontales indican la ubicación de posibles dominios transmembrana (TM1-TM7).

Las figuras 3A-3C son gráficos que ilustran las respuestas inducidas por IP-10 y Mig en células transfectadas de forma estable que expresan IP-10/MigR. La figura 3A es un gráfico que ilustra los cambios de [Ca²⁺]_i dependientes de la concentración en células 300-19 transfectadas con IP-10/MigR. Cada uno de IP-10 o Mig se añadieron a 1, 10, y 100 nM a células cargadas con Fura-2/AM (punta de flecha), y se registraron los cambios de fluorescencia dependientes de [Ca²⁺]_i. Se estimularon las células no transfectadas (líneas inferiores) con IP-10 o Mig a 100 nM en idénticas condiciones.

ES 2 288 305 T3

La figura 3B es un gráfico que ilustra los resultados de estudios que evalúan la desensibilización y desensibilización cruzada del receptor, en los que se estimularon secuencialmente las células 300-19 que expresan IP-10/MigR con IP-10 o Mig 100 nM, y con IP-10 seguido de Mig o al contrario, y se registraron los cambios de fluorescencia.

5 La figura 3C es un gráfico que ilustra la quimiotaxis de células Jurkat que expresan IP-10/MigR estimuladas con IP-10 (círculos rellenos) o Mig (cuadrados rellenos). El panel inferior muestra la respuesta de células Jurkat no transfectadas cuando se estimulan con cantidades crecientes de IP-10 (círculos sin rellenar) o Mig (cuadrados sin rellenar). Se presentan los números medios (\pm DE) de células que migran por cinco campos de alta potencia.

10 Las figuras 4A-4B son gráficos que ilustran las respuestas de linfocitos de sangre periférica (PBL) a IP-10 y Mig. Se usaron PBL aislados recientemente a partir de las capas leucocíticas de sangre de donantes tal cual (líneas inferiores y símbolos sin rellenar), o se usaron tras cultivo durante 10 días en presencia de IL-2 (400 U/ml) (líneas superiores y símbolos rellenos). La figura 4A es un gráfico que ilustra los cambios de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por IP-10 o Mig. Cada uno de IP-10 o Mig se añadieron a 1, 10, y 100 nM a células cultivadas cargadas con Fura-2/AM (puntas de flecha), 15 y se registraron los cambios en la fluorescencia dependiente de $[Ca^{2+}]_i$ (líneas superiores). Se estimularon las células aisladas recientemente (líneas inferiores) con IP-10 o Mig a 100 nM en las mismas condiciones. La figura 4B es un gráfico que ilustra la quimiotaxis de PBL en respuesta a concentraciones crecientes de IP-10 (círculos rellenos) o Mig (cuadrados rellenos) (se presentan los números medios (\pm DE) de células que migran por cinco campos de alta potencia). Las figuras 5A-5B son gráficos que ilustran la unión de IP-10 radiomarcado a cualquiera de células 20 L1.2 transfectadas con ADN de CXCR3 (figura 5A) y a células T activadas (figura 5B). Se incubaron las células con IP-10 marcado con ^{125}I 0,05 nM en presencia de concentraciones crecientes de IP-10 sin marcar. El análisis de Scatchard (recuadro) indicó 37.000 receptores por célula (Kd de 614 pM) para transfectantes L1.2 con CXCR3, y 17.000 receptores por célula (Kd de 156 pM) para blastos CD3.

25 La figura 6 es una ilustración de la especificidad del anticuerpo 1C6 anti-CXCR3 tal como se evaluó mediante marcaje de transfectantes L1.2 estables que expresan o bien CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CXCR3 o bien CXCR4 mediante AcM 1C6 anti-péptido CXCR3. El marcaje de control negativo para todos los transfectantes L1.2 (no se muestra) es parecido al marcaje que se muestra para 1C6 sobre las células L1.2 no transfectadas (L1.2 de tipo natural).

30 Las figuras 7A-7C son histogramas de fluorescencia que ilustran la expresión de CXCR3 en neutrófilos (figura 7A), linfocitos (figura 7B), y células T activadas (figura 7C). Se identificaron subconjuntos de leucocitos en sangre completa mediante su ángulo anterior y dispersión lateral, y se seleccionaron según esto. Para generar blastos CD3, se activaron CMSp con AcM anti-CD3 durante 3 días, y después se mantuvieron en medio que contenía IL-2 durante 35 7 días. En cada diagrama, el perfil en negrita representa marcaje con AcM 1C6 anti-CXCR3, y el perfil sin rellenar representa marcaje con un AcM control emparejado por isotipo.

40 La figura 8 es una serie de diagramas que ilustran la expresión de CXCR3 sobre poblaciones de linfocitos sanguíneos. Se usó un protocolo de marcaje con dos colores para evaluar la expresión de CXCR3 en células T (CD3), células B (CD20), y células NK (CD56).

45 La figura 9 es una serie de diagramas que ilustran la expresión de CXCR3 frente a diversos marcadores del subconjunto CD3+ de linfocitos sanguíneos, según se analizó mediante análisis de inmunofluorescencia de tres colores. Se usó Cy-Chrome anti-CD3 para marcar células T, se seleccionaron electrónicamente estas células para su análisis. Se ajustaron los cuadrantes según el marcaje de AcM control. El marcaje mostrado fue representativo de cinco donantes analizados.

50 La figura 10 es un histograma que ilustra la inhibición de la quimiotaxis de las células T activadas mediada por IP-10 o MCP-1 mediante un conjunto de pruebas de AcM anti-CXCR3. Se colocaron 1×10^6 blastos CD3 humanos en la cámara superior de un transwell (cultivo polarizado) y se colocó quimiocina (12,5 nM) en la cámara inferior. Se colocaron diversos AcM anti-CXCR3 (en sobrenadante de cultivo de tejido, sin SBF) en el pocillo superior con células al principio del ensayo. Tras 1,5 horas se contaron las células que migran a la cámara inferior usando citometría de flujo. Se calculó el porcentaje de inhibición de quimiotaxis usando el número de células que migran en ausencia de AcM como el 100%. Los resultados son representativos de al menos cuatro experimentos por separado.

55 La figura 11 es un gráfico que ilustra la inhibición de la quimiotaxis mediada por IP-10 mediante AcM 1C6 anti-CXCR3 purificado. Se colocaron diversas concentraciones de AcM 1C6 en el pocillo superior, y se realizó el ensayo tal como se describió para la figura 10. El AcM 1C6 inhibió el 50% de la quimiotaxis total a una concentración de 856 ng/ml (CI_{50} = 856 ng/ml).

60 La figura 12 es un gráfico que ilustra la unión de ^{125}I -IP-10 a células T activadas por AcM 1C6. Se incubaron blastos CD3 con ^{125}I -IP-10 0,05 nM en presencia de concentraciones crecientes de 1C6 según se indica. Tras 60 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se contaron los sedimentos celulares. Los datos se analizaron mediante KaleidaGraph, que dio una CI_{50} de 0,16 μ g/ml.

65 Las figuras 13A-13H ilustran la inhibición por AcM 1C6 de $[Ca^{2+}]$ por células T humanas en respuesta a IP-10, pero no a Mig. Se marcaron células T humanas estimuladas con IL-2, activadas por anti-CD3 con Fura-2, y se estimularon secuencialmente con las quimiocinas indicadas (figuras 13A-13B), o con AcM seguido de 40 segundos más tarde

ES 2 288 305 T3

mediante la quimiocina indicada (figuras 13C-13H). Se registraron los cambios en la fluorescencia de $[Ca^{2+}]$, usando un espectrofluorímetro. Las líneas fueron representativas de cinco experimentos por separado. Se usó el anticuerpo a una concentración final de o bien 50 $\mu g/ml$ (figuras 13C-13D); 25 $\mu g/ml$ (figura 13E); 12,5 $\mu g/ml$ (figura 13F); 6,125 $\mu g/ml$ (figura 13G); o bien 3,0625 $\mu g/ml$ (figura 13H). Se usaron las quimiocinas a 2 nM.

5 Las figuras 14A-14D son histogramas de fluorescencia que ilustran los resultados de un análisis de citometría de flujo en el que se marcaron los transfectantes que expresan CXCR3 con AcM 1C6 en presencia de péptido P1 (figura 14B), péptido P2 (figura 14C), péptido P3 (figura 14D), o en ausencia de péptido (figura 14A). En cada diagrama, 10 el perfil definido por la línea gruesa representa el marcaje de AcM 1C6, y el perfil definido por la línea de puntos representa el marcaje con un AcM control irrelevante emparejado por isotipo.

La figura 15 es un histograma que ilustra la inhibición porcentual de la unión de IP-10 radiomarcado a transfectantes con CXCR3 por IP-10 frío 40 nM, AcM 1C6, anticuerpos monoclonales preparados frente a transfectantes con CXCR3 (2F8, 3A12, 3E2, 4B4, 4D2, 5B12, 7B8, o 8D5), o por AcM anti-CXCR2.

15 Descripción detallada de la invención

Tal como se describe en el presente documento, se clonó y caracterizó un ácido nucleico que codifica para un receptor de quimiocinas novedoso que es selectivo para las quimiocinas CXC IP-10 y Mig. El clón, que se aisló a partir 20 de una biblioteca de células T CD4⁺, no se detectó en bibliotecas de ADNc derivadas de monocitos o granulocitos. El análisis de la secuencia del clón reveló un marco de lectura abierto de 1104 pares de bases (figura 1, SEQ ID NO: 1), que codifica para una proteína prevista de 368 aminoácidos con una masa molecular prevista de 40.659 daltons (figura 2, SEQ ID NO: 2). La secuencia de aminoácidos incluye siete posibles segmentos transmembrana que son 25 características de los receptores acoplados a proteínas G y se encuentran en otros receptores de quimiotácticos. En concordancia con esta observación, el receptor media la movilización de Ca^{2+} (ión calcio) y la quimiotaxis en respuesta a IP-10 y Mig (ejemplo 2). No se detectó ninguna respuesta significativa a las quimiocinas CXC IL-8, GRO α , NAP-2 30 (proteína activadora de neutrófilos 2), GCP-2 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2), ENA78 (péptido activador de neutrófilos derivado de epitelio 78), PF4 (factor plaquetario 4), ni a las quimiocinas CC MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α (proteína inflamatoria de macrófagos 1 α), MIP-1 β , RANTES (regulada por activación, expresada y secretada por células T normales), I309, eotaxina o linfotactina en condiciones similares.

La expresión restringida de CXCR3 humano en linfocitos T activados y la selectividad del ligando del receptor para IP-10 y Mig son de particular interés. El receptor humano se expresa mucho en linfocitos T activados por IL-2, pero no 35 se detectó en linfocitos T en reposo, linfocitos B, monocitos o granulocitos en las condiciones usadas en el ejemplo 2. Los estudios adicionales de la distribución del receptor indican que la mayoría de las células CD3+ expresan CXCR3, incluyendo las células que son CD95+, CD45RO+, y CD45RA^{low}, un fenotipo que concuerda con activación previa, aunque una proporción de células CD20+ (B) y células CD56+ (NK) también expresan este receptor. La expresión 40 selectiva en linfocitos T activados es de interés, debido a que otros receptores de quimiocinas que se han notificado que atraen linfocitos (por ejemplo, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES) también se encuentran en granulocitos, tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos, así como monocitos. Estos resultados sugieren que el receptor de IP-10/Mig denominado CXCR3 está implicado en el reclutamiento selectivo de células T efectoras.

El receptor reconoce dos quimiocinas CXC no habituales, denominadas IP-10 y Mig. Aunque tanto IP-10 como 45 Mig pertenecen a la subfamilia de CXC, al contrario que IL-8 y otras quimiocinas CXC que son potentes quimiotácticos para los neutrófilos, las dianas primarias de IP-10 y Mig son los linfocitos, particularmente las células efectoras tales como linfocitos T activados o estimulados y los linfocitos citolíticos naturales (NK) (Taub, D. D. *et al.*, J. Exp. Med., 177: 18090-1814 (1993); Taub, D. D. *et al.*, J. Immunol., 155: 3877-3888 (1995)). (Las células NK son linfocitos granulares grandes, que carecen de un receptor de células T específico para el reconocimiento antigénico, pero tienen 50 actividad citolítica contra células tales como células tumorales y células infectadas por virus). Consecuentemente, IP-10 y Mig carecen del motivo ELR, un epítopo de unión esencial en las quimiocinas CXC que inducen eficazmente la quimiotaxis de los neutrófilos (Clark-Lewis, I. *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 23128-23134 (1991); Hébert, C. A. *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 18989-18994 (1991); y Clark-Lewis, I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3574-3577 (1993)). Además, se ha notificado que tanto la Mig humana recombinante como la IP-10 humana recombinante inducen el 55 flujo de calcio en linfocitos que se infiltran en tumores (TIL) (Liao, F. *et al.*, J. Exp. Med., 182: 1301-1314 (1995)). Mientras que se ha notificado que la IP-10 induce la quimiotaxis de monocitos *in vitro* (Taub, D. D. *et al.*, J. Exp. Med., 177: 1809-1814 (1993), no se ha identificado el receptor responsable), la Mig humana parece ser altamente selectiva y no muestra tal efecto (Liao, F. *et al.*, J. Exp. Med., 182: 1301-1314 (1995)). La expresión de IP-10 se induce en 60 una variedad de tejidos en estados inflamatorios tales como psoriasis, erupciones por fármacos fijadas, respuestas de hipersensibilidad cutánea de tipo retardado, lepra tuberculoide, y en glomerulonefritis experimental y encefalomielitis alérgica experimental. IP-10 también tiene un potente efecto antitumoral *in vivo* que es dependiente de células T, se ha notificado que es un inhibidor de la angiogénesis *in vivo*, y puede inducir quimiotaxis y desgranulación de células NK *in vitro*, lo que sugiere un papel como mediador en el reclutamiento y desgranulación de las células NK (en destrucción de células tumorales, por ejemplo) (Luster, A. D. y P. Leder, J. Exp. Med., 178: 1057-1065 (1993); Luster, A. D. *et al.*, J. Exp. Med., 182: 219-231 (1995); Angiolillo, A. L. *et al.*, J. Exp. Med., 182: 155-162 (1995); Taub, D. D. *et al.*, J. Immunol., 155: 3877-3888 (1995)). Los patrones de expresión de IP-10 y Mig también son distintos ya 65 que la expresión de cada uno se induce por interferón gamma (IFN γ), mientras que la expresión de IL-8 se regula por disminución por IFN γ (Luster, A. D. *et al.*, Nature, 315: 672-676 (1985); Farber, J. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

ES 2 288 305 T3

87: 5238-5242 (1990); Farber, J. M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 192 (1): 223-230 (1993), Liao, F. *et al.*, J. Exp. Med., 182: 1301-1314 (1995); Seitz, M. *et al.*, J. Clin. Invest., 87: 463-469 (1991); Galy, A. H. M. y H. Spits, J. Immunol., 147: 3823-3830 (1991)).

5 Se han reconocido recientemente las quimiocinas como los mediadores tanto tiempo buscados para el reclutamiento de linfocitos. Se ha encontrado que varias quimiocinas CC provocan la quimiotaxis de los linfocitos (Loetscher, P. *et al.*, FASEB J., 8: 1055-1060 (1994)), pero también son activas sobre granulocitos y monocitos (Uguzzoni, M. *et al.*, Eur. J. Immunol., 25: 64-68 (1995); Bagliolini, M. y C. A. Dahinden, Immunol. Today, 15: 127-133 (1994)).
10 La situación es diferente para IP-10 y Mig, que son selectivos en su acción sobre linfocitos, incluyendo linfocitos T activados y células NK, y que se unen a CXCR3, un receptor que no reconoce otras numerosas quimiocinas y que muestra un patrón de expresión selectivo (ejemplo 2, ejemplo 5).

En vista de estas observaciones, es razonable concluir que la formación de los infiltrados característicos en las lesiones inflamatorias, tales como lesiones de hipersensibilidad de tipo retardado; sitios de infección viral y determinados tumores es un proceso mediado por medio de CXCR3 y regulado por la expresión de CXCR3. Los linfocitos, particularmente los linfocitos T, que llevan un receptor CXCR3 como resultado de la activación pueden reclutarse en las lesiones inflamatorias, sitios de infección, o tumores mediante IP-10 y/o Mig, que pueden inducirse localmente por interferón gamma. Así, CXCR3 desempeña un papel en el reclutamiento selectivo de linfocitos, particularmente células efectoras tales como linfocitos T activados o estimulados.
20

Proteínas y péptidos

En el presente documento se describen proteínas o polipéptidos aislados y/o recombinantes (incluyendo, por ejemplo, esencialmente puros) solamente con fines ilustrativos, se denominan proteínas CXCR3 de mamífero y variantes de las mismas. Las proteínas aisladas y/o recombinantes tienen al menos una propiedad, actividad o función característica de una proteína CXCR3 de mamífero (tal como se define en el presente documento), tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión de ligando, inhibidor y/o promotor), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamífero, inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico [Ca^{2+}]_i), función de respuesta celular (por ejemplo, estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por leucocitos), y/o una propiedad inmunológica tal como se define en el presente documento. Por ejemplo, algunas proteínas pueden unirse selectivamente a IP-10 y/o Mig, mediar señalización celular y/o una respuesta a la misma *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, flujo de calcio, quimiotaxis y/o desgranulación especialmente de linfocitos T activados). Por ejemplo, tal como se muestra en el presente documento, una proteína CXCR3 humana, producida en células de mamífero mediante expresión de un clón de ADNc, puede unirse selectivamente a las quimiocinas CXC IP-10 y/o Mig, y mediar la señalización y una respuesta celular (por ejemplo, quimiotaxis). Las proteínas descritas en el presente documento pueden unirse a una quimiocina CXC de la misma o distinta especie de mamífero (por ejemplo, IP-10 humana, IP-10 murina, Mig humana, Mig murina) (IP-10 humana, Luster, A. D. *et al.*, Nature, 315: 672-676 (1985); IP-10 murina (también denominada CRG-2), Vanguri, P. y J. M. Farber, J. Biol. Chem., 265: 15049 (1990) y Luster, A. D. y P. Leder, J. Exp. Med., 178: 1057-1065 (1993); Mig murina, Farber, J. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5238-5242 (1990); Mig humana, Farber, J. M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 192 (1): 223-230 (1993) y Liao, F. *et al.*, J. Exp. Med., 182: 1301-1314 (1995)).
25
30
35
40

Las proteínas o polipéptidos denominados "aislados" en el presente documento son proteínas o polipéptidos en un estado más purificado de en el que existen en células de mamífero e incluyen proteínas o polipéptidos obtenidos mediante métodos descritos en el presente documento, métodos similares u otros métodos adecuados, incluyendo proteínas o polipéptidos esencialmente puros, proteínas o polipéptidos producidos por síntesis química (por ejemplo, péptidos sintéticos), o mediante combinaciones de métodos biológicos y químicos, y proteínas o polipéptidos recombinantes que se aíslan. Pueden obtenerse las proteínas en un estado aislado de al menos aproximadamente el 50% en peso, preferiblemente al menos aproximadamente el 75% en peso, o en forma esencialmente pura. Las proteínas o polipéptidos denominados "recombinantes" en el presente documento son proteínas o polipéptidos producidos mediante la expresión de ácidos nucleicos recombinantes.
45
50

Tal como se usa en el presente documento "proteína CXCR3 de mamífero" se refiere a una proteína CXCR3 de mamífero que se producen de forma natural o endógenas y una proteína que tienen una secuencia de aminoácidos que es igual a la de la proteína CXCR3 de mamífero correspondiente que se produce de forma natural o endógena (por ejemplo, proteínas recombinantes). Por consiguiente, tal como se define en el presente documento, el término "proteína CXCR3 de mamífero" incluye proteínas maduras, polimórficas o variantes alélicas y otras isoformas de CXCR3 de mamífero (por ejemplo, producidas por corte y empalme alternativo u otros procesos celulares), y formas modificadas o sin modificar de las anteriores (por ejemplo, proteínas CXCR3 glucosiladas, no glucosiladas, fosforiladas o no fosforiladas). Las proteínas CXCR3 de mamífero que se producen de forma natural o endógena incluyen proteínas de tipo natural tales como CXCR3 madura, variantes alélicas o polimórficas y otras isoformas que se producen de forma natural en mamíferos (por ejemplo, seres humanos, primates no humanos). Tales proteínas pueden recuperarse a partir de una fuente que produce de forma natural CXCR3 de mamífero, por ejemplo. Estas proteínas y las proteínas CXCR3 de mamífero que tienen la misma secuencia de aminoácidos que el CXCR3 de mamífero correspondiente que se produce de forma natural o endógena, se denominan mediante el nombre del mamífero correspondiente. Por ejemplo, cuando el mamífero correspondiente es un ser humano, la proteína se denomina proteína CXCR3 humana (por ejemplo, una CXCR3 humana producida en una célula huésped adecuada).
55
60
65

ES 2 288 305 T3

Las “variantes funcionales” de proteínas CXCR3 de mamífero incluyen fragmentos funcionales, proteínas mutantes funcionales y/o proteínas de fusión funcionales (por ejemplo, producidas mediante mutagénesis y/o técnicas recombinantes). Generalmente, los fragmentos o partes de proteínas CXCR3 de mamífero incluyen aquellos que tiene una delección (es decir, una o más delecciones) de un aminoácido (es decir, uno o más aminoácidos) en relación con la proteína CXCR3 de mamífero madura (tales como delecciones en el extremo N terminal, el extremo C terminal o internas). También se prevén fragmentos o partes en los que sólo se han deleciónado los aminoácidos contiguos o en las que se han deleciónado aminoácidos no contiguos en relación con la proteína CXCR3 de mamífero madura.

Generalmente, los mutantes o derivados de proteínas CXCR3 de mamífero, incluyen variantes naturales o artificiales que se diferencian por la adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos contiguos o no contiguos, o polipéptidos modificados en los que se modifica uno o más residuos, y mutantes que comprenden uno o más residuos modificados. Los mutantes pueden ser variantes naturales o artificiales de proteínas CXCR3 de mamífero que se diferencian por la adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos contiguos o no contiguos. Tales mutaciones pueden estar en una región conservada o en una región no conservada (en comparación con otros receptores de quimiocinas CXC y/o CC), región extracelular, citoplasmática, o transmembrana, por ejemplo.

Un “fragmento o parte funcional”, “mutante funcional” y/o “proteína de fusión funcional” de una proteína CXCR3 de mamífero se refiere a una proteína u oligopéptido aislado y/o recombinante que tiene al menos una propiedad, actividad o función característica de un receptor CXCR3 de mamífero (tal como se define en el presente documento), tales como una actividad de unión (por ejemplo, unión de ligando, inhibidor y/o promotor), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamífero, inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico $[Ca^{2+}]_i$), función de respuesta celular (por ejemplo, estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por leucocitos), y/o una propiedad inmunológica tal como se define en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, una proteína o polipéptido que tiene “al menos una propiedad inmunológica” de una proteína CXCR3 de mamífero es una que (a) se une al menos a un anticuerpo de una selectividad epítópica seleccionada que se une a una proteína CXCR3 de mamífero que se produce de forma natural o endógena o a una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la proteína CXCR3 de mamífero que se produce de forma natural o endógena (por ejemplo, CXCR3 humano), y/o (b) es un inmunógeno que puede inducir la formación (por ejemplo, cuando se conjuga con un excipiente adecuado) en un animal adecuado de un anticuerpo de una especificidad epítópica seleccionada que se une a una CXCR3 de mamífero que se produce de forma natural o endógena o a una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la CXCR3 de mamífero que se produce de forma natural o endógena. Por ejemplo, un fragmento puede reaccionar de forma cruzada con un anticuerpo que se genera frente a y/o es reactivo con CXCR3 de mamífero aislada.

Pueden identificarse los mutantes o fragmentos adecuados mediante selección. Por ejemplo, las regiones N terminal; C terminal, o internas de la proteína pueden deleciónarse de una forma progresiva y la proteína o polipéptido resultante puede seleccionarse usando un ensayo adecuado, tal como un ensayo descrito en el presente documento (por ejemplo, quimiotaxis, flujo de calcio). Cuando la proteína resultante muestra actividad en el ensayo, la proteína resultante (“fragmento”) es funcional. La información referente a la estructura y función de los receptores acoplados a proteínas G de mamífero, incluyendo receptores de quimiocinas CXC y quimiocinas CC proporciona una base para dividir la proteína CXCR3 de mamífero en dominios funcionales (Murphy, P. M., Annu. Rev. Immunol., 12: 593-633 (1994) y Gerard, C. y N. P. Gerard, Curr. Opin. Immunol., 6: 140-145 (1994), y bibliografía citada en los mismos).

El término variante también abarca las proteínas de fusión, que comprenden una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, CXCR3 humana) como un primer resto, unida a un segundo resto que no se produce en CXCR3 de mamífero tal como se encuentra en la naturaleza. Por tanto, el segundo resto puede ser un aminoácido, oligopéptido o polipéptido. El primer resto puede estar en una ubicación N terminal, ubicación C terminal o interna en la proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender un ligando de afinidad (por ejemplo, una enzima, un antígeno, etiqueta de epítopo) como primer resto, y un segundo resto que comprende una secuencia ligadora y CXCR3 humana o parte de la misma.

Los ejemplos de proteínas CXCR3 de mamífero incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico descrito en el presente documento, tal como una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone o sustancialmente tal como se expone en la figura 2 (SEQ ID NO: 2). Un CXCR3 de mamífero o variante (por ejemplo, una variante que incluye el segmento N terminal extracelular) puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 50% idéntica, más preferiblemente al menos aproximadamente el 70% idéntica, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 80% idéntica, a la proteína mostrada en la figura 2 (SEQ ID NO: 2).

Se apreciará que las proteínas CXCR3 de mamífero aisladas y/o recombinantes y variantes de las mismas pueden modificarse, por ejemplo, mediante incorporación de o unión (directa o indirectamente (por ejemplo, mediante un ligador)) de una etiqueta detectable tal como un radioisótopo, marcador de espín, antígeno (por ejemplo, marcas de epítopo tales como una etiqueta FLAG) o etiqueta enzimática, grupo fluorescente o quimioluminiscente y similares.

ES 2 288 305 T3

Ácidos nucleicos, Constructos y Vectores

En el presente documento se describen ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes (incluyendo, por ejemplo, esencialmente puros) que tienen secuencias que codifican para una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, ser humano) o variante de la misma.

Los ácidos nucleicos denominados "aislados" en el presente documento son ácidos nucleicos separados de los ácidos nucleicos del ADN genómico o ARN celular de su fuente de origen (por ejemplo, tal como existe en las células o en una mezcla de ácidos nucleicos tales como una biblioteca), y pueden haberse sometido a tratamiento adicional. Los ácidos nucleicos "aislados" incluyen ácidos nucleicos obtenidos por métodos descritos en el presente documento, métodos similares u otros métodos adecuados, incluyendo ácidos nucleicos esencialmente puros, ácidos nucleicos producidos por síntesis química, por combinaciones de métodos biológicos y químicos, y ácidos nucleicos recombinantes que se aislan. Los ácidos nucleicos denominados "recombinantes" en el presente documento son ácidos nucleicos que se han producido mediante metodología de ADN recombinante, incluyendo aquellos ácidos nucleicos que se generan por procedimientos que se basan en un método de recombinación artificial, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o clonación en un vector usando enzimas de restricción. Los ácidos nucleicos "recombinantes" también son aquellos que resultan de acontecimientos de recombinación que se producen mediante los mecanismos naturales de las células, pero se seleccionan tras la introducción en las células de ácidos nucleicos diseñados para permitir y hacer probable un acontecimiento de recombinación deseado.

El ácido nucleico o parte del mismo puede codificar para una proteína o polipéptido que tiene al menos una función característica de una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo un receptor CXCR3 humano), tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión de ligando, inhibidor y/o promotor), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamífero, inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citóslico $[Ca^{2+}]_i$), y/o estimulación de una respuesta celular (por ejemplo, estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por leucocitos). Los ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes o una parte de los mismos que comprenden secuencias que codifican para un receptor CXCR3 de mamífero o una parte del mismo se describen específicamente que tienen ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que comprenden secuencias que codifican para una proteína CXCR3 humana también se describen específicamente en el presente documento.

En el presente documento se describen ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes, incluyendo ADN o ARN de cadena doble o sencilla, que se caracterizan por (1) su capacidad para hibridarse con: (a) un ácido nucleico que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1, (b) un ácido nucleico que tiene una secuencia que es complementaria a la SEQ ID NO: 1, o (c) una parte de las anteriores que comprende el marco de lectura abierto de la SEQ ID NO: 1 (una parte de la hebra ilustrada en la figura 1 o la parte correspondiente de la hebra complementaria); y/o (2) por su capacidad para codificar un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 o un equivalente funcional del mismo (es decir, un polipéptido que tiene actividad de unión de ligando para uno o más ligando(s) natural(es) o fisiológico(s) del receptor y/o función estimulante que responde a la unión del ligando, de tal forma que puede inducir una respuesta celular (por ejemplo, inducción (incluyendo desencadenamiento o estimulación) de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por leucocitos); y/o (3) por ambas características.

En un ejemplo ilustrativo se describe que el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la SEQ ID NO: 2 y los equivalentes funcionales de la misma es de al menos aproximadamente el 60% ($\geq 60\%$). Los equivalentes funcionales de la SEQ ID NO: 2 comparten al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NOS: 2. Más preferiblemente, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la SEQ ID NO: 2 y los equivalentes funcionales de la misma es de al menos aproximadamente el 80%, y aún más preferiblemente, al menos aproximadamente el 90%.

Los ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que cumplen estos criterios comprenden ácidos nucleicos que tienen secuencias idénticas a secuencias de receptores CXCR3 de mamífero que se producen de forma natural y partes del mismo o variantes de las secuencias que se producen de forma natural. Tales variantes incluyen mutantes que se diferencian por la adición, delección o sustitución de uno o más residuos, ácidos nucleicos modificados en los que se modifica uno o más residuos (por ejemplo, análogos de ADN o ARN), y mutantes que comprenden uno o más residuos modificados. El ácido nucleico puede compartir al menos aproximadamente el 50% de similitud de secuencia de nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente el 75% de similitud de secuencia de nucleótidos, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de similitud de secuencia de nucleótidos, con una hebra de la secuencia ilustrada en la SEQ ID NO: 1 o la región codificante de la misma. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden tener longitudes de al menos aproximadamente 40 nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 50, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 75 nucleótidos.

Tales ácidos nucleicos pueden detectarse y aislarse mediante hibridación en condiciones de alta rigurosidad o condiciones de moderada rigurosidad, por ejemplo. Las "condiciones de alta rigurosidad" y "condiciones de moderada rigurosidad" para hibridaciones de ácidos nucleicos se explican en las páginas 2.10.1-2.10:16 (véase particularmente 2.10.8-11) y las páginas 6.3.1-6 de Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M. et al., eds., Vol. 1, Supl. 26, 1991). Factores tales como la longitud de la sonda, la composición de bases, el porcentaje de apareamiento erróneo entre las secuencias que hibridan, la temperatura y la fuerza iónica influyen en la estabilidad de los híbridos de ácidos nucleicos. Por tanto, pueden determinarse condiciones de alta o moderada rigurosidad empíricamente para lograr la selectividad deseada.

ES 2 288 305 T3

- Los ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que se caracterizan por su capacidad para hibridar con un ácido nucleico que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 o la complementaria de la misma (por ejemplo, en condiciones de alta o moderada rigurosidad) además puede codificar para una proteína o polipéptido que tiene al menos una función característica de una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, una proteína CXCR3 humana), tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión de ligando, inhibidor y/o promotor), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamífero, inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico $[Ca^{2+}]_i$), y/o estimulación de una respuesta celular (por ejemplo, estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por leucocitos).
- El ácido nucleico de CXCR3 humano descrito en el presente documento, o partes suficientes del mismo, ya sean aislados, recombinantes y/o sintéticos, incluyendo fragmentos producidos mediante PCR, pueden usarse como sondas o cebadores para detectar y/o recuperar ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN genómico, variantes alélicas, ADNc) que codifican para receptores CXCR3 (homólogos) u otros genes de receptores relacionados (por ejemplo, genes de receptores de quimiocinas CXC novedosos) de otras especies de mamíferos incluyendo, pero sin limitarse a primates (por ejemplo, un primate distinto a un ser humano, tal como un mono (por ejemplo, *mono cynomolgus*)), bovino, ovino, equino, canino, felino y roedor (por ejemplo, cobaya, especies murinas tales como rata, ratón). Esto puede lograrse usando los procedimientos descritos en el presente documento u otros métodos adecuados, incluyendo hibridación, PCR u otras técnicas adecuadas. Pueden usarse ácidos nucleicos de mamífero para preparar constructos (por ejemplo, vectores), receptores o fragmentos de los mismos, y cepas huésped útiles en la producción y métodos de uso del receptor.

Un ácido nucleico que codifica para una proteína CXCR3 de mamífero (o variante) puede producirse mediante métodos tales como amplificación por PCR. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores apropiados (por ejemplo, un par de cebadores o cebadores anidados) que comprenden una secuencia que es complementaria o sustancialmente complementaria a una parte del ADNc de CXCR3 humano descrito en el presente documento. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores complementarios a los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante y/o que flanquean la secuencia codificante. Los cebadores de este tipo pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa con un ácido nucleico molde adecuado para obtener un ácido nucleico que codifica para una CXCR3 de mamífero, por ejemplo. Los moldes adecuados incluyen por ejemplo los constructos descritos en el presente documento (tales como pcDNA3-Clone8), una biblioteca de ADNc o genómico u otra fuente adecuada de ADNc o ADN genómico de mamífero (por ejemplo, ser humano, primate). Los cebadores pueden contener partes complementarias a las secuencias flanqueantes de un constructo seleccionado como molde según sea apropiado.

La función de unión de una proteína o polipéptido (por ejemplo, codificada por un ácido nucleico hibridante) puede detectarse en ensayos de unión o de inhibición de unión, usando fracciones de membrana que contienen receptor o células que expresan receptor, por ejemplo (véase por ejemplo, Van Riper *et al.*, J. Exp. Med., 177: 851-856 (1993); Sledziewski *et al.*, patente estadounidense número 5.284.746 (8 de febrero de 1994)). Por tanto, puede evaluarse la capacidad de la proteína o polipéptido codificado para unirse a un ligando, tal como IP-10 o Mig, un inhibidor y/o promotor. Las propiedades antigenicas de las proteínas o polipéptidos codificados por ácidos nucleicos puede determinarse mediante métodos inmunológicos empleando anticuerpos que se unen a un CXCR3 de mamífero, tales como inmunotransferencia, inmunoprecipitación e inmunoensayo (por ejemplo, radioinmunoanálisis, ELISA).

La función de señalización de una proteína o polipéptido (por ejemplo, codificado por un ácido nucleico hibridante) puede detectarse mediante ensayos enzimáticos para determinar la actividad de las proteínas G que responden a la unión al receptor (por ejemplo, intercambio de GTP por GDP en la subunidad α de la proteína G, usando fracciones de membrana). También puede evaluarse el acoplamiento de proteínas G, por ejemplo, usando ensayos en los que la estimulación mediante proteínas G está bloqueada mediante tratamiento o pre-tratamiento de células o una fracción celular adecuada (por ejemplo, membranas) con inhibidores específicos de las proteínas G, tales como la toxina de *Bordetella pertussis* (Bischoff, S. C. *et al.*, Eur. J. Immunol., 23: 761-767 (1993); Sozzani, S. *et al.*, J. Immunol., 147: 2215-2221 (1991)).

La función estimulante de una proteína o polipéptido (por ejemplo, codificada por un ácido nucleico hibridante) puede detectarse mediante ensayos convencionales para determinar quimiotaxis o liberación de mediadores, usando células que expresan la proteína o polipéptido (por ejemplo, ensayos que monitorizan quimiotaxis, exocitosis (por ejemplo, desgranulación de enzimas, tales como esterasas (por ejemplo, serina esterasas), perforina, granzimas) o liberación de mediadores (por ejemplo, histamina, leucotrieno) en respuesta a un ligando (por ejemplo, una quimiocina tal como IP-10 o Mig) o un promotor (véanse por ejemplo, Taub, D. D. *et al.*, J. Immunol., 155: 3877-3888 (1995); Baggiolini, M. y C. A. Dahinden, Inmunology Today, 15: 127-133 (1994) y bibliografía citada en los mismos). También pueden evaluarse funciones características de un receptor CXCR3 de mamífero mediante otros métodos adecuados.

También pueden usarse estos métodos, solos o en combinación con otros métodos adecuados en procedimientos para la identificación y/o aislamiento de ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 o equivalentes funcionales del mismo, y que tiene una actividad detectada mediante el ensayo. También pueden identificarse y aislar de esta manera partes de ácidos nucleicos aislados que codifican para partes del polipéptido de la SEQ ID NO: 2 que tienen una determinada función.

ES 2 288 305 T3

Pueden usarse ácidos nucleicos en la producción de proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, puede incorporarse en un constructo un ácido nucleico que contiene toda o parte de la secuencia codificante de un receptor CXCR3 de mamífero, o ADN que hibrida con la secuencia SEQ ID NO: 1, o la complementaria de la misma, para la manipulación adicional de secuencias o para la producción del polipéptido codificado en células huésped adecuadas. También pueden modificarse

- 5 los ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante incorporación o unión (directa o indirectamente) de una etiqueta detectable tal como un radioisótopo, marcador de espín, antígeno o etiqueta enzimática, grupo fluorescente o quimioluminiscente y similares.

Constructos antisentido

10 El ácido nucleico descrito en el presente documento puede ser un ácido nucleico antisentido, que es complementario, en su totalidad o en parte, a una molécula diana que comprende una hebra de sentido directo y que puede hibridar con la molécula diana. La diana puede ser ADN, o su opuesto de ARN (es decir, en el que los residuos de T del ADN son residuos de U en el opuesto de ARN). Cuando se introducen dentro de una célula usando métodos adecuados, el
15 ácido nucleico antisentido puede inhibir la expresión del gen codificado por la hebra de sentido directo. Los ácidos nucleicos antisentido pueden producirse mediante técnicas convencionales.

20 El ácido nucleico antisentido puede ser completa o parcialmente complementario a y puede hibridar con un ácido nucleico diana, en el que el ácido nucleico diana puede hibridar con un ácido nucleico que tiene la secuencia de la hebra complementaria de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el ácido nucleico antisentido puede ser complementario a un ácido nucleico diana que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma suficiente para permitir la hibridación. El ácido nucleico antisentido puede ser total o parcialmente complementario a y puede hibridar con un
25 ácido nucleico diana que codifica para un receptor CXCR3 de mamífero (por ejemplo, receptor CXCR3 de IP-10/Mig humano).

30 Los ácidos nucleicos antisentido son útiles para una variedad de fines, incluyendo investigación y aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, puede introducirse un constructo que comprende un ácido nucleico antisentido dentro de una célula adecuada para inhibir la expresión del receptor. Una célula de este tipo proporciona una célula control valiosa, por ejemplo en la evaluación de la especificidad de la interacción receptor-ligando con la célula original u otros tipos de célula relacionados. Puede introducirse un constructo de este tipo dentro de algunas o todas las
35 células de un mamífero. El ácido nucleico antisentido inhibe la expresión del receptor, y pueden inhibirse los procesos inflamatorios mediados por receptores CXCR3 en las células que contienen el constructo. Por tanto, puede tratarse una enfermedad o estado inflamatorio usando un ácido nucleico antisentido. Animales de laboratorio adecuados que comprenden un constructo antisentido también pueden proporcionar modelos útiles para determinar deficiencias en la función de los leucocitos, y de la deficiencia de linfocitos T activados en particular, y pueden proporcionar información adicional referente a la función del receptor CXCR3. Los animales de este tipo pueden proporcionar modelos valiosos de enfermedades infecciosas o cáncer, útiles para aclarar el papel de los leucocitos, tales como linfocitos T y células NK, en las defensas del huésped.

40 Método para producir proteínas recombinantes

En el presente documento se describe un método para producir una proteína CXCR3 de mamífero o variante (por ejemplo, parte) de la misma con fines de tipo ilustrativo. Tal proteína recombinante puede obtenerse, por ejemplo, mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, ADN) que codifica para una CXCR3 de mamífero o variante de la misma en una célula huésped adecuada, por ejemplo.

También se describen constructos (por ejemplo, vectores de expresión) adecuados para la expresión de una proteína CXCR3 de mamífero o variante de la misma. Los constructos pueden introducirse dentro de una célula huésped adecuada, y las células que expresan una proteína recombinante CXCR3 de mamífero o variante de la misma pueden producirse y mantenerse en cultivo. Las células de este tipo son útiles para una variedad de fines, incluyendo su uso en la producción de proteínas para la caracterización, aislamiento y/o purificación, (por ejemplo, purificación por afinidad), su uso como inmunógeno, y en ensayos de unión u otros ensayos funcionales (por ejemplo, seleccionar ligandos, inhibidores y/o promotores de la función del receptor), por ejemplo. Las células huésped adecuadas pueden ser procariotas, incluyendo células bacterianas tales como *E. coli*, *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas, o eucariotas, tales como células fúngicas o de levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, especies de *Aspergillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), u otras células eucariotas inferiores, y células de eucariotas superiores tales como las de insectos (por ejemplo, células de insecto Sf9 (documento WO94/26087, O'Connor, publicado el 24 de noviembre de 1994)) o mamíferos (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células HuT 78, células 293). (Véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. *et al.*, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., (1993)).

Las células huésped que producen una proteína CXCR3 de mamífero recombinante o variante de la misma pueden producirse de la siguiente manera. Por ejemplo, puede insertarse un ácido nucleico que codifica para toda o parte de la secuencia que codifica para la proteína dentro de un vector de ácido nucleico, por ejemplo, un vector de ADN, tal como un plásmido, virus u otro replicón adecuado para la expresión. Están disponibles una variedad de vectores, incluyendo vectores que se mantienen en copia única o copia múltiple o que llegan a integrarse dentro del cromosoma de la célula huésped.

ES 2 288 305 T3

Pueden usarse señales transcripcionales y/o traduccionales de un gen de CXCR3 de mamífero para dirigir la expresión. También están disponibles los vectores de expresión adecuados para la expresión de un ácido nucleico que codifica para toda o parte de la secuencia que codifica para la proteína deseada. Los vectores de expresión adecuados pueden contener varios componentes, incluyendo, pero sin limitarse a uno o más de los siguientes: un origen de replicación; un gen marcador seleccionable; uno o más elementos de control de expresión, tales como un elemento de control transcripcional (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un terminador), y/o una o más señales de traducción; una secuencia señal o secuencia líder para dirigirla a la membrana en una célula huésped seleccionada (por ejemplo, de origen mamífero o a partir de un mamífero heterólogo o especie no mamífera). En un constructo, el vector puede proporcionar una secuencia señal, la secuencia que codifica para CXCR3 de mamífero, u otra fuente. Las secuencias presentes en el sitio de integración también pueden proporcionar estos elementos.

Puede proporcionarse un promotor para la expresión en una célula huésped adecuada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede estar operativamente unido a un ácido nucleico que codifica para la proteína CXCR3 de mamífero o variante de la misma, de tal forma que dirige la expresión del polipéptido codificado. Están disponibles una variedad de promotores adecuados para huéspedes procariotas (por ejemplo, los promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*) y eucariotas (por ejemplo, alcohol deshidrogenasa de levaduras (ADH1), SV40, CMV).

Además, los vectores de expresión comprenden habitualmente un marcador seleccionable para la selección de las células huésped que llevan el vector, y, en caso de vectores de expresión replicables, un origen de replicación. Los genes que codifican para productos que confieren resistencia a antibióticos o fármacos son marcadores seleccionables comunes y pueden usarse en células procariotas (por ejemplo, gen de la β -lactamasa (resistencia a ampicilina), gen Tet para resistencia a tetraciclina) y eucariotas (por ejemplo, genes de resistencia a neomicina (G418 o Geneticin), gpt (ácido micofenólico), ampicilina, o higromicina). Los genes marcadores de dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de huéspedes. Los genes que codifican para el producto génico de marcadores auxótropos del huésped (por ejemplo, *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) se usan frecuentemente como marcadores seleccionables en levaduras. También se contempla el uso de vectores virales (por ejemplo, baculovirus) o de fagos, y vectores que pueden integrarse dentro del genoma de la célula huésped, tales como los vectores retrovirales. También se describen en el presente documento las células que llevan estos vectores de expresión.

Por ejemplo, puede introducirse un ácido nucleico que codifica para una proteína CXCR3 de mamífero o variante de la misma, o un constructo que comprende un ácido nucleico de este tipo, dentro de una célula huésped adecuada mediante un método apropiado para la célula huésped seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, elektroporación, infección), de tal forma que el ácido nucleico está operativamente unido a uno o más elementos de control de expresión (por ejemplo, en un vector, en un constructo creado mediante procesos en la célula, integrado dentro del genoma de la célula huésped). Las células huésped pueden mantenerse en condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia de inductor, medios adecuados complementados con las sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, complementos nutricionales, etc.), mediante la que se produce el polipéptido codificado. Si se desea, puede aislarse la proteína codificada (por ejemplo, CXCR3 humano) (por ejemplo, a partir de las células huésped, medio, leche). Se apreciará que el método abarca la expresión en una célula huésped de un animal transgénico (véase por ejemplo, el documento WO 92/03918, GenPharm International, publicado el 19 de marzo de 1992).

También pueden producirse proteínas de fusión de esta manera. Por ejemplo, pueden producirse algunas realizaciones mediante la inserción de ADNc de una proteína CXCR3 de mamífero o parte del mismo dentro de un vector de expresión adecuado, tal como Bluescript[®]II SK +/- (Stratagene), pGEX-4T-2 (Pharmacia), pcDNA-3 (Invitrogen) o PET-15b (Novagen). El constructo resultante puede introducirse en una célula huésped adecuada para su expresión. Tras la expresión, puede aislarse o purificarse la proteína de fusión a partir de un lisado celular por medio de una matriz de afinidad adecuada (véase por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M. et al., eds., Vol. 2, Sup. 26, págs. 16.4.1-16.7.8 (1991)). Además, las etiquetas de afinidad proporcionan un medio para detectar una proteína de fusión. Por ejemplo, puede detectarse la expresión en la superficie celular o la presencia en una fracción celular particular de una proteína de fusión que comprende una etiqueta de afinidad a epítopo o antígeno por medio de un anticuerpo apropiado.

Anticuerpos

La invención se refiere a anticuerpos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas reactivos frente a una proteína CXCR3 de mamífero o parte de la misma. Los anticuerpos se unen específicamente a un receptor CXCR3 de mamífero que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID NO: 2. En una realización, se preparan los anticuerpos frente a una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o parte de la misma (por ejemplo, un péptido) o frente a una célula huésped que expresa CXCR3 de mamífero recombinante.

Los anticuerpos de la invención inhiben una o más funciones características de una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, un primate tal como un ser humano), tales como una actividad de unión, una actividad de señalización, y/o estimulación de una respuesta celular. Los anticuerpos de la presente invención inhiben la unión de IP-10 o Mig (es decir, uno o más ligandos) a una proteína CXCR3 de mamífero y/o pueden inhibir una o más funciones mediadas por una proteína CXCR3 de mamífero en respuesta a la unión del ligando. Por ejemplo, tal como se muestra en el presente documento, los anticuerpos de la presente invención pueden inhibir selectivamente la interacción de una proteína CXCR3 humana con IP-10 y/o inhibir selectivamente las funciones del receptor en respuesta a la misma (por ejemplo,

ES 2 288 305 T3

actividad de señalización y/o respuesta celular). Un anticuerpo denominado 1C6, que muestra esta selectividad, puede inhibir la unión de IP-10 a una proteína CXCR3 humana así como el flujo de calcio y la quimiotaxis inducida por IP-10, pero no inhibe significativamente el flujo de calcio inducido por Mig en las mismas condiciones. Tal como se muestra en el presente documento, anticuerpos adicionales pueden inhibir la unión de IP-10 a CXCR3 (por ejemplo,

5 3A8, 2F8, 3A12, 3E2, 4B4, 4D2, 5B12, 7B8 y 8D5) o la quimiotaxis inducida por IP-10 (por ejemplo, 1A5, 3A8, 5F10, y 10C6), aunque estos anticuerpos no inhibieron la señalización inducida por Mig en las condiciones usadas, indicando que también son inhibidores selectivos de la interacción de una proteína CXCR3 humana con IP-10 y/o de las funciones del receptor en respuesta a la misma.

10 En una realización particularmente preferida, los anticuerpos de la presente invención tienen especificidad para una proteína CXCR3 humana, y aún más preferiblemente tienen una especificidad epítópica que es igual o similar a la del anticuerpo monoclonal murino (AcM) denominado 1C6. Pueden identificarse los anticuerpos que tienen una especificidad epítópica que es igual o similar a la de AcM 1C6 usando una o más técnicas adecuadas para caracterizar la especificidad epítópica. Por ejemplo, pueden identificarse anticuerpos que tienen especificidad epítópica que es igual o similar a la de AcM 1C6 por su capacidad para competir con el AcM 1C6 murino por la unión a una proteína CXCR3 humana o parte de la misma (por ejemplo, a células que llevan CXCR3 humano, incluyendo linfocitos tales como células T activadas, células NK, o células huésped recombinantes que comprenden un ácido nucleico de la presente invención). En una realización, los anticuerpos que tienen una especificidad epítópica que es igual o similar a la de AcM 1C6 se caracterizan adicionalmente por la capacidad de un polipéptido que tiene una secuencia que es igual a la de los residuos 1-15 ("P1") de la SEQ ID NO: 2 para inhibir la unión de los anticuerpos a una proteína CXCR3 humana en un ensayo adecuado (véase por ejemplo, el ejemplo 8). En un aspecto de esta realización, la unión a una proteína CXCR3 humana por anticuerpos de este tipo no se inhibe significativamente por un polipéptido que tiene una secuencia que es igual a la de los residuos 16-30 ("P2") o 31-45 ("P3") de la SEQ ID NO: 2.

25 Otros anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen anticuerpos que pueden unirse a una proteína CXCR3 humana, en la que dicha unión puede inhibirse por una parte de la SEQ ID NO: 2 que corresponde al segmento extracelular N-terminal o una parte del mismo. Las partes adecuadas del segmento N-terminal extracelular incluyen el partes N-terminales, internas o C-terminales de ese segmento, tales como un polipéptido que comprende el extremo N-terminal y que tiene una secuencia que es igual a la de los residuos 1-30, 1-45 ó 1-58 de la SEQ ID NO: 2, por ejemplo, o un polipéptido que tiene una secuencia que es igual a la de los residuos 16-30 ó 45-58 de la SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, las partes de este tipo tienen "al menos una propiedad inmunológica" de una proteína CXCR3 de mamífero tal como se definió anteriormente en el presente documento, en la que el mamífero es un ser humano. Por ejemplo, se han obtenido anticuerpos reactivos frente a una proteína CXCR3 humana para los que puede inhibirse la unión mediante un polipéptido que tiene una secuencia que es igual a la de los residuos 16-30 de la SEQ ID NO: 2 (Ejemplo 9).

40 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser policlónicos o monoclonales, y se pretende que el término anticuerpo abarque tanto anticuerpos policlónicos como monoclonales. Los términos policlonal y monoclonal se refieren al grado de homogeneidad de una preparación de anticuerpo, y no se pretende que se limiten a métodos de producción particulares.

Pueden prepararse anticuerpos de la presente invención frente a un inmunógeno apropiado, incluyendo proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento, tales como una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o parte de la misma (incluyendo moléculas sintéticas, tales como péptidos sintéticos). Además, las células que expresan CXCR3 de mamífero recombinante, tales como células transfectadas, pueden usarse como inmunógenos o en una selección de un anticuerpo que se une al receptor. Véase por ejemplo, Chuntharapai *et al.*, J. Immunol., 152: 1783-1789 (1994); y Chuntharapai *et al.*, patente estadounidense número 5.440.021.

50 Puede realizarse la preparación de antígeno de inmunización y la producción de anticuerpos policlónales y monoclonales usando cualquier técnica adecuada. Se ha descrito una variedad de métodos (véase por ejemplo, Kohler *et al.*, Nature, 256: 495-497(1975) y Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976); Milstein *et al.*, Nature 266: 550-552 (1977); Koprowski *et al.*, patente estadounidense número 4.172.124; Harlow, E. y D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: ColdSpring Harbor, NY); Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, Verano '94), Ausubel, F. M. *et al.*,Eds., (John Wiley & Sons: Nueva York, NY), Capítulo 11, (1991)).

55 Generalmente, puede producirse un hibridoma fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como SP2/0) con células productoras de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos, preferiblemente las del bazo o los ganglios linfáticos, pueden obtenerse a partir de animales inmunizados con el antígeno de interés. Las células fusionadas (hibridomas) pueden aislarse usando condiciones de cultivo selectivas y clonarse mediante dilución limitante. Pueden seleccionarse las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

60 Pueden usarse otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, por ejemplo, métodos que seleccionan el anticuerpo recombinante a partir de una biblioteca o que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden producir un conjunto completo de anticuerpos humanos (véase por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Lonberg *et al.*, patente estadounidense número 5.545.806; Surani *et al.*, patente estadounidense número 5.545.807).

La presente invención y el término “anticuerpo” también abarcan anticuerpos de cadena sencilla, y anticuerpos químéricos, humanizados o primatizados (injertados en CDR), o anticuerpos camuflados así como anticuerpos de cadena sencilla químicos, injertados en CDR o camuflados, que comprenden partes derivadas de especies diferentes, y similares. Las diversas partes de estos anticuerpos pueden unirse químicamente mediante técnicas convencionales, o

5 puede(n) prepararse un/unos polipéptido(s) como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética. El término “inmunoglobulina o anticuerpo humanizado” tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo o inmunoglobulina que comprende partes de inmunoglobulinas de diferente origen, en la que al menos una parte es de origen humano. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado (que incluye fragmentos de unión a antígeno del mismo) que tiene especificidad de unión para una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, una proteína CXCR3 humana), que comprende regiones de unión a antígeno de origen no humano (por ejemplo, roedor) y al menos de parte de una inmunoglobulina de origen humano (por ejemplo, una región de entramado humana, una región constante humana, o partes de las mismas). Por ejemplo, los anticuerpos humanizados pueden comprender partes derivadas de una inmunoglobulina de origen no humano con la especificidad requerida (por ejemplo, una región variable de ratón no humana) y de secuencias de inmunoglobulinas de origen humano (por ejemplo, una región

10 constante humana o parte de la misma) unidas químicamente o preparadas como polipéptidos contiguos usando técnicas de ingeniería genética. Otro ejemplo de un anticuerpo humanizado de la invención es una inmunoglobulina que comprende una o más cadenas de inmunoglobulina, comprendiendo dicha inmunoglobulina una CDR de origen no humano (por ejemplo, una o más CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano) y una región de entramado derivada de una cadena ligera y/o pesada de origen humano (por ejemplo, anticuerpos injertados en CDR con o sin

15 cambios de entramado). En un aspecto de esta realización, la inmunoglobulina comprende las CDR de cadena ligera (CDR1, CDR2 y CDR3) y CDR de cadena pesada (CDR1, CDR2, CDR3) de una inmunoglobulina no humana. En una realización, la inmunoglobulina humanizada tiene una especificidad epitópica que es igual o similar a la del AcM 1C6. En una realización preferida, la región de unión al antígeno de la inmunoglobulina humanizada se deriva de AcM 1C6. El término anticuerpo humanizado también abarca anticuerpos de cadena sencilla. Véase, por ejemplo, Cabilly

20 et al., patente estadounidense número 4.816.567; Cabilly et al., patente europea número 0.125.023 B1; Boss et al., patente estadounidense número 4.816.397; Boss et al., patente europea número 0.120.694 B1; Neuberger, M. S. et al., documento WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., patente europea número 0.194.276 B1; Winter, patente estadounidense número 5.225.539; Winter, patente europea número 0.239.400 B1; Queen et al., patente europea número 0 451 216 B1; y Padlan, E. A. et al., documento EP 0 519 596 A1. Véase también, Newman, R. et al., BioTechnology, 10:

25 1455-1460 (1992), en cuanto a anticuerpos primatizados, y Ladner et al., patente estadounidense número 4.946.778 y Bird, R. E. et al., Science, 242: 423-426 (1988)) en cuanto a anticuerpos de cadena sencilla.

Además, también pueden producirse fragmentos funcionales de anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos químicos, humanizados, primatizados, camuflados o de cadena sencilla. Los fragmentos funcionales de los anteriores anticuerpos conservan al menos una función de unión y/o función de modulación del anticuerpo de longitud completa del que se derivan. Por ejemplo, la invención abarca fragmentos de anticuerpo que pueden unirse a una proteína CXCR3 de mamífero o parte de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂. Los fragmentos de este tipo pueden producirse mediante escisión enzimática o mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina puede generar fragmentos Fab o F(ab')₂, respectivamente. También pueden producirse anticuerpos en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de parada en sentido 5' del sitio de parada natural. Por ejemplo, puede diseñarse un gen químico que codifica para un parte de la cadena pesada F(ab')₂ para que incluya secuencias de ADN que codifican para el dominio CH₁ y la región bisagra de la cadena pesada.

45 Los anticuerpos de la presente invención son útiles en una variedad de aplicaciones, incluyendo aplicaciones de investigación, diagnósticas y terapéuticas. Por ejemplo, pueden usarse para aislar purificar y/o detectar el receptor o partes del mismo, y para estudiar la función y estructura del receptor (por ejemplo, conformación).

También pueden usarse los anticuerpos de la presente invención para modular la función del receptor en aplicaciones de investigación y terapéuticas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden actuar como inhibidores para inhibir (reducir o evitar) (a) la unión (por ejemplo, de un ligando, un segundo inhibidor o un promotor) al receptor, (b) la señalización por el receptor, y/o (c) la respuesta celular. Los anticuerpos que actúan como inhibidores de la función del receptor pueden bloquear la unión del ligando o promotor directa o indirectamente (por ejemplo, provocando un cambio conformacional en el receptor). Por ejemplo, los anticuerpos pueden inhibir la función del receptor inhibiendo la unión de un ligando, o mediante desensibilización (con o sin inhibición de la unión de un ligando). Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse como antagonistas de células efectoras tales como linfocitos T activados o estimulados y linfocitos citolíticos naturales (NK), y encuentran usos en métodos de tratamiento (incluyendo profilaxis) de enfermedades o estados que pueden tratarse con inhibidores de la función de CXCR3 tal como se describe en el presente documento. Los anticuerpos que pueden inhibir selectivamente la interacción de una proteína CXCR3 humana con IP-10 y/o inhibir selectivamente las funciones del receptor en respuesta a la misma (por ejemplo, AcM 1C6, anticuerpos que tienen una especificidad epitópica similar a la de AcM 1C6) son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por la interacción IP-10-CXCR3. Por ejemplo, estados inflamatorios tales como psoriasis, enfermedades inflamatorias del intestino, nefritis, y esclerosis múltiple pueden ser particularmente susceptibles al tratamiento.

65 De forma sorprendente, el AcM 1C6 inhibe la activación de las células T tal como se evaluó en una reacción mixta de linfocitos (MLR). Por consiguiente, el AcM 1C6 y otros anticuerpos anti-CXCR3 que pueden inhibir la activación de células T, pueden usarse para inhibir la activación de células T y su(s) función/funciones asociada(s) con

ES 2 288 305 T3

la activación, tales como producción de citocinas, destrucción por células T citotóxicas, y/o provisión de cooperación por células T. Cuando se usan en métodos de tratamiento o profilaxis tal como se describe en el presente documento, los anticuerpos de este tipo pueden tener la ventaja añadida de inhibir la activación adicional de células T. Los anticuerpos de este tipo son particularmente atractivos como agentes terapéuticos para tratar el rechazo de injertos (por ejemplo, 5 en trasplantes), incluyendo el rechazo de aloinjertos o la enfermedad injerto contra huésped, u otras enfermedades o estados en los que se desea la inhibición de la activación de células T.

Los anticuerpos que se unen al receptor también pueden actuar como agonistas de la función del receptor, desencadenando o estimulando una función del receptor, tal como señalización y/o una respuesta celular (por ejemplo, flujo 10 de calcio, quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores proinflamatorios) al unirse al receptor. Por consiguiente, pueden usarse anticuerpos de este tipo como agonistas de células efectoras tales como linfocitos T activados o estimulados y linfocitos citolíticos naturales (NK), y encuentran uso en métodos de tratamiento (incluyendo profilaxis) de enfermedades o estados que pueden tratarse con promotores de la función de CXCR3 tal como se describe en el 15 presente documento.

Además, los diversos anticuerpos de la presente invención pueden usarse para detectar o medir la expresión del receptor, por ejemplo, en leucocitos tales como células T activadas o linfocitos citolíticos naturales (células NK), o en 20 células transfectadas con un gen del receptor. Por tanto, también tienen utilidad en aplicaciones tales como clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia), con fines diagnósticos o de investigación.

También se proporcionan anticuerpos anti-idiotípicos. Los anticuerpos anti-idiotípicos reconocen los determinantes antigenicos asociados al sitio de unión a antígeno de otro anticuerpo. Los anticuerpos anti-idiotípicos pueden 25 prepararse frente a un primer anticuerpo inmunizando un animal de la misma especie, y preferiblemente de la misma cepa que el animal usado para producir el primer anticuerpo, con dicho primer anticuerpo. Véase por ejemplo, la patente estadounidense número 4.699.880.

En una realización, los anticuerpos se preparan frente al receptor o una parte del mismo, y estos anticuerpos se usan a su vez como inmunógenos para producir un anticuerpo anti-idiotípico. Los anti-Id producidos de este modo, 30 pueden imitar al receptor y unirse a compuestos que se unen al receptor, tales como ligandos, inhibidores o promotores de la función del receptor, y pueden usarse en un inmunoensayo para detectar, identificar o cuantificar compuestos de este tipo. Un anticuerpo anti-idiotípico de este tipo también puede ser un inhibidor de la función del receptor, aunque no se une por sí mismo al receptor.

Un anticuerpo anti-idiotípico (es decir, anti-Id) puede usarse por si mismo para generar un anticuerpo anti-anti-idiotípico (es decir, anti-anti-Id). Un anticuerpo de este tipo puede ser similar o idéntico en especificidad al anticuerpo de inmunización original. En una realización, pueden usarse antagonistas de anticuerpo que bloquean la unión al receptor para generar anti-Id, y el anti-Id puede usarse para generar anti-anti-Id, que puede tener una especificidad que es similar a la del antagonista de anticuerpo. Estos anticuerpos anti-anti-Id pueden evaluarse para determinar su efecto 40 inhibidor sobre la función del receptor para determinar si son antagonistas.

Pueden prepararse anticuerpos anti-idiotípicos de cadena sencilla y químéricos, humanizados, primatizados (injertados en CDR), camuflados, así como de cadena sencilla químéricos, injertados en CDR o camuflados, y se engloban 45 en el término anticuerpo anti-idiotípico. También pueden prepararse fragmentos de anticuerpo de los anticuerpos de este tipo.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención pueden modificarse, por ejemplo, mediante incorporación o unión (directa o indirectamente) de una etiqueta detectable tal como un radioisótopo, marcador de espín, etiqueta enzimática o antígeno, grupo fluorescente o quimioluminiscente y similares, y las formas modificadas de este tipo se incluyen dentro del alcance de la invención.

Identificación de ligandos, inhibidores o promotores de la función del receptor

Tal como se usa en el presente documento, un ligando es una sustancia que se une a una proteína receptora. Un 55 ligando de una proteína CXCR3 de mamífero seleccionada es una sustancia que se une a la proteína CXCR3 de mamífero seleccionada. En una realización preferida, la unión a ligando de una proteína CXCR3 de mamífero se produce con alta afinidad. El término ligando se refiere a sustancias que incluyen, pero no se limitan a, un ligando natural, ya sea aislado y/o purificado, sintético, y/o recombinante, un homólogo de un ligando natural (por ejemplo, a partir de otro mamífero), anticuerpos, partes de moléculas de este tipo y otras sustancias que se unen al receptor. 60 Un ligando natural de un receptor de mamífero seleccionado puede unirse al receptor en condiciones fisiológicas, y es de origen de un mamífero que es el mismo que el de la proteína CXCR3 de mamífero. El término ligando abarca sustancias que son inhibidoras o promotoras de la actividad del receptor, así como sustancias que se unen selectivamente al receptor, pero que carecen de actividad inhibidora o promotora.

Tal como se usa en el presente documento, un inhibidor es una sustancia que inhibe al menos una función característica de una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, un CXCR3 humano), tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión a ligando, unión a promotor), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamífero, inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico $[Ca^{+2}]_i$), y/o

ES 2 288 305 T3

función de respuesta celular (por ejemplo, estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por leucocitos). El término inhibidor se refiere a sustancias que incluyen antagonistas que se unen al receptor (por ejemplo, un anticuerpo, un mutante de un ligando natural, otros inhibidores competitivos de la unión a ligando), y sustancias que inhiben la función del receptor sin unirse al mismo (por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico).

5 Tal como se usa en el presente documento, un promotor es una sustancia que promueve (induce o potencia) al menos una función característica de una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, un CXCR3 humano), tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión a ligando, inhibidor y/o promotor), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamífero, inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración 10 de calcio libre citosólico $[Ca^{2+}]_i$), y/o una función de respuesta celular (por ejemplo, estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por leucocitos). El término promotor se refiere a sustancias que incluyen agonistas que se unen al receptor (por ejemplo, un anticuerpo, un homólogo de un ligando natural de otra especie), y sustancias que promueven la función del receptor sin unirse al mismo (por ejemplo, activando una proteína asociada). En una realización preferida, el agonista es distinto de un homólogo de un ligando natural.

15 Los ensayos descritos a continuación, que se basan en los ácidos nucleicos y proteínas descritos en el presente documento, pueden usarse, solos o en combinación entre sí o con otros métodos adecuados, para identificar ligandos, inhibidores o promotores de una proteína CXCR3 de mamífero o variante. Pueden adaptarse métodos *in vitro* para la selección de alto rendimiento en la que se procesan grandes números de muestras (por ejemplo, un formato de 96 20 pocillos). Pueden usarse células huésped que comprenden un ácido nucleico de la presente invención y que expresan CXCR3 de mamífero recombinante (por ejemplo, CXCR3 humano) en niveles adecuados para la selección de alto rendimiento, y por tanto, son particularmente valiosas en la identificación y/o aislamiento de ligandos, inhibidores y promotores de proteínas CXCR3 de mamífero. Puede monitorizarse de una variedad de formas. Por ejemplo, puede monitorizarse la expresión usando anticuerpos de la presente invención que se unen al receptor o a partes del mismo. 25 Además, pueden usarse anticuerpos comercialmente disponibles para detectar la expresión de una proteína de fusión marcada con epítopo o antígeno que comprende una proteína o polipéptido receptor (por ejemplo, receptores marcados con FLAG), y pueden seleccionarse células que expresan el nivel deseado.

30 Puede incorporarse un ácido nucleico que codifica para una proteína CXCR3 de mamífero en un sistema de expresión para producir una proteína o polipéptido receptor tal como se describió anteriormente. Puede usarse una proteína o polipéptido receptor aislado y/o recombinante, tal como un receptor expresado en células transfectadas de forma estable o transitoria con un constructo que comprende un ácido nucleico de la presente invención, o en una fracción 35 celular que contiene el receptor (por ejemplo, una fracción de membrana de células transfectadas, liposomas que incorporan el receptor), en pruebas para determinar la función del receptor. Puede purificarse adicionalmente el receptor si se desea. Las pruebas de la función del receptor pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*.

40 En el presente método puede usarse una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante, tal como un CXCR3 humano tal como se muestra en la figura 2 (SEQ ID NO: 2), en el que se evalúa el efecto de un compuesto monitorizando la función de receptor tal como se describe en el presente documento o usando otras técnicas adecuadas. 45 Por ejemplo, pueden usarse en ensayos de unión transfectantes estables o transitorios tales como los que se describen en el ejemplo 2 u otras células adecuadas (por ejemplo, células Sf9 infectadas por baculovirus, transfectantes estables de células pre-B L1-2 de ratón (derivadas de un linfoma pre-B, Dr. Eugene Butcher (Universidad de Stanford, Stanford, CA)). Pueden usarse transfectantes estables de células Jurkat (ejemplo 2) o de otras células adecuadas que pueden realizar quimiotaxis (por ejemplo, células pre-B L1-2 de ratón) en ensayos de quimiotaxis, por ejemplo.

45 Según el método de la presente invención, los compuestos pueden seleccionarse individualmente o pueden someterse a prueba uno o más compuestos simultáneamente según los métodos del presente documento. Cuando se somete a prueba una mezcla de compuestos, pueden separarse los compuestos seleccionados mediante los procedimientos 50 descritos (según sea apropiado) e identificarse mediante métodos adecuados (por ejemplo, PCR, secuenciación, cromatografía). También puede determinarse la presencia de uno o más compuestos (por ejemplo, un ligando, inhibidor, promotor) en una muestra de prueba según estos métodos.

55 Pueden someterse a prueba grandes bibliotecas combinatorias de compuestos (por ejemplo, compuestos orgánicos, péptidos recombinantes o sintéticos, "peptoides", ácidos nucleicos) producidos mediante síntesis química combinatoria u otros métodos (véase por ejemplo, Zuckerman, R. N. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 37: 2678-2685 (1994) y bibliografía citada en el mismo; véase también, Ohlmeyer, M. H. J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10922-10926 (1993) y DeWitt, S. H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913 (1993), en cuanto a compuestos marcados; Rutter, W. J. *et al.*, patente estadounidense número 5.010.175; Huebner, V. D. *et al.*, patente estadounidense número 5.182.366; y Geysen, H. M., patente estadounidense número 4.833.092). Cuando los compuestos seleccionados de una biblioteca combinatoria mediante el presente método llevan etiquetas únicas, es posible la identificación de compuestos individuales mediante métodos cromatográficos.

60 En una realización, se usa metodología de presentación en fagos. Por ejemplo, puede ponerse en contacto un receptor con un fago (por ejemplo, un fago o colección de fagos tal como una biblioteca) que presenta un polipéptido en condiciones apropiadas para la unión al receptor (por ejemplo, en un tampón de unión adecuado). Puede seleccionarse el fago unido al receptor usando técnicas convencionales u otros métodos adecuados. Puede separarse el fago del receptor usando un tampón de elución adecuado. Por ejemplo, un cambio en la fuerza iónica o el pH pueden conducir a la liberación del fago. Alternativamente, el tampón de elución puede comprender un componente o componentes

de liberación diseñado(s) para interrumpir la unión de compuestos (por ejemplo, uno o más compuestos que pueden interrumpir la unión del péptido presentado al receptor, tales como un ligando, inhibidor, y/o promotor que inhibe la unión de forma competitiva). Opcionalmente, puede repetirse el procedimiento de selección o puede usarse otra etapa de selección para enriquecer adicionalmente en el fago que se une al receptor. Puede caracterizarse el polipéptido presentado (por ejemplo, secuenciando el ADN del fago). Los polipéptidos identificados pueden producirse y someterse a pruebas adicionales para determinar la función de unión a ligando, inhibidora y/o promotora. Pueden producirse análogos de péptidos de este tipo que tienen una estabilidad aumentada u otras propiedades deseables.

En una realización, pueden producirse proteínas de fusión de presentación y expresión en fagos que comprenden una proteína de recubrimiento con un péptido N-terminal codificado por ácidos nucleicos de secuencia aleatoria. Las células huésped adecuadas que expresan una proteína o polipéptido receptor de la presente invención se ponen en contacto con el fago, se seleccionan los fagos unidos, se recuperan y se caracterizan. (Véase por ejemplo, Doorbar, J. y G. Winter, *J. Mol. Biol.*, 244: 361 (1994) que trata un procedimiento de presentación en fagos usado con un receptor acoplado a proteínas G).

Otras fuentes de posibles ligandos, inhibidores y/o promotores de proteínas CXCR3 de mamífero incluyen, pero no se limitan a, variantes de ligandos de CXCR3, incluyendo variantes que se producen de forma natural, sintéticas o recombinantes de IP-10 o Mig, sustancias tales como otros quimiotácticos o quimiocinas, variantes de las mismas, otros inhibidores y/o promotores (por ejemplo, anticuerpos anti-CXCR3, antagonistas, agonistas), otros ligandos, inhibidores y/o promotores de receptores acoplados a proteínas G (por ejemplo, antagonistas o agonistas), y partes solubles de un receptor CXCR3 de mamífero, tales como un péptido receptor adecuado o análogo que puede inhibir la función del receptor (véase por ejemplo, Murphy, R. B., documento WO 94/05695).

Ensayos de unión

Las proteínas receptoras aisladas y/o recombinantes o variantes funcionales de las mismas, incluyendo partes de las mismas o proteínas de fusión adecuadas, pueden usarse en un método para seleccionar e identificar agentes que se unen a una (una o más) proteína CXCR3 de mamífero, tales como CXCR3 humano, y que son ligandos, o posibles inhibidores o promotores de la actividad del receptor. Los agentes seleccionados por el método, incluyendo ligandos, inhibidores o promotores, pueden evaluarse adicionalmente para determinar un efecto inhibidor y/o estimulante sobre la función del receptor y/o para determinar su utilidad terapéutica.

En una realización, se identifica por el método un agente que se une a una proteína o polipéptido CXCR3 de mamífero aislado y/o recombinante, activo. En esta realización, la proteína o polipéptido receptor usado tiene al menos una propiedad, actividad o función característica de una proteína CXCR3 de mamífero (tal como se define en el presente documento), tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión a ligando, inhibidor y/o promotor), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamífero, inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico [Ca²⁺]), función de respuesta celular (por ejemplo, estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por leucocitos), y/o una propiedad inmunológica tal como se define en el presente documento. En una realización preferida, la proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o variantes tiene función de unión a ligando, y más preferiblemente se une a un ligando natural del receptor. En una realización particularmente preferida, la proteína aislada y/o recombinante es una proteína CXCR3 humana codificada por el ácido nucleico ilustrado en la figura 1 (SEQ ID NO: 1).

Por ejemplo, una composición que comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o variante de la misma puede mantenerse en condiciones adecuadas para la unión, el receptor puede ponerse en contacto con un agente (por ejemplo, una composición que comprende uno o más agentes) que va a someterse a prueba, y se detecta o se mide la unión. En una realización, puede expresarse una proteína receptora en células transfectadas de forma estable o transitoria con un constructo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un receptor de la presente invención. Pueden mantenerse las células en condiciones apropiadas para la expresión del receptor. Se ponen en contacto las células con un agente en condiciones adecuadas para la unión (por ejemplo, en un tampón de unión adecuado), y puede detectarse la unión mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, puede determinarse el grado de unión con respecto a un control adecuado (por ejemplo, por ejemplo en comparación con el fondo determinado en ausencia de agente, en comparación con la unión de un segundo agente (es decir, un patrón), en comparación con la unión del agente a las células sin transfectar). Opcionalmente, puede usarse una fracción celular, tal como una fracción de membrana, que contiene el receptor en lugar de las células completas.

Puede detectarse la unión o formación de complejo directa o indirectamente. En una realización, puede marcarse el agente con una etiqueta adecuada (por ejemplo, etiqueta fluorescente, etiqueta quimioluminiscente, etiqueta isotópica, etiqueta enzimática), y puede determinarse la unión mediante la detección de la etiqueta. Puede evaluarse la especificidad de la unión mediante competencia o desplazamiento, por ejemplo, usando un ligando o un agente sin marcar (por ejemplo, IP-10, Mig) como competidor.

Pueden identificarse de esta manera ligandos del receptor de mamífero, incluyendo ligandos naturales de la misma especie de mamífero o de otras especies. También puede evaluarse la actividad de unión de un promotor o inhibidor que se une a un receptor usando un ensayo de unión a ligando de este tipo.

ES 2 288 305 T3

También pueden usarse ensayos de inhibición de la unión para identificar ligandos, e inhibidores y promotores que se unen al receptor e inhiben la unión de otro agente tal como un ligando. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de unión en el que se detecta o se mide una reducción en la unión de un primer agente (en ausencia de un segundo agente), en comparación con la unión del primer agente en presencia del segundo agente de prueba. Puede ponerse en contacto el receptor con el primer y segundo agente simultáneamente, o uno después del otro, en cualquier orden. Una reducción en el grado de unión del primer agente en presencia del segundo agente de prueba, es indicativa de inhibición de la unión por el segundo agente. Por ejemplo, puede reducirse o suprimirse la unión del primer agente.

En una realización, se monitoriza la inhibición directa de la unión de un primer agente (por ejemplo, una quimiocina

tal como IP-10, Mig) a un CXCR3 humano por un segundo agente de prueba. Por ejemplo, puede monitorizarse la capacidad de un agente para inhibir la unión de Mig marcada con ^{125}I a CXCR3 humano. Puede realizarse un ensayo de este tipo usando células completas (por ejemplo, una línea celular adecuada que contiene un ácido nucleico que codifica para un receptor CXCR3 humano), o una fracción de membrana de dichas células, por ejemplo.

Están disponibles otros métodos para identificar la presencia de un(os) agente(s) que se une(n) al receptor, tales como métodos que monitorizan acontecimientos que se desencadenan mediante la unión al receptor, incluyendo función de señalización y/o estimulación de una respuesta celular.

Se entenderá que el efecto inhibidor de los anticuerpos de la presente invención puede evaluarse en un ensayo de inhibición de la unión. También puede evaluarse la competencia entre anticuerpos por la unión al receptor en el método en el que el primer agente del ensayo es otro anticuerpo, en condiciones adecuadas para la unión de anticuerpos.

Los ligandos, inhibidores y promotores de la unión al receptor, que se identifican de esta manera, pueden evaluarse adicionalmente para determinar si, posteriormente a la unión, actúan inhibiendo o activando otras funciones de los receptores CXCR3 y/o evaluar su utilidad terapéutica.

Ensayos de señalización

La unión de un receptor acoplado a proteínas G (por ejemplo, por un agonista) puede dar como resultado la señalización por el receptor, y la estimulación de la actividad de proteínas G. La inducción de la función de señalización por un agente puede monitorizarse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede someterse a ensayo la actividad de las proteínas G, tal como hidrólisis de GTP en GDP, o acontecimientos de señalización posteriores desencadenados por la unión al receptor, tales como inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre intracelular (citosólico) $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mediante métodos conocidos en la técnica u otros métodos adecuados (ejemplo 2; véase también, Neote, K. *et al.*, *Cell*, 72: 415-425 1993); Van Riper *et al.*, *J. Exp. Med.*, 177: 851-856 (1993); Dahinden, C. A. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 179: 751-756 (1994)).

También puede usarse el ensayo funcional de Sledziewski *et al.* usando receptores acoplados a proteínas G híbridos para identificar un ligando o promotor mediante su capacidad para activar una proteína G híbrida o para identificar un inhibidor mediante su capacidad para inhibir tal activación (Sledziewski *et al.*, patente estadounidense número 5.284.746, cuyas enseñanzas se incorporan al presente documento como referencia). En una realización, puede monitorizarse una respuesta biológica de la célula huésped (desencadenada por la unión al receptor híbrido), siendo la detección de la respuesta indicativa de la presencia de un ligando en la muestra de prueba. Por ejemplo, se describe un método para detectar la presencia de un ligando en una muestra de prueba, en el que el ligando es un agente que puede unirse por el dominio de unión a ligando de un receptor. En una realización del método, se transforman células huésped de levadura transformadas con un constructo de ADN que pueden dirigir la expresión de un receptor acoplado a proteínas G híbridos biológicamente activo (es decir, una proteína de fusión). El receptor híbrido comprende un receptor acoplado a proteínas G de mamífero que tiene al menos un dominio distinto al dominio de unión a ligando sustituido por un dominio correspondiente de un receptor acoplado a proteínas G de levadura, tal como un producto genético STE2. Las células huésped de levadura que contienen el constructo se mantienen en condiciones en las que se expresa el receptor híbrido, y se ponen en contacto las células con una muestra de prueba en condiciones adecuadas para permitir la unión del ligando al receptor híbrido. Se monitoriza una respuesta biológica de la célula huésped (desencadenada por la unión al receptor híbrido), siendo la detección de la respuesta indicativa de una función de señalización. Por ejemplo, la unión a un receptor híbrido derivado del producto genético STE2 puede conducir a la inducción del promotor BAR1. Puede medirse la inducción del promotor por medio de un gen indicador (por ejemplo, β -gal), que está unido al promotor BAR1 y se introduce en células huésped en un segundo constructo. Puede detectarse la expresión del gen indicador mediante un ensayo enzimático *in vitro* en lisados celulares o por la presencia de colonias azules en placas que contienen un indicador (por ejemplo, X-gal) en el medio, por ejemplo.

En otra realización, puede usarse el ensayo para identificar posibles inhibidores de la función del receptor. Puede determinarse la actividad inhibidora de un agente usando un ligando o promotor en el ensayo, y evaluando la capacidad del agente de prueba para inhibir la actividad inducida por el ligando o promotor.

También pueden examinarse variantes de ligandos conocidos para seleccionar la capacidad reducida (capacidad disminuida o sin capacidad) para estimular la actividad de una proteína G acoplada. En esta realización, aunque el agente tiene actividad de unión a ligando (según se determinó mediante otro método), la unión al receptor no desencadena o sólo desencadena débilmente la actividad de una proteína G acoplada. Los agentes de este tipo son posibles antagonistas, y pueden evaluarse adicionalmente para determinar su actividad inhibidora.

ES 2 288 305 T3

Quimiotaxis y otros ensayos de respuestas celulares

También pueden usarse ensayos de quimiotaxis para evaluar la función del receptor. Estos ensayos se basan en la migración funcional de células *in vitro* o *in vivo* inducida por un agente, y pueden usarse para evaluar la unión y/o efecto sobre la quimiotaxis de ligandos, inhibidores, o promotores.

El uso de un ensayo de quimiotaxis *in vitro* para evaluar la respuesta de células a IP-10 y Mig se describe en el ejemplo 2. Springer *et al.* describe un ensayo de quimiotaxis de linfocitos transendotelial (Springer *et al.*, documento WO 94/20142, publicado el 15 de septiembre de 1994, cuyas enseñanzas se incorporan al presente documento como referencia; véase también Berman *et al.*, Immunol Invest., 17: 625-677 (1988)). También se ha descrito la migración a través de endotelio hacia geles de colágeno (Kavanaugh *et al.*, J. Immunol, 146: 4149-4156 (1991)).

Generalmente, los ensayos de quimiotaxis monitorizan el movimiento direccional o migración de una célula adecuada que puede realizar quimiotaxis, tal como un leucocito (por ejemplo, linfocitos T, células NK, monocitos), transflectantes estables de células Jurkat, células pre-B L1-2 de ratón u otras células huésped adecuadas, por ejemplo, dentro, o a través, de una barrera (por ejemplo, endotelio, un filtro), hacia niveles aumentados de un agente, desde una primera superficie de la barrera hacia una segunda superficie opuesta. Las membranas o filtros proporcionan barreras convenientes, de forma que se monitoriza el movimiento direccional o migración de una célula adecuada dentro, o a través, de un filtro, hacia niveles aumentados de un agente, desde una primera superficie del filtro, hacia una segunda superficie opuesta del filtro. En algunos ensayos, se recubre la membrana con una sustancia para facilitar la adhesión, tal como ICAM-1, fibronectina o colágeno.

Por ejemplo, puede detectarse o medirse la migración de células en un recipiente adecuado (un medio de contención), desde una primera cámara dentro, o a través, de una membrana microporosa dentro de una segunda cámara que contiene un agente que va a someterse a prueba, y que está separada de la primera cámara mediante la membrana. Se selecciona una membrana adecuada, que tiene un tamaño de poro adecuado para monitorizar la migración específica en respuesta al agente, incluyendo, por ejemplo, nitrocelulosa, policarbonato. Por ejemplo, pueden usarse tamaños de poro de aproximadamente 3-8 micras, y preferiblemente de aproximadamente 5-8 micras. El tamaño de poro puede ser uniforme en un filtro o estar dentro de un intervalo de tamaños de poro adecuados.

Para evaluar la migración, pueden determinarse la distancia de migración en el filtro, el numero de células que cruzan el filtro que permanecen adheridas a la segunda superficie del filtro, y/o el número de células que se acumulan en la segunda cámara usando técnicas convencionales (por ejemplo, mediante microscopía). En una realización, se marcan las células con una etiqueta detectable (por ejemplo, radioisótopo, etiqueta fluorescente, etiqueta de antígeno o epítopo), y puede evaluarse la migración determinando la presencia de la etiqueta adherente a la membrana y/o presente en la segunda cámara usando un método apropiado (por ejemplo, detectando radioactividad, fluorescencia, inmunoensayo). Puede determinarse el grado de migración inducido por un agente con respecto a un control adecuado (por ejemplo, comparada con la migración de fondo determinada en ausencia del agente, frente al grado de migración inducido por un segundo agente (es decir, un patrón), en comparación con la migración de células sin transfectar inducida por el agente).

Pueden formarse cámaras a partir de diversos sólidos tales como plástico, vidrio, polipropileno, poliestireno, etc. Las membranas que pueden despegarse de las cámaras, tales como un inserto de cultivo Biocoat (Collaborative Bio-medical Products) o Transwell (Costar, Cambridge, MA), facilitan el recuento de células adherentes. En el recipiente puede situarse el filtro de tal modo que esté en contacto con el líquido que contiene las células en la primera cámara, y el líquido de la segunda cámara. Aparte del agente de prueba o ligando, inhibidor, o promotor adicional presente para el fin del ensayo, el líquido de cualquier lado de la membrana es preferiblemente el mismo o sustancialmente similar. El líquido en las cámaras puede comprender soluciones de proteínas (por ejemplo, albúmina sérica bovina, suero de ternero fetal, albúmina sérica humana) que puede actuar aumentando la estabilidad e inhibiendo la unión inespecífica de células y/o medios de cultivo.

En una realización, se evalúa la migración transendotelial. Además de reducir el fondo (razón de la señal con respecto al ruido), la migración endotelial sirve de modelo de las condiciones *in vivo* en las que los leucocitos migran desde los vasos sanguíneos hacia los quimiotácticos presentes en los tejidos en los sitios de inflamación cruzando la capa de células endoteliales que revisten la pared del vaso. En esta realización, se evaluó la transmigración a través de una capa de células endoteliales. Para preparar la capa de células pueden cultivarse células endoteliales en un filtro o membrana microporosa, opcionalmente recubierta con una sustancia tal como colágeno, fibronectina, u otras proteínas de la matriz extracelular, para facilitar la unión de las células endoteliales. Preferiblemente, se cultivan las células endoteliales hasta que se forma una monocapa confluyente. Puede estar disponible una variedad de células endoteliales para la formación de monocapas por ejemplo, endotelios venoso, arterial o microvascular, tales como células endoteliales de la vena umbilical humana (Clonetics Corp, San Diego, CA) o una línea celular adecuada, tal como la línea celular ECV 304 usada (Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Porton Down, Salisbury, R. U.). Para someter a ensayo la quimiotaxis en respuesta a un receptor de mamífero particular se prefieren las células endoteliales del mismo mamífero; sin embargo, también pueden usarse células endoteliales de especies o géneros heterólogos de mamíferos.

Generalmente, se realiza el ensayo detectando la migración direccional de células dentro o a través de una membrana o filtro, en una dirección que va hacia niveles aumentados de agente, desde una primera superficie del filtro

ES 2 288 305 T3

hacia una segunda superficie opuesta del filtro, en el que el filtro contiene una capa de células endoteliales sobre una primera superficie. La migración direccional se produce desde la zona adyacente a la primera superficie, dentro o a través de la membrana, hacia un agente situado en el lado opuesto del filtro. La concentración de agente presente en la zona adyacente a la segunda superficie, es mayor que la de la zona adyacente a la primera superficie.

- 5 En una realización, se usa un ensayo de quimiotaxis para someter a prueba la actividad de ligando o promotor de un agente, se coloca una composición que comprende células que pueden someterse a migración y que expresan una proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional de la misma en la primera cámara, y se coloca una composición que comprende el agente (uno o más agentes) que va a someterse a prueba en la segunda cámara, preferiblemente en ausencia de otros ligandos o promotores que pueden inducir quimiotaxis de las células de la primera cámara (que tienen función quimiotáctica). Sin embargo, pueden estar presentes uno o más ligandos o promotores que tienen función quimiotáctica. La capacidad de un agente para inducir quimiotaxis de las células que expresan un receptor CXCR3 de mamífero en este ensayo es indicativa de que el agente es un ligando o promotor de la función del receptor.
- 10 15 En una realización usada para someter a prueba un inhibidor, se coloca una composición que comprende células que pueden someterse a migración que expresan una proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional en la primera cámara. Se coloca una composición que comprende un ligando o promotor (es decir, uno o más ligandos o promotores) que puede inducir quimiotaxis de las células de la primera cámara (que tiene función quimiotáctica) en la segunda cámara. Antes (preferiblemente poco antes) de colocar las células en la primera cámara o simultáneamente a las 20 células, se coloca una composición que comprende el agente que va a someterse a prueba, preferiblemente, en la primera cámara. La capacidad de un agente para inhibir la quimiotaxis inducida por ligando o promotor de las células que expresan una proteína CXCR3 de mamífero en este ensayo es indicativa de que el agente es un inhibidor de la función del receptor (por ejemplo, un inhibidor de la función de respuesta celular). Una reducción en el grado de migración inducida por el ligando o promotor en presencia del agente de prueba, es indicativa de actividad inhibidora.
- 25 30 25 Pueden llevarse a cabo estudios de unión por separado (véase anteriormente) para determinar si la inhibición es un resultado de la unión del agente de prueba al receptor o se produce mediante un mecanismo diferente.

A continuación se describen ensayos *in vivo* que monitorizan la infiltración de leucocitos de un tejido, en respuesta a la inyección de un agente en el tejido. Estos modelos miden la capacidad de las células para responder a un ligando o promotor mediante migración y quimiotaxis a un sitio de inflamación.

Pueden evaluarse los efectos de un ligando, inhibidor o promotor sobre la función de respuesta celular de un receptor CXCR3 monitorizando otras respuestas celulares inducidas por receptores activos, usando células huésped adecuadas que contienen el receptor. De forma similar, pueden usarse estos ensayos para determinar la función de un receptor. Por ejemplo, puede monitorizarse la exocitosis (por ejemplo, desgranulación de linfocitos citolíticos naturales que conduce a la liberación de una o más enzimas u otros componentes granulares, tales como esterasas (por ejemplo, serina esterasas), perforina, y/o granzimas), liberación de mediadores inflamatorios (tales como liberación de lípidos bioactivos tales como leucotrienos (por ejemplo, leucotrieno C₄)), y explosión respiratoria, mediante métodos conocidos en la técnica u otros métodos adecuados (véase por ejemplo, Taub, D. D. *et al.*, J. Immunol., 155: 3877-3888 (1995), en cuanto a ensayos para determinar la liberación de serina esterasas derivadas de gránulos (cuyas enseñanzas se incorporan al presente documento como referencia) y Loetscher *et al.*, J. Immunol., 156: 322-327 (1996), en cuanto a ensayos para determinar la liberación de enzimas y granzima por células NK y linfocitos T citotóxicos (LTC) (cuyas enseñanzas se incorporan al presente documento como referencia); Rot, A. *et al.*, J. Exp. Med., 176: 1489-1495(1992) en cuanto a explosión respiratoria; Bischoff, S. C. *et al.*, Eur. J. Immunol., 23: 761-767 (1993) y Baggiolini, M. y C. A. Dahinden, Inmunology Today, 15: 127-133 (1994)).

En una realización, se identifica un ligando, inhibidor y/o promotor monitorizando la liberación de una enzima en la desgranulación o exocitosis por una célula que puede realizar esta función. Las células que contienen un ácido nucleico de la presente invención, que codifica para una proteína receptora activa que puede estimular la exocitosis o desgranulación se mantienen en un medio adecuado en condiciones adecuadas, mediante las que se expresa el receptor y puede inducirse la desgranulación. El receptor se pone en contacto con un agente que va a someterse a prueba, y se evalúa la liberación de enzimas. Puede detectarse o medirse la liberación de una enzima en un medio usando un ensayo adecuado, tal como un ensayo inmunológico, o un ensayo bioquímico para determinar la actividad enzimática.

55 55 El medio puede someterse a prueba directamente, introduciendo componentes del ensayo (por ejemplo, sustrato, cofactores, anticuerpos) en el medio (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de que se combinan las células y el agente). Alternativamente, puede llevarse a cabo el ensayo en un medio que se ha separado de las células o se ha procesado adicionalmente (por ejemplo, fraccionado) previamente al ensayo. Por ejemplo, están disponibles ensayos convenientes para ello para enzimas tales como serina esterasas (véase por ejemplo, Taub, D. D. *et al.*, J. Immunol., 155: 3877-3888 (1995) en cuanto a liberación de serina esterasas derivadas de gránulos).

La estimulación de la desgranulación por un agente puede ser indicativa de que el agente es un ligando o promotor de una proteína CXCR3 de mamífero. En otra realización, se combinan células que expresan el receptor con un ligando o promotor, y se añade un agente que va a someterse a prueba antes, después o simultáneamente a los mismos, y se evalúa la desgranulación. La inhibición de la desgranulación inducida por ligando o promotor es indicativa de que el agente es un inhibidor de la función de la proteína CXCR3 de mamífero.

ES 2 288 305 T3

También puede monitorizarse la adherencia celular por métodos conocidos en la técnica u otros métodos adecuados. La activación de los receptores de quimiocinas de un linfocito puede provocar activación de integrinas, e inducción de adherencia a moléculas de adhesión expresadas en la vasculatura o el espacio perivascular. En una realización, se identifica un ligando, inhibidor y/o promotor monitorizando la adherencia celular por una célula que puede adherirse.

- 5 Por ejemplo, puede combinarse un agente que va a someterse a prueba con (a) células que expresan el receptor (preferiblemente células no adherentes que adquieren la capacidad de adherirse cuando se transfecutan con receptor), (b) una composición que comprende una molécula de adhesión adecuada (por ejemplo, un sustrato tal como un pocillo de cultivo recubierto con una molécula de adhesión, tal como fibronectina), y (c) un ligando o promotor (por ejemplo, agonista), y se mantiene en condiciones adecuadas para la adhesión inducida por ligando o promotor. El marcaje de 10 células con un colorante fluorescente proporciona un medio conveniente para detectar células adherentes. Las células no adherentes pueden eliminarse (por ejemplo, lavando) y puede determinarse el número de células adherentes. El efecto del agente en la inhibición o potenciación de la adhesión inducida por ligando o promotor puede ser indicativo de actividad inhibidora o promotora, respectivamente. Los principios activos en el ensayo incluyen inhibidores y 15 promotores de la unión, señalización, y/o respuestas celulares. En otra realización, puede combinarse un agente que va a someterse a prueba con células que expresan el receptor y una composición que comprende a una molécula de adhesión adecuada en condiciones adecuadas para la adhesión inducida por ligando o promotor, y se monitoriza la adhesión. Un aumento de la adhesión con respecto a un control adecuado es indicativo de la presencia de un ligando y/o promotor.

20 Modelos de inflamación

Está disponible una variedad de modelos de inflamación *in vivo*, que pueden usarse para evaluar los efectos de los ligandos, inhibidores, o promotores *in vivo* como agentes terapéuticos, incluyendo un modelo de oveja para el 25 asma (véase por ejemplo, Weg, V. B. *et al.*, J. Exp. Med., 177: 561 (1993)), un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado de rata (Rand, M. L. *et al.*, Am. J. Pathol., 148: 855-864(1996)), u otros modelos adecuados. Puede evaluarse la actividad de los anticuerpos que tienen reacción cruzada con otras proteínas CXCR3 de mamífero en mamíferos de este tipo.

Además, puede monitorizarse la infiltración de leucocitos tras inyección intradérmica de un compuesto en un 30 animal adecuado, tales como conejo, rata, o cobaya, (véase por ejemplo, Van Damme J. *et al.*, J. Exp. Med., 176: 59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. *et al.*, J. Exp. Med., 171: 2177-2182 (1990); Jose, P. J. *et al.*, J. Exp. Med., 179: 881-887 (1994)). En una realización, se evalúan histológicamente biopsias de piel para determinar la infiltración de leucocitos (por ejemplo, linfocitos T, monocitos, linfocitos citolíticos naturales). En otra realización, se administran al animal 35 células marcadas (por ejemplo, células que expresan una proteína CXCR3 de mamífero que están marcadas con ¹¹¹In, por ejemplo) que pueden realizar quimiotaxis y extravasación. La infiltración de células marcadas en los alrededores del sitio de la inyección de una muestra de prueba (por ejemplo, un compuesto que va a someterse a prueba en un tampón o vehículo fisiológico adecuado) es indicativa de la presencia de un ligando o promotor, tales como un agonista, en la muestra. También pueden modificarse estos ensayos para identificar inhibidores de la quimiotaxis y 40 extravasación de leucocitos. Por ejemplo, puede administrarse un inhibidor, o bien antes, simultáneamente con o bien después de administrarse un ligando o agonista al animal de prueba. Un descenso en el grado de infiltración en presencia del inhibidor en comparación con el grado de infiltración en ausencia del inhibidor es indicativo de inhibición.

Aplicaciones diagnósticas

45 La presente invención tiene una variedad de aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, una(s) mutación/mutaciones en un gen que codifica para una proteína CXCR3 de mamífero puede provocar un defecto en al menos una función del receptor codificado, reduciendo o potenciando de este modo la función del receptor. Por ejemplo, una mutación que produce una variante del receptor o altera el nivel de expresión, puede reducir o potenciar la función del receptor, 50 reduciendo o potenciando los procesos mediados por el receptor (por ejemplo, procesos inflamatorios). La presencia de una mutación de este tipo puede determinarse usando métodos que detectan o miden la presencia del receptor o función del receptor en células (por ejemplo, leucocitos, tales como linfocitos T activados) de un individuo o en una preparación de receptor aislado a partir de células de este tipo. En estos ensayos, puede evaluarse la reducción o aumento de los niveles del receptor y/o la reducción o aumento de la función del receptor.

55 Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento proporcionan reactivos, tales como sondas y cebadores para PCR, que pueden usarse para seleccionar, caracterizar y/o aislar un gen de CXCR3 de mamífero defectuoso, que codifica para un receptor que tiene actividad reducida o aumentada. Pueden emplearse métodos convencionales de exploración para seleccionar un gen defectuoso, por ejemplo. Puede aislarse un gen defectuoso y expresarse en una célula huésped adecuada para la evaluación adicional tal como se describe en el presente documento para las proteínas CXCR3 de mamífero: varias enfermedades humanas se asocian a defectos en la función de un receptor acoplado a proteínas G (Clapham, D. E., Cell, 75: 1237-1239 (1993); Lefkowitz, R. J., Nature, 365: 603-04 (1993)).

60 Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento proporcionan reactivos, tales como sondas y cebadores para PCR, que también pueden usarse para evaluar la expresión del receptor (por ejemplo, detectando la transcripción del ARNm) por células en una muestra (por ejemplo, mediante análisis de transferencia de tipo Northern, mediante hibridación *in situ*). Por ejemplo, puede evaluarse la expresión en linfocitos T activados u otros tipos celulares.

ES 2 288 305 T3

Los anticuerpos de la presente invención tienen aplicación en procedimientos en los que puede detectarse el receptor sobre la superficie de las células. El receptor proporciona un marcador de los tipos celulares de leucocitos en los que se expresa, particularmente de células T activadas. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos preparados frente a una proteína o péptido receptor, tales como los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, AcM 1C6), para detectar y/o cuantificar células que expresan el receptor. En una realización, pueden usarse los anticuerpos para clasificar células T que expresan el receptor de entre una mezcla de células (por ejemplo, para aislar células T activadas, tales como células T CD4⁺). Pueden usarse métodos adecuados para el recuento y/o clasificación de células para este fin (por ejemplo, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia). Pueden usarse recuentos celulares en el diagnóstico de enfermedades o estados en los que se observa un aumento o disminución en los tipos celulares de leucocitos (por ejemplo, células T activadas). La presencia de un aumento del nivel de células T activadas en una muestra obtenida a partir de un individuo puede ser indicativa de la infiltración debida a una enfermedad o estado inflamatorio, tales como una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, rechazo de alioinjerto, o un estado patológico, incluyendo infección vírica o bacteriana.

Además, pueden usarse los anticuerpos para detectar o medir la expresión del receptor. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos de la presente invención para detectar o medir el receptor en una muestra (por ejemplo, tejidos o líquidos corporales de un individuo tales como sangre, suero, leucocitos (por ejemplo, linfocitos T activados), líquido de lavado broncoalveolar, saliva, líquido intestinal). Por ejemplo, puede obtenerse una muestra (por ejemplo, de tejido y/o líquido) de un individuo y puede usarse un ensayo adecuado para evaluar la presencia o cantidad de proteína CXCR3. Los ensayos adecuados incluyen métodos inmunológicos tales como análisis por FACS y ensayos de inmunoadsorción unida a enzimas (ELISA), incluyendo ensayos de quimioluminiscencia, radioinmunoanálisis, e inmunohistología. Generalmente, se combinan una muestra y un anticuerpo de la presente invención en condiciones adecuadas para la formación de un complejo anticuerpo-receptor, y se evalúa la formación de complejo anticuerpo-receptor (directa o indirectamente).

La presencia de un aumento del nivel de la reactividad del receptor en una muestra obtenida de un individuo puede ser indicativa de inflamación y/o infiltración de leucocitos (por ejemplo, células T activadas) y/o acumulación asociada a una enfermedad o estado inflamatorio, tal como rechazo de alioinjerto, reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, o una infección tal como una infección vírica o bacteriana. También puede usarse el nivel de expresión de una proteína CXCR3 de mamífero o variante para correlacionar un aumento o disminución de la expresión de una proteína CXCR3 de mamífero con una enfermedad o estado particular, y en el diagnóstico de una enfermedad o estado en el que se produce un aumento o disminución de la expresión de una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, aumento o disminución con respecto a un control adecuado, tal como el nivel de expresión en un individuo normal). De forma similar, puede monitorizarse el transcurso del tratamiento evaluando la inmunorreactividad de CSCR3 en una muestra de un paciente. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos de la presente invención para monitorizar el número de células que llevan CXCR3 en una muestra (por ejemplo, sangre, tejido) de un paciente que está tratándose con un agente anti-inflamatorio o inmunosupresor.

Animales transgénicos

Pueden conseguirse animales transgénicos en los que se altera el genoma del huésped animal usando técnicas de ADN recombinante. La alteración puede no ser heredable (por ejemplo, se alteran células somáticas, tales como células progenitoras en la médula ósea). Alternativamente, la alteración es heredable (se altera la línea germinal). Pueden conseguirse animales transgénicos usando técnicas convencionales u otros métodos adecuados (véase por ejemplo, Cooke, M. P. *et al.*, Cell, 65: 281-291 (1991) en cuanto a alteraciones de linfocitos T; Hanahan, D., Science, 246: 1265-1275, (1989); Anderson *et al.*, patente estadounidense número 5.399.346).

Puede inactivarse o inutilizarse un gen de CXCR3 de mamífero endógeno, por completo o en parte, en un huésped animal adecuado (por ejemplo, mediante técnicas de interrupción génica) para producir un animal transgénico. Pueden usarse ácidos nucleicos para evaluar la construcción satisfactoria de un huésped que contiene un gen de CXCR3 inactivado o inutilizado (por ejemplo, mediante hibridación de tipo Southern). Además, puede evaluarse la construcción satisfactoria de un huésped que contiene un gen de CXCR3 inactivado o inutilizado mediante ensayos adecuados que monitorizan la función del receptor codificado. Pueden usarse animales de este tipo para evaluar el efecto de la inactivación del receptor sobre la inflamación y las defensas del huésped contra el cáncer y los patógenos (por ejemplo, un patógeno vírico).

Puede introducirse un ácido nucleico que codifica para una proteína o polipéptido CXCR3 de mamífero en un huésped adecuado para producir un animal transgénico. Pueden inactivarse los genes del receptor CXCR3 endógenos presentes en el animal transgénico (por ejemplo, simultáneamente a la introducción del ácido nucleico mediante recombinación homóloga, que interrumpe y sustituye el gen endógeno). Por ejemplo, puede producirse un animal transgénico (por ejemplo, un ratón, cobaya, oveja) que puede expresar un ácido nucleico que codifica para un receptor CXCR3 de mamífero de una especie de mamíferos distinta (por ejemplo, un CXCR3 humano tal como el CXCR3 codificado por la SEQ ID NO: 1) en leucocitos (tales como linfocitos (por ejemplo, linfocitos T activados), linfocitos citolíticos naturales), y proporciona un modelo animal conveniente para evaluar función del receptor introducido. Además, puede administrarse un agente de prueba al animal transgénico, y puede monitorizarse el efecto del agente sobre un proceso mediado por el receptor (por ejemplo, inflamación) tal como se describe en el presente documento o usando otros ensayos adecuados. De esta manera, pueden identificarse agentes que inhiben o promueven la función del receptor o evaluarse para determinar su efecto *in vivo*.

ES 2 288 305 T3

Métodos de tratamiento

La modulación de la función de CXCR3 de mamífero según la presente invención, mediante la inhibición o promoción de al menos una función característica de una proteína CXCR3 de mamífero, proporciona una forma eficaz y selectiva de inhibir o promover las funciones mediadas por el receptor. Debido a que los receptores de quimiocinas CXC expresados selectivamente en linfocitos activados, que responden a quimiocinas tales como IP-10 y Mig cuyas dianas primarias son linfocitos, particularmente células efectoras tales como células NK y linfocitos T activados o estimulados, las proteínas CXCR3 de mamífero proporcionan una diana para interferir selectivamente con o promover la función de los linfocitos en un mamífero, tal como un ser humano. Una vez que se reclutan los linfocitos en un sitio,

5 pueden reclutarse otros tipos de leucocitos, tales como monocitos, mediante señales secundarias. Por tanto, pueden usarse agentes que inhiben o promueven la función de CXCR3, incluyendo ligandos, inhibidores (por ejemplo, 1C6) y/o promotores, tales como los identificados tal como se describe en el presente documento, para modular la función de los leucocitos (por ejemplo, infiltración de leucocitos incluyendo reclutamiento y/o acumulación), particularmente de linfocitos, con fines terapéuticos.

10

15 En un aspecto, la presente invención proporciona el uso en la fabricación de un medicamento para inhibir o promover una respuesta inflamatoria en un individuo que necesita un tratamiento de este tipo. Puede administrarse un agente que inhibe o promueve la función CXCR3 de mamífero a un individuo que necesita un tratamiento de este tipo. Puede administrarse un compuesto que inhibe una o más funciones de una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, un CXCR3 humano) para inhibir (es decir, reducir o evitar) la inflamación. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos de la presente invención, incluyendo AcM 1C6. Como resultado, se inhibe uno o más procesos inflamatorios, tales como migración de leucocitos, quimiotaxis, exocitosis (por ejemplo, de enzimas) o liberación de mediadores inflamatorios. Por ejemplo, puede inhibirse la infiltración leucocítica en los sitios inflamatorios (por ejemplo, en una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado).

20

25 Puede administrarse un agente (por ejemplo, un agonista del receptor) que promueve una o más funciones de una proteína CXCR3 de mamífero (por ejemplo, un CXCR3 humano) para inducir (desencadenar o potenciar) una respuesta inflamatoria, tal como migración de leucocitos, quimiotaxis, exocitosis (por ejemplo, de enzimas) o liberación de mediadores inflamatorios, dando como resultado la estimulación beneficiosa de los procesos inflamatorios. Por ejemplo, pueden reclutarse linfocitos citolíticos naturales para combatir infecciones víricas o enfermedades neoplásicas.

30

35 El término "individuo" se define en el presente documento para incluir animales tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitarse a, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, de roedor o murinas. Pueden tratarse enfermedades y estados asociados con inflamación, infección, y cáncer usando el método. En una realización preferida, la enfermedad o estado es uno en el que las acciones de los linfocitos, particularmente células efectoras tales como linfocitos citolíticos naturales (NK) y linfocitos T activados o estimulados, deben inhibirse o promoverse con fines terapéuticos (incluyendo profilácticos). En una realización particularmente preferida, la enfermedad o estado inflamatorio es una enfermedad o estado mediado por células T.

40

Las enfermedades o estados, incluyendo enfermedades crónicas, de seres humanos u otras especies que pueden tratarse con inhibidores de la función de CXCR3, incluyen, pero no se limitan a:

- 45
- enfermedades y estados inflamatorios o alérgicos, incluyendo anafilaxia sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), alergias a picaduras de insectos; enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, ileitis y enteritis; vaginitis; psoriasis y dermatosis inflamatorias tales como dermatitis, eccema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea, y por hipersensibilidad); espondiloartropatías; esclerodermia; enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades pulmonares intersticiales (EPI) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, o EPI asociada a artritis reumatoide u otros estados autoinmunitarios);

50

 - enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes, incluyendo diabetes mellitus y diabetes juvenil, glomerulonefritis y otras nefritis, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet;
 - rechazo de injerto (por ejemplo, en trasplantes), incluyendo rechazo de aloinjerto o enfermedad injerto contra huésped;

55

 - pueden tratarse otras enfermedades o estados en los que deben inhibirse respuestas inflamatorias no deseables, incluyendo, pero sin limitarse a, aterosclerosis, toxicidad inducida por citocinas, miositis (incluyendo polimiositis, dermatomiositis).
- 60

65 Las enfermedades o estados de seres humanos u otras especies que pueden tratarse con promotores (por ejemplo, un agonista) de la función de CXCR3, incluyen, pero no se limitan a:

ES 2 288 305 T3

- 5

 - cánceres, particularmente aquellos con infiltración leucocítica de la piel u órganos tales como linfoma cutáneo de células T (por ejemplo, micosis fungoide);
 - enfermedades en las que la angiogénesis o neovascularización desempeña un papel, incluyendo enfermedad neoplásica, retinopatía (por ejemplo, retinopatía diabética), y degeneración macular;
 - enfermedades infecciosas, tales como infecciones bacterianas y lepra tuberculoide, y especialmente infecciones víricas;

10

 - inmunosupresión, tal como la de individuos con síndromes de inmunodeficiencia tales como SIDA, individuos que se someten a radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento que provoca inmunosupresión; inmunosupresión debida a deficiencias congénitas en la función del receptor u otros motivos. Los promotores de la función de CXCR3 también pueden tener efectos protectores útiles para combatir el empobrecimiento de células madre durante quimioterapia contra el cáncer (Sarris, A. H. *et al.*, J. Exp. Med., 178: 1127-1132 (1993)).

15

Modos de administración

Pueden administrarse uno o más agentes al huésped por una vía apropiada, o bien solo o bien en combinación con otro fármaco. Se administra una cantidad eficaz de un agente (por ejemplo, un péptido receptor que inhibe la unión del ligando, un anticuerpo anti-CXCR3 o fragmento de unión a antígeno del mismo). Una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado, en condiciones de administración, tal como una cantidad suficiente para inhibir o promover la función del receptor CXCR3, y de ese modo, inhibir o promover, respectivamente, un proceso mediado por el receptor (por ejemplo, una respuesta inflamatoria).

25 Es posible una variedad de vías de administración incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a vías de administración oral, dietética, tópica, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea), e inhalación (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal u oral, gotas intranasales), dependiendo del agente y la enfermedad o estado que va a tratarse. Para las enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, la inhalación
30 es un modo de administración preferido.

La formulación de un agente que va a administrarse variará según la vía de administración seleccionada (por ejemplo, disolución, emulsión, cápsulas). Puede prepararse una composición apropiada que comprende el agente que va a administrarse en un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. Para disoluciones o emulsiones, los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, disoluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo medios salinos y tamponados. Los vehículos para administración parenteral pueden incluir disolución de cloruro de sodio, solución de Ringer dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactato o aceites fijos, por ejemplo. Los vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, conservantes, o reabastecedores de líquidos, nutrientes o electrolitos y similares (véase, generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a Edición, Mack Publishing Co., PA, 1985). Para su inhalación, el agente puede solubilizarse y cargarse en un dispensador adecuado para su administración (por ejemplo, un atomizador, nebulizador o dispensador de aerosol a presión).

Además, cuando el agente es una proteína o péptido, el agente puede administrarse mediante expresión *in vivo* de la proteína recombinante. Puede lograrse la expresión *in vivo* mediante expresión en células somáticas según métodos adecuados (véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.399.346). En esta realización, puede incorporarse el ácido nucleico que codifica para la proteína dentro de un vector retroviral, adenoviral u otro vector adecuado (preferiblemente, un vector infeccioso carente de replicación) para su administración, o puede introducirse dentro de una célula huésped transfectada o transformada que puede expresar la proteína para su administración. En la última realización, pueden implantarse las células (solas o en un dispositivo de barrera), inyectadas o introducidas de otro modo en una cantidad eficaz para expresar la proteína en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos.

Quimiocinas humanas (ejemplos 1-2)

Se sintetizaron químicamente las quimiocinas CXC Mig, IL-8, GRO α , NAP-2, GCP-2, ENA78, PF4, las quimiocinas CC MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, I309, eotaxina y la linfotactina relacionada con quimiocinas según protocolos establecidos (Clark-Lewis, I. et al., Biochemistry 30: 3128-3135 (1991)). Se adquirió la quimiocina CXC IP-10 en PeproTech, Rocky Hill, NJ.

Ejemplo 1

65 Clonación del ADNc del receptor (ejemplo ilustrativo)

Se usaron técnicas de biología molecular convencionales (Sambrook, J. *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

ES 2 288 305 T3

Se generaron fragmentos de ADN que codificaban para posibles receptores de quimiocinas restringidos de linfocitos T usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron dos cebadores de oligonucleótidos degenerados basándose en los motivos conservados de los receptores de quimiocinas. Se basó el diseño de cebadores en las secuencias conservadas de nucleótidos dentro del dominio 2 transmembrana (TM2) y el dominio 7 transmembrana (TM7) de los receptores de quimiocinas IL-8R1 (CXCR1), IL-8R2 (CXCR2), CC-CKR1(CCR1), CC-CKR2 (CCR2) y los receptores huérfanos EBI I, LESTR y BLR1/MDR15 (EBI I, Birkenbach, M. *et al.*, J. Virol., 67: 2209-2220 (1993); LESTR, Loetscher, M. *et al.*, J. Biol. Chem., 269: 232-237 (1994); y BLR1/MDR15, Dobner, T. *et al.*, Eur. J. Immunol., 22: 2795-2799 (1992) y Barella, L. *et al.*, Biochem. J., 309: 773-779 (1995)).

10 Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes:

SEQ ID NO:3:

5'-GGG CTG CAG CII T(T/G)(T/G) C(C/A) G AC(A/C) TIC TI(C/T) T-3'

15 SEQ ID NO:4.
5'-GGG TCT AGA IGG GTT IAI (G/A)CA (G/A)C(T/A) (G/A) (T/C) G-3'

20 (I=inosina). Se usaron estos cebadores en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar fragmentos de ADN usando ADN genómico humano aislado de linfocitos de sangre periférica como molde de la siguiente manera. Se sometió una mezcla de reacción de 100 μ l que contenía 2 μ g de ADN genómico humano, tampón DynaZyme 1X (Finnzymes OY, Espoo, Finlandia), MgCl₂ 1,5 mM, 500 μ M de cada desoxinucleótido, 1 μ M de ambos cebadores, y 2,5 U de ADN polimerasa DynaZyme a 30 ciclos (94°C durante 1 minuto; 55°C durante 1 minuto; y 72°C durante 2 minutos) en un termociclador de ADN (Techne PHC-2, Brouwer, Suiza). Se clonaron los productos de la PCR del tamaño previsto (aproximadamente 700 pb) en los vectores Gene Scribe-Z pTZ18/19 U/R (USB, Cleveland, OH), se secuenciaron parcialmente (Sanger, F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467 (1977)), y se evaluaron para determinar su similitud con los receptores de quimiocinas conocidos y para determinar la expresión de su ARNm correspondiente en leucocitos. Un fragmento de ADN denominado 2MLC22 reveló el 64% de identidad de secuencia de nucleótidos con IL-8R2. El fragmento 2MLC22 se hibridó específicamente con ARN de células T, pero no de monocitos o neutrófilos, tal como se evaluó mediante análisis de transferencia de tipo Northern usando una sonda de hibridación preparada marcando enzimáticamente 2MLC22 con el isótopo radiactivo ³²P usando el fragmento Klenow de la ADN Polimerasa I y un kit de marcaje por cebador aleatorio comercialmente disponible.

35 Se marcó el fragmento 2MLC22 enzimáticamente con ³²P tal como se describió y se usó como sonda para examinar una biblioteca de ADNc de células T CD4+ específicas de toxoide tetánico humanas (KT30), preparada en lambda-ZAP Express (Stratagene, Zurich, Suiza) (Loetscher, M. *et al.*, J. Biol. Chem., 269: 232-237 (1994)). Se preparó una biblioteca de ADNc en un sistema λ ZAP Express según el protocolo del fabricante (Stratagene GMBH, Zurich, Suiza) usando poli(A)+ ARN de células T CD4+ específicas de toxoide tetánico humanas (KT30). La biblioteca resultante contenía aproximadamente 1,8 x 10⁶ clones independientes con un tamaño de inserto promedio de aproximadamente 1,1 kb. Para examen de hibridación en placa, se transfirieron aproximadamente 4 X 10⁵ clones a membranas de nylon Biodyne (PALL AG, Muttenz, Suiza) y se detectaron con sonda con 2MLC22 que se había marcado con una actividad específica de 1 x 10⁹ dpm/ μ g de ADN usando el kit de marcaje de ADN high prime (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Se llevó a cabo la hibridación en formamida al 50%, 6X SSC, SDS al 0,5%, 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 42°C durante 20 horas usando 1 x 10⁶ dpm de 2MLC22/ml de disolución de hibridación. Se lavaron una vez las membranas en 2X SSC, SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 10 minutos, dos veces en 1X SSC, SDS al 0,1% a 65°C durante 30 minutos, y finalmente una vez en 0,5X SSC, SDS al 0,1% a 65°C durante 10 minutos. Se aislaron veintitrés clones a partir de las placas lambda de hibridación positiva siguiendo los lavados de alta rigurosidad y se secuenció el clon con el inserto más largo (1670 pb). Se subclonó el ADNc de CXCR3 en vectores plasmídicos comercialmente disponibles para secuenciación de nucleótidos, generación de sondas de hibridación y construcción de clones de células de mamífero transfectados de forma estable que expresan CXCR3, y se mantuvieron estos constructos que contenían ADNc de CXCR3 en cepas de *E. coli*.

Resultados

55 Se aisló un ADNc a partir de una biblioteca de células T CD4+ humanas buscando receptores de quimiocinas específicos de linfocitos T (figura 1, SEQ ID NO: 1). No se recuperó este ADNc en el transcurso de la búsqueda en una biblioteca de ADNc derivada de monocitos usada comúnmente o una biblioteca de ADNc derivada de granulocitos (HL-60) para determinar los ADNc de receptor de quimiocinas novedoso; sin embargo, no se ha realizado una búsqueda directa de las bibliotecas para determinar ADNc de CXCR3. El ADNc de CXCR3, que se demostró que codificaba para un receptor de IP-10/Mig (véase a continuación), y tiene un marco de lectura abierto (ORF) de 1104 pb que comienza en el residuo 69 que codifica para una proteína de 368 aminoácidos con una masa molecular prevista de 40.659 daltons. La secuencia de aminoácidos (figura 2, SEQ ID NO: 2) incluye siete posibles segmentos transmembrana, que son característicos de los receptores acoplados a proteínas G, y tres posibles sitios de N-glucosilación (Asn²², Asn³², y Asn¹⁹⁹) (figura 2). Además, pueden encontrarse nueve residuos de serina y uno de treonina, que son posibles sitios de fosforilación para cinasas de receptores (Palczewski, K. y J. L. Benovic, Trends Biochem. Sci., 16: 387-391 (1991); Chuang, T. T. *et al.*, J. Biol. Chem., 267: 6886-6892 (1992); y Giannini, E. *et al.*, J. Biol. Chem., 270: 19166-19172 (1995)), en la región COOH terminal intracelular (figura 2).

ES 2 288 305 T3

Se alineó la secuencia de 368 aminoácidos del receptor (IP-10/MigR, figura 2, SEQ ID NO: 2) con las secuencias de aminoácidos de otros receptores de quimiocinas humanos, incluyendo IL-8R1 (CXCR1), IL-8R2 (CXCR2), CC-CKR1 (CCR1), CC-CKR2A (CCR2a), CC-CKR3 (CCR3) y CC-CKR4 (CCR4). Se realizó alineamiento múltiple de proteínas según Higgins y Sharp (Higgins, D. G. y P. M. Sharp, "Description of the method used in CLUSTAL." Gene, 73: 237-244(1988)). Los residuos dentro del cuadro negro en la figura 2 representan regiones de identidad entre IP-10/MigR y al menos otros dos receptores de quimiocinas. Los guiones indican huecos en el alineamiento. El alineamiento reveló varios motivos conservados, particularmente en los dominios transmembrana y el segundo bucle intracelular. Se observó identidad de secuencia significativa con los receptores CXC IL-8R1 e IL-8R2, pero no con los receptores de quimiocinas CC, en el tercer y el sexto dominio transmembrana (figura 2).

La secuencia comparte el 40,9% y 40,3% de identidad global de aminoácidos con los receptores IL-8R1 e IL-8R2, respectivamente, y del 34,2 al 36,9% de identidad con los cinco receptores de quimiocinas CC conocidos (tabla 1). Se encontró un grado inferior de similitud con receptores de siete dominios transmembrana que se expresan en células T, pero que no se unen a quimiocinas, por ejemplo, el 27,2% de identidad con el receptor de trombina (Vu, T.-K. H. et al., Cell, 64: 1057-1068 (1991)). Se aisló previamente un clon truncado de función no identificada, con una secuencia codificante incompleta que puede alinearse con la de la figura 2, a partir de una biblioteca de ADN genómico humano (Marchese, A. et al., Genomics, 29: 335-344 (1995)).

TABLA 1

20

Comparación de la secuencia de aminoácidos de IP-10/MigR con receptores de quimiocinas humanos								
	IL-8R1 (CXCR1)	IL-8R2 (CXCR2)	CC-CKR1 (CCR1)	CC-CKR2A (CCR2a)	CC-CKR3 (CCR3)	CC-CKR4 (CCR4)	CC-CKR5 (CCR5)	TrombR
IP-10/ MigR	40,9 ^a	40,3	34,9	34,2	34,4	35,8	36,9	27,2
IL-8R1		77,1	33,7	32,9	34,3	39,7	34,3	29,1
IL-8R2			34,9	33,6	34,1	40,8	34,4	29,7
CC-CKR1				54,1	63,1	49,3	56,3	26,8
CC-CKR2A					50,7	46,1	68,8	24,6
CC-CKR3						46,5	52,3	27,3
CC-CKR4							50,0	29,2
CC-CKR5								23,6

^a Los números se refieren al porcentaje de identidad de aminoácidos. Se llevaron a cabo alineamientos de secuencia de proteína por parejas usando el programa PALIGN con un coste de espacio abierto y coste de espacio de unidad de 3 y 2, respectivamente.

Ejemplo 2

55 Actividad biológica (ejemplo ilustrativo)

Expresión en linfocitos T activados

En vista de la selectividad de quimiocinas observada, se examinó la producción de IP-10/MigR en leucocitos y líneas celulares relacionadas mediante análisis de transferencia de tipo Northern. Se examinaron muestras de 10 µg de ARN total de monocitos, neutrófilos, linfocitos (LSP), células T purificadas en lana de nylon sanguíneos humanos aislados recientemente, y de células cultivadas incluyendo células T CD4⁺ (KT30) y células T CD8⁺ humanas clonadas (ERCD8), células NK clonadas (ERNK57), y LSP cultivados durante 10 días (1-2,5 x 10⁶ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía glutamina 2 mM, 1X aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, kanamicina 100 mg/ml, 2-mercptoetanol 5 x 10⁻⁵ M, y suero humano al 5%) en presencia de 400 U/ml de hrIL-2 (la IL-2 humana recombinante fue una donación del Dr. A. Lanzavecchia, Instituto de inmunología de Basilea, Basilea, Suiza). Se tiñeron los geles de agarosa con bromuro de etidio para comprobar la integridad y cantidad de ARN total en el gel antes de transferir. Se analizaron las muestras de ARN con un fragmento 5' marcado con ³²P del ADN de IP-10/MigR (109 cpm/µg ADN)

ES 2 288 305 T3

a 5×10^6 cpm/ml de disolución de hibridación tal como se describió (Loetscher, M. et al., J. Biol. Chem., 269: 232-237 (1994)). Se preparó el fragmento 5' usado como sonda de transferencia de tipo Northern por digestión del ADNc de CXCR3 en el vector pBK-CMV (Stratagene GMBH, Zurich, Suiza) con PstI dando el extremo 5' de 724 pb del ADNc de CXCR3 (figura 1).

5

Resultados

Se encontró una abundante expresión de ARNm del tamaño esperado en las células T CD4⁺ clonadas, KT30, que se usaron para el aislamiento del ADNc del receptor. Se observaron niveles de expresión similares en el clon de células T CD8⁺, ERCD8, y el clon de células NK, ERNK57. Por el contrario, en linfocitos y células T purificadas en lana de nylon sanguíneos aislados recientemente, se detectaron escasos transcritos de IL10/MigR. Sin embargo, cuando se cultivaron estas células en presencia de IL-2, se obtuvo una fuerte regulación por incremento y el nivel de ARNm del receptor se aproximó al de los clones de células T y NK. No se detectaron transcritos de IP-10/MigR en estas condiciones en monocitos, leucocitos neutrófilos o leucocitos eosinófilos sanguíneos aislados recientemente. Células relacionadas con leucocitos adicionales que no expresan ARNm de IP-10/MigR incluyen la línea de mastocitos, HMC-1, la línea de leucemia promielocítica, HL60, linfoma histiocítico, U937, la línea de leucemia mielógena crónica, K562, la línea de leucemia de células T aguda, Jurkat, la línea de leucemia linfoblástica aguda, Molt, las líneas celulares linfoblásticas de células B Daudi y Raji, linfocitos de pacientes con leucemia linfoide de células B crónica y aguda (B-CLL y B-ALL), basófilos maduros de un paciente con leucemia basofílica y la línea celular de eritroleucemia, HEL. Por el contrario, también se encuentran en monocitos y granulocitos los receptores de quimiocinas que se ha demostrado previamente que atraen linfocitos, es decir MCP-1 MCP-2, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES (Loetscher, P. et al., FASEB J., 8: 1055-1060 (1994); Carr, M. W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3652-3656 (1994); Taub, D. D. et al., Science, 260: 355-358 (1993); Schall, T. J. et al., J. Exp. Med., 177: 1821-1825 (1993); Schall, T. J. et al., Nature, 347: 669-672 (1990)). La expresión restringida de IP-10/MigR en linfocitos T activados y una línea celular de linfocitos citolíticos naturales sugiere que este receptor novedoso puede mediar el reclutamiento de linfocitos selectivo.

Transfectantes estables

30 Se liberó el ADNc de CXCR3 ADNc de pBK-CMV (Stratagene GMBH, Zurich, Suiza) mediante digestión con BamHI y XbaI, y se clonó en los sitios de BamHI y XbaI de pcDNA3 (Invitrogen BV, WBLeek, Países Bajos) para dar pcDNA3-Clone8, que se mantiene y almacena en *Escherichia coli* (XL1Blue).

35 Para generar transfectantes estables, se transfecaron mediante electroporación 4 x 10⁶ de o bien células pre-B de ratón (300-19) (Thelen, M. et al., FASEB J., 2: 2702-2706 (1988)), células promielocíticas humanas (GM-1) (Garotta, G. et al., J. Leukocyte Biol., 49: 294-301 (1991)) o bien células de leucemia de células T aguda (Jurkat) (Loetscher, P. et al., FEBS Lett. 341: 187-192 (1994)), con 20 μ g de ADNc de receptor en pcDNA3 que se había linealizado con Bgl II tal como se describió anteriormente (Moser, B. et al., Biochem. J., 294: 285-292 (1993)).

40 Se clonaron las células transfectadas con IP-10/MigR por dilución limitante bajo selección con G-418 (Life Technologies, Inc.) (1,0 mg/ml de G-418 para 300-19 y 0,8 mg/ml G-418 para células Jurkat y GM-1). Se examinaron los clones resistentes a G-418 para determinar la expresión del receptor por análisis de transferencia puntual de ARN.

45 Flujo de Ca²⁺

Para determinar si el receptor era funcional, se transfecaron de forma estable clones de células pre-B murinas (300-19), células promielocíticas humanas (GM-1), y células de leucemia de células T humana (Jurkat) con ADNc del receptor tal como se describió anteriormente. La activación de receptores de quimiocinas conduce a un aumento transitorio de la concentración de Ca²⁺ libre citosólico ([Ca²⁺]_i), y se usó este ensayo para monitorizar la señalización en las células transfectadas.

50 Se midieron cambios en la concentración de Ca²⁺ libre citosólico ([Ca²⁺]_i) en células cargadas con fura-2 mediante incubación durante 30 minutos a 37°C con 0,1 nmol de acetoximetiléster de fura-2 por cada 10⁶ células en un tampón que contenía NaCl 136 mM, KCl 4,8 mM, CaCl₂ 1 mM, glucosa 5 mM, y HEPES 20 mM, pH 7,4. Tras centrifugación, se resuspendieron las células cargadas en el mismo tampón (10⁶ células/ml), se estimularon con la quimiocina indicada a 37°C, y se registraron los cambios de fluorescencia relacionados con [Ca²⁺]_i (von Tscharner, V. et al., Nature, 324: 69-372 (1986)).

60 Resultados

Se observó un rápido aumento de [Ca²⁺] en respuesta a IP-10 y Mig. Se ha demostrado que la quimiocina IP-10 se expresa en reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado cutáneas (Luster, A. D. et al., Nature, 315: 672-676 (1985); Kaplan, G. et al., J. Exp. Med., 166: 1098-1108 (1987)). Se ha identificado recientemente la quimiocina denominada Mig (Farber, J. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5238-5242 (1990); Farber, J. M., Biophys. Res. Commun., 192: 223-230 (1993)). Ambas quimiocinas tienen la disposición CXC de las dos primeras cisteínas igual que IL-8, pero no son quimiotácticas para leucocitos neutrófilos. Se ha notificado recientemente que la IP-10 atrae linfocitos T (Luster, A. D. y P. Leder, J. Exp. Med., 178: 1057-1065 (1993); Taub, D. D. et al., J. Exp. Med., 177:

ES 2 288 305 T3

1809-1814 (1993)), y que Mig es quimiotáctica para linfocitos asociados a tumores (Liao, F. *et al.*, J. Exp. Med., 182: -1301-1314 (1995)).

Las figuras 3A-3C resumen los efectos de IP-10 y Mig sobre las células transfectadas con el ADNC y que expresan el IP-10/MigR funcional. Tal como se muestra por los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ (figura 3A), la acción de IP-10 y Mig fue dependiente de la concentración y se pudo detectar ya a 1 nM, indicando que ambas quimiocinas tienen una alta afinidad por el receptor novedoso. Los transfectantes con IP-10/MigR, por el contrario, no respondieron a ninguno de los otros 16 posibles agonistas a concentraciones de hasta 100 nM, incluyendo las quimiocinas CXC IL-8, GRO α , NAP-2, GCP-2, ENA78, PF4, las quimiocinas CC MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, 10 1309, eotaxina o la linfotactina relacionada con quimiocinas (no se muestra). Se obtuvieron resultados idénticos con las células transfectadas humanas y murinas. Estas observaciones demuestran que el receptor novedoso es sumamente selectivo para IP-10 y Mig. Por consiguiente, el receptor se denomina en el presente documento como un receptor de IP-10/Mig (IP-10/MigR), o como "CXCR3", reflejando su especificidad para quimiocinas CXC.

Tal como se muestra en la figura 3B, la estimulación repetida con IP-10 o Mig dio como resultado la desensibilización típica de los receptores de quimiocinas. Además, se produjo desensibilización cruzada cuando se estimularon las células con IP-10 seguido por Mig o viceversa, confirmando que el receptor tiene una alta afinidad por ambas quimiocinas. A una concentración de 100 nM, se hizo evidente que Mig era más potente en la desensibilización cruzada que IP-10, sugiriendo una afinidad o estabilidad de unión superior del receptor IP-10/Mig por Mig.

Aunque se demostró la expresión de IP-10/MigR funcional, los experimentos de unión usando ligandos radiactivos revelaron unión inespecífica entre el 60 y el 80% del total, evitando la determinación de los parámetros de unión. Puesto que IP-10 y Mig son sumamente catiónicos (valores de pI de 10,8 y 11,1), la interacción inespecífica con los proteoglucanos de la superficie celular puede explicar estos resultados. Es más, se han detectado sitios de unión sensibles a heparinasa, no relacionados con el receptor de quimiocinas para IP-10 (y PF4) en una variedad de células tisulares y sanguíneas (Luster, A. D. *et al.*, J. Exp. Med., 182: 219-231 (1995)), y el sulfato de heparán se une a IP-10 y Mig y evita la quimiotaxis de linfocitos (no se muestra). El sitio de unión a heparina probablemente no está implicado en la unión del receptor CXCR3, y puede usarse la inclusión de un derivado de heparina adecuado tal como sulfato de condroitina en la reacción (por ejemplo, en tampón de unión) para inhibir la unión inespecífica a las células a través del sitio de unión a heparina.

Quimiotaxis

Se aislaron recientemente LSP a partir de las capas leucocíticas de sangre de donantes. El Servicio de Transfusión Sanguínea del Laboratorio Central Suizo, SRK, proporcionó las capas leucocíticas de sangre. Se realizó el aislamiento de LSP de capa leucocítica tal como se describe en Colotta, F. *et al.*, J. Immunol., 132: 936-944 (1984).

Se usaron LSP aislados recientemente a partir de capas leucocíticas de sangre de donantes sin procesamiento adicional, o se usaron tras cultivar durante 10 días en presencia de IL-2 ($1-2,5 \times 10^6$ células/ml en medio RPMI 1640 que contiene glutamina 2 mM, 1X aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, kanamicina 100 μ g/ml, 2-mercaptopetanol 5×10^{-5} M, y suero humano al 5% en presencia de 400 U/ml de hrIL-2).

Se evaluó la migración celular en cámaras de 48 pocillos (Neuro Probe, Cabin John, MD, EE.UU.) usando membranas de policarbonato sin polivinilpirrolidona (Nucleopore) con poros de 5 μ m para células transfectadas con IP-10/MigR (Loetscher, P. *et al.*, FEBS Lett. 341: 187-192 (1994)) o con poros de 3 μ m para LSP humanos (Loetscher, P. *et al.*, FASEB J., 8: 1055-1060(1994)). Se usó RPMI 1640 complementado con Hepes 20 mM, pH 7,4, y disolución de proteínas plasmáticas pasteurizada al Swiss Red Cross Laboratory, Berna, Suiza para disolver las quimiocinas (pocillos inferiores) y para diluir las células (100.000 transfectantes con el receptor o LSP en el pocillo superior). Tras 60 minutos a 37°C, se retiró la membrana, se lavó el lado superior con PBS, se fijó y se tiñó. Se realizaron todos los ensayos por triplicado y se contaron las células migradas en cinco campos seleccionados aleatoriamente con un aumento de 1000 veces. Se determinó la migración espontánea en ausencia de quimiotáctico.

Resultados - células transfectadas

Las células transfectadas que expresan el IP-10/MigR migraron fácilmente hacia IP-10 o Mig, mientras que las células progenitoras, no transfectadas no respondieron (figura 3C). Ambos agonistas mostraron una dependencia de la concentración típicamente bifásica. IP-10 indujo migración a concentraciones superiores a 1 nM, mientras que la respuesta de Mig se hizo detectable por encima de 10 nM. La eficacia, que se mide por el número máximo de células que migran, fue aproximadamente el doble para Mig que para IP-10. Estos resultados demuestran que el IP-10/MigR, como todos los receptores de quimiocinas conocidos en leucocitos, media la quimiotaxis en respuesta a ligando.

Resultados - leucocitos de sangre humana

De acuerdo con la distribución celular del IP-10/MigR, se encontró que los linfocitos T humanos activados son sumamente sensibles a IP-10 y Mig (figuras 4A-4B). La actividad de IP-10 y Mig como inductores de cambios en $[Ca^{2+}]_i$ (figura 4A) y de quimiotaxis *in vitro* (figura 4B) fue compatible con los efectos observados usando células transfectadas que expresan el IP-10/MigR, siendo IP-10 más potente pero menos eficaz que Mig. Se requirió la acti-

ES 2 288 305 T3

vación de los linfocitos T mediante cultivo en presencia de IL-2 para la inducción de flujo de calcio y quimiotaxis, y no se observó respuesta con linfocitos sanguíneos aislados recientemente en las condiciones usadas.

Materiales y métodos para los ejemplos 3-9

5 Se usaron los siguientes materiales y métodos en los ejemplos 3-9.

Quimiocinas

10 Se obtuvieron quimiocinas humanas recombinantes de Peprotech (Rocky Hill, NJ), excepto eotaxina, descrita previamente (Ponath, P. D., *et al.*, J. Clin. Invest., 97: 604-612 (1996); véase también Ponath *et al.*, documento WO 97/00960, publicado el 9 de enero de 1997), que fue una donación del Dr. Ian Clark-Lewis. Se obtuvieron las quimiocinas marcadas con ^{125}I de Du Pont NEN (Boston, MA).

15 *Células y líneas celulares*

Se aislaron neutrófilos y CMSP tal como se describe (Ponath, P. D., *et al.*, J. Clin. Invest., 97: 604-612 (1996)). Para generar blastos CD3, se añadieron 2×10^6 CMSP/ml en RPMI-1640 más FCS al 10% a placas de cultivo de tejidos que se habían recubierto con el anticuerpo TR66 anti-CD3. Se extrajeron los blastos tras 4-6 días en medio nuevo y se complementó con IL-2 (proporcionada amablemente por Antonio Lanzavecchia, Basilea) a 50 unidades/ml.

20 Otras líneas celulares usadas incluyeron transfectantes del linfoma de células pre-B murino L1.2, que expresan o bien CXCR3 (véase a continuación), IL-8 RA (Ponath, P. D., *et al.*, J. Exp. Med., 183: 2437-2448 (1996)), IL-8 RB (Ponath, P. D., *et al.*, J. Exp. Med., 183: 2437-2448 (1996)), CCR2b (G. LaRosa, sin publicar), CCR4, CCR5 (Wu, L., *et al.*, Nature, 384: 179-183(1996)), o bien CCR1 (Campbell, J. J., *et al.*, J. Cell Biol., 134: 255-266 (1996)).

Preparación de transfectantes con CXCR3

Células

30 Se hicieron crecer células L1.2 en medio RPMI 1640, Fetal Clone al 10% (de Hyclone, Inc.), Penicilina/estreptomicina 50 U/ml, 1X L-Glutamina, piruvato de Na 1 mM, y β -mercaptopropionato 5,5 x 10^{-5} M. Se adquirieron los componentes de los medios de Gibco BRL, excepto Fetal Clone al 10%, que se adquirió de Hyclone, Inc. Dos días antes de la transfección, se diluyeron las células L1.2 a 1:5 en medio nuevo. Esto dio como resultado 150 millones de células en fase logarítmica a una concentración de aproximadamente 1-3 millones de células/ml.

ADN de CXCR3 y transfección

40 Se transformaron células *E. coli* XL1Blue (Stratagene, Inc. (Nº de cat. 200236)) con pcDNA3-Clone8 (ejemplo 2; Loetscher, M., *et al.*, J. Exp. Med., 184: 963-969 (1996)) según el protocolo del fabricante. Se hicieron crecer los transformantes a 37°C mientras se agitaban a 250 rpm en 500 ml de LB que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después se recogió el cultivo por centrifugación a 8.000 x g, y se purificó el plásmido usando una columna y protocolo de purificación de plásmidos Maxi (Qiagen, Nº de cat. 12162). Se determinaron la concentración y pureza del plásmido usando un gel de agarosa al 1% y las razones de DO260/280. Se suspendió el ADN del plásmido en H₂O bidestilada, y se almacenó a -20°C hasta su uso.

45 Se usó endonucleasa ScaI para linearizar el vector. Se digirieron 100 μg de ADN con 10 μl de ScaI durante 8 horas a 37°C siguiendo el protocolo del fabricante (GibcoBRL, Nº de cat. 15436-017). Se usaron 20 μg directamente en la construcción de transfección estable. Se limpian de proteínas y sales 80 μg por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), precipitación con etanol al 100% (con 0,1 volúmenes de NH₄COOH), y un lavado con etanol al 70%.

50 Se prepararon transfectantes estables de una línea celular de linfoma de células pre-B murino (L1.2) esencialmente tal como se describe (Ponath, P. D., *et al.*, J. Exp. Med., 183: 2437-2448 (1996)). Se sometieron a electroporación 25 millones de células L1.2 en 0,8 ml de 1x PBS con 20 μg de ADN linearizado, 20 μg de ADN linearizado que se limpió después (véase anteriormente en Linealización de ADN), o sin ADN. Antes de la electroporación, se incubaron las células L1.2 y el ADN durante 10 minutos en tubos cónicos de 50 ml (Modelo Falcon 2070) mezclando suavemente (agitando) cada 2 minutos. Se transfirió la mezcla de células L1.2-ADN a cubetas para Gene Pulser (BioRad, Nº de cat. 165-2088) con un espacio de electrodo de 0,4 cm. Entonces se sometió a electroporación la mezcla a 250 V y 960 μF , midiéndose la duración del choque y el voltaje real. Tras la electroporación, se dejó la cubeta en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se transfirió toda la mezcla de células L1.2-ADN a un frasco T-25 (Costar), y se hicieron crecer durante dos días en 10 ml de medio no selectivo.

Selección

65 Despues se sometieron a selección las células L1.2 que expresan CXCR3 para determinar la resistencia a neomicina. Tras dos días de crecimiento en un medio no selectivo, se añadieron 10 ml de Geneticin (GibcoBRL) 1,6 g/l hasta una concentración final de 0,8 g/l (la concentración de mantenimiento y selectiva). Esto se permitió crecer

ES 2 288 305 T3

durante de 10 a 15 días, añadiendo medio selectivo nuevo cuando las células empezaron a crecer demasiado. El medio selectivo nuevo consistía en RPMI-1640 complementado con suero bovino al 10% y G418 800 µg/ml.

Se evaluó la expresión de CXCR3 en la superficie celular mediante quimiotaxis, y unión de ligando y también se usó análisis de Scatchard para monitorizar la expresión en superficie. Tras selección con G418, las células L1.2 que expresan CXCR3 se seleccionaron basándose en su capacidad de realizar quimiotaxis. Para cada reacción de electroporación, se recogieron 30 ml (800.000 células/ml), y se suspendieron en 600 µl de medio selectivo. Se colocó el medio selectivo, 600 µl, que contenía IP-10 10 nM, en la cámara del fondo de las placas de cultivos celulares BioCoat de Becton-Dickinson (Nº de cat. 40575). Se añadieron 100 µl/pocillo de las células L1.2 en la cámara superior de las placas BioCoat. Entonces se dejó a estas células realizar quimiotaxis durante la noche en un incubador con CO₂ a 37°C. Se retiraron las cámaras superiores con las células que no habían realizado quimiotaxis. Se recogieron las células que habían realizado quimiotaxis, se transfirieron a medio nuevo y se dejaron crecer en una placa de 24 pocillos. Posteriormente, se expandieron en un frasco T-25 y después en un T-75 de Costar.

Se clonaron los transfectantes que expresaron altos niveles de receptores por dilución limitante. Se diluyeron las células transfectadas con CXCR3 hasta entre 30-3 células/ml en medio de selección que contenía G418. Se añadieron alícuotas a placas de cultivo de 96 pocillos a 100 µl/pocillo. Tras 14 días a 37°C y CO₂ al 5%, se identificaron los pocillos que contenían colonias individuales en un microscopio invertido. Entonces se transfirieron 50 µl de las células y se tiñeron con AcM anti-CXCR3 y se analizaron por citometría de flujo. El nivel de expresión del receptor correlacionó con la intensidad de fluorescencia media y se seleccionaron las células de alta expresión. Una vez que se estableció una línea celular estable, se expandió la línea para su uso.

Además de la selección para determinar la resistencia a antibióticos y quimiotaxis, pueden seleccionarse además las células transfectantes con CXCR3 mediante clasificación para determinar mayor expresión del receptor mediante tinción con anticuerpos, aunque esto no se realizó aquí. Para la tinción, pueden resuspenderse las células transfectantes a 5 x 10⁶/ml en PBS estéril que contiene albúmina sérica bovina al 1%. Puede añadirse AcM anti-CXCR3 aislado, estéril hasta una concentración final de 3 µg/ml y se incubaron las células en hielo durante 30 minutos. Tras lavar con PBS estéril frío, puede detectarse el AcM unido con IgG anti-ratón conjugada con FITC, esterilizada mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Pueden lavarse de nuevo las células y se clasifican por citometría de flujo. Pueden recogerse el 5% superior de las células positivas y devolverse al cultivo tisular para expansión en condiciones selectivas (por ejemplo, RPMI-1640 complementado con suero bovino al 10% y G418 800 µg/ml).

35 Ejemplo 3

IP-10 se une con alta afinidad a un receptor expresado en células L1.2 transfectadas con ADN de CXCR3 y en células T activadas (ejemplo ilustrativo)

Se realizaron estudios de unión adicionales usando IP-10 radiomarcado. Se llevó a cabo la unión de quimiocinas a las células diana tal como se describió anteriormente (Ponath, P. D., et al., J. Clin. Invest., 97: 604-612 (1996); Van Riper, G., et al., J. Exp. Med., 177(3): 851-856 (1993)). Se lavaron una vez las células en PBS y se resuspendieron en tampón de unión (HEPES 50 mM, pH 7,5, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA al 0,5%, y azida al 0,05%) a una concentración de 10⁷/ml. Se dispensaron alícuotas de 50 µl (5 x 10⁵ células) en tubos de microfuga, seguido por la adición de competidor frío (IP-10 sin marcar) y quimiocina radiomarcada (IP-10 marcada con ¹²⁵I 0,05 nM). El volumen de reacción final fue de 200 µl. Se determinó la unión inespecífica incubando las células con quimiocinas radiomarcadas en presencia de quimiocinas sin marcar 250-500 nM. Tras una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces las células con 1 ml de tampón de unión que contenía NaCl 0,5 M. Entonces se contaron los sedimentos celulares. Se presentó la competencia como el porcentaje de unión específica tal como se calcula por 100 x [(S-B)/(T-B)], siendo S la radioactividad de la muestra, B es la unión de fondo y T es la unión total sin competidores. Se obtuvo la unión de fondo incubando células con quimiocina radiomarcada y un exceso de quimiocinas sin marcar de al menos 400 veces. Se usaron duplicados a lo largo de los experimentos y las desviaciones estándar siempre fueron < 10% de la media. Se repitieron todos los experimentos al menos tres veces. Se calculó el ajuste de la curva y las concentraciones que inhiben la unión específica al 50% (CI₅₀) mediante el software KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA).

Las figuras 5A-5B muestran que la IP-10 marcada con ¹²⁵I se unió a las células L1.2 transfectadas con CXCR3 (figura 5A) y a células T activadas por CD3 (figura 5B), y que esta unión podría inhibirse con concentraciones crecientes de IP-10 fría. El análisis de Scatchard reveló que IP-10 se unió a los transfectantes L1.2 con CXCR3 con una Kd de 614 pM, y que estos transfectantes expresaron 37.000 receptores por célula (figura 5A, recuadro). Un análisis similar de células T estimuladas con IL-2, activadas con anti-CD3 reveló una Kd de 156 pM, y 17.000 receptores por célula (figura 5B). La unión de IP-10 marcada con ¹²⁵I a células T activadas podría inhibirse completamente por Mig fría en las mismas condiciones, aunque Mig fue ligeramente menos eficaz bloqueando la unión de IP-10 marcada con ¹²⁵I de lo que lo fue IP-10 fría (no se muestra). IP-10 y Mig se unen a CXCR3 con alta afinidad (Kd~150-600 pM).

ES 2 288 305 T3

Ejemplo 4

Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales (AcM) específicos para CXCR3

5 Para desarrollar antagonistas de CXCR3, y para estudiar la expresión y regulación del receptor, se produjo un conjunto de AcM inmunizando ratones con un péptido sintético correspondiente al extremo N-terminal de este receptor. Estos AcM reconocieron específicamente los transfectantes con CXCR3, pero no un intervalo de transfectantes con otros receptores.

10 *Producción de AcM y citometría de flujo*

Se generaron AcM que reaccionan con CXCR3 inmunizando ratones Balb/C con 10 µg de un péptido sintético de 37 monómeros que corresponde a los primeros 37 aminoácidos del extremo N-terminal de CXCR3 (véase también, Loetscher M., *et al.*, J. Exp. Med., 184: 963-969(1996)), cinco veces durante un periodo de 10 semanas. Se sintetizó 15 Este péptido y se acopló a una proteína purificada derivada de tuberculina (Severn Biotech Ltd., Kidderminster, R. U.). La primera inmunización fue por vía intraperitoneal (IP) con adyuvante completo de Freund (FCA). Las segunda, tercera y cuarta inmunizaciones fueron por vía IP con adyuvante incompleto de Freund (FIA), y la inmunización final fue con conjugado de péptido solo (sin adyuvante), y se administró por vía intravenosa (IV). Se extrajo el bazo cuatro 20 días después de la última inmunización, y se realizó la fusión celular usando la línea celular SP2/0, tal como se ha descrito (Coligan, J. E., *et al.*, Current Protocols In Immunology (John Wiley and sons, Nueva York), unidad 2.5.4 (1992)). Se generaron AcM que reaccionaron con el péptido de 37 monómeros del extremo N-terminal tal como se evaluó por ELISA (Coligan, J. E., *et al.*, Current Protocols In Immunology (John Wiley and sons, Nueva York), Unidad 2.1.3 (1992)). Se identificaron AcM que reaccionan con CXCR3 usando células L1.2 transfectadas con CXCR3 y sin transfectar o células 300.19 (una línea de células B murinas, Loetscher, M. *et al.*, J. Exp. Med., 184: 963-969, (1996)), 25 y tinción inmunofluorescente y análisis usando un FACScan® (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA).

Se generaron anticuerpos monoclonales específicos para CXCR3. Se encontraron ocho AcM que reconocen CXCR3 expresado en superficie, tal como se valora por la tinción de las células L1.2 transfectadas con CXCR3, pero no de las células L1.2 sin transfectar o células L1.2 transfectadas con otros tipos de receptores. Se muestra el perfil de 30 FACS de uno de estos AcM, 1C6; se muestra en la figura 6. Estos AcM también tiñeron células T humanas y clones de células T que se habían activado *in vitro* con PHA o anti-CD3 (ilustrado en la figura 7C con 1C6). Sin embargo, estos AcM anti-CXCR3 no reaccionaron con neutrófilos (ilustrado en la figura 7A con 1C6), monocitos, o eosinófilos (no se muestra). Este patrón de reactividad fue compatible con el análisis por transferencia de tipo Northern. Sin embargo, el análisis fenotípico reveló inesperadamente la expresión de CXCR3 en un gran subconjunto de linfocitos circulantes (figura 7B). Se observó este patrón de expresión en todos los individuos examinados, indicando que CXCR3 se expresa habitualmente en un subconjunto de linfocitos sanguíneos. Se encontró que CXCR3 marcó una población de 35 células T circulantes, que estaban contenidas en el subconjunto de CD45RO+ (memoria).

40 Se depositó el hibridoma IC6 murino (también denominado en lo sucesivo LS77-IC6) el 28 de marzo de 1997 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, según los términos del tratado de Budapest, con el número de registro ATCC HB-12330, en nombre de LeukoSite, Inc., 215 First Street, Cambridge, MA, 02142, EE. UU.

Ejemplo 5

45 *CXCR3 se expresa en células T activadas/memoria (ejemplo ilustrativo)*

Citometría de flujo

50 Se han descrito AcM frente a CXCR1, CXCR2, CXCR3, y CCR5 (Qin, S., *et al.*, Eur. J. Immunol., 26: 640-647 (1996); Heath, H., *et al.*, J. Clin. Invest., en prensa (1997)). El AcM anti-CXCR4 12G5 (Endres, M. J., *et al.*, Célula, 87: 745-756 (1996)) lo proporcionó amablemente Jim Hoxie (Univ. Penn.). Los AcM conjugados con PE frente a CD4, CD8, CD14, CD20, CD25, CD26, CD69, CD45RO, CD45RA, CD95 y anti-CD3 y anti-CD4 Cy-Chrome los suministró PharMingen (La Jolla, CA).

55 Para evaluar la reactividad de AcM frente a células o leucocitos transfectados, se usaron inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. Se lavaron una vez las células con PBS y se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía suero humano al 2% y azida de sodio al 0,1% (tampón de tinción), anticuerpo purificado 5 µg/ml, AcM control emparejado por isotipo IgG_{2a} 5 µg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) o 50 µl de sobrenadante de cultivo de hibridoma. Tras 20 min a 4°C, se lavaron dos veces las células con el tampón de tinción y se resuspendió en 50 µl de F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con FITC de IgG anti-ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Tras incubar durante 20 min a 4°C, se lavaron dos veces las células en tampón de tinción y se analizaron en el FACScan® para determinar el nivel de expresión en superficie. Se usó yoduro de propidio para excluir las células muertas.

60 Un análisis por inmunofluorescencia de dos colores de los linfocitos mostró que fueron principalmente las células CD3+ las que expresaron CXCR3, aunque una pequeña proporción de células CD20+ (B) y células CD56+ (NK) también expresó este receptor (figura 8). Un análisis de tres colores de células T, realizado usando anti-CD3 Cy-Chrome

ES 2 288 305 T3

para marcar células T, mostró que una parte de las células CD4+ y una parte de las células CD8+ expresaron CXCR3 (figura 9). Un análisis usando marcadores de activación celular, tales como CD25 y CD69, reveló que las células T activadas generalmente expresaron este receptor. Las células T CXCR3+ fueron CD95+, CD45RO+, y CD45RA^{low}, un fenotipo que concuerda con la activación previa. También se comparó la expresión de CXCR3 y CCR5, un receptor de quimiocinas que también está sesgado en su expresión en células T activadas previamente (Wu, L., comunicación personal). La figura 9 muestra que las células CCR5+ en sangre estaban contenidas dentro del subconjunto de CXCR3+, y que se expresó CXCR3 más ampliamente que CCR5. Al contrario que otros receptores de quimiocinas de células T, tales como CCR5 o CXCR4, CXCR3 se expresó en la mayoría de las células T activadas, circulantes.

10 Ejemplo 6

El AcM anti-CXCR3 bloquea la unión de IP-10 y la quimiotaxis

Se evaluó la quimiotaxis de leucocitos humanos usando una modificación de un ensayo transendotelial (Carr, M. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(9): 3652-3656 (1994)), que se ha descrito previamente (Ponath, P. D., et al., J. Clin. Invest., 97: 604-612 (1996)), usando la línea de células endoteliales ECV 304 (Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Porton Down, Salisbury, R. U.). Se colocaron en un tubo las células que habían migrado a la cámara inferior y se obtuvieron recuentos celulares relativos usando el FACScan®.

20 También se sometieron a prueba los AcM anti-péptido para determinar su capacidad para inhibir la quimiotaxis de blastos de células T activadas CD3. Los resultados para los AcM denominados 1A5, 1C6, 3A8, 5F10, 10C6 y 10G12 se ilustran en la figura 10. Un AcM, 1C6, fue superior a los demás AcM en su capacidad para bloquear la quimiotaxis de células T hacia IP-10. El AcM 1C6 pudo inhibir completamente la quimiotaxis de células T hacia IP-10 de manera dependiente de la dosis, con una CI₅₀ de -0,8 µg/ml (figura 11). Una concentración de 2-5 µg/ml logró 25 una inhibición del 100%, usando una concentración óptima de IP-10 (12,5 nM) en el fondo del transwell. 1C6 no pudo inhibir significativamente la quimiotaxis de células T hacia MCP-1 en las condiciones que se usaron (figura 10), que se produce mediante el receptor de quimiocinas CCR2b.

30 El AcM 1C6 también pudo bloquear completamente la unión de IP-10 marcada con ¹²⁵I a las células T activadas, con una CI₅₀ de 0,16 µg/ml (figura 12). Entre 1 y 10 µg/ml de anticuerpo proporcionaron inhibición completa. La inhibición completa tanto de la unión de IP-10 como de la quimiotaxis por AcM 1C6 indica que las células T activadas no expresan otro receptor que se une a esta quimiocina.

35 El análisis por transferencia de tipo Northern indicó que CXCR3 se expresó en células T activadas. Usando un panel de AcM específicos, se encontró que CXCR3 se expresa en un subconjunto de células T sanguíneas, así como en otros tipos de leucocitos (células B y células NK). Las células T que expresan CXCR3 tienen un fenotipo que es compatible con la activación previa, es decir CD45RO+, CD26+ (ejemplo 5). La tinción de las células T aumentó notablemente cuando se activaron las células T por CD3 e IL-2, lo que se correlaciona con el aumento de la migración celular en respuesta a la unión de IP-10 y ligando radiomarcado.

40 La baja sensibilidad de las células T sanguíneas a IP-10 o Mig, al menos en los ensayos de quimiotaxis, parece anómala. Una posible explicación es que factores distintos a la expresión del receptor puedan determinar la sensibilidad celular a quimiotácticos. Un acoplamiento de la proteína G apropiada puede ser necesario para la señalización. Otra posibilidad es que el procedimiento de separación de la sangre altere este receptor, tal como se ha observado para 45 los receptores de IL-8 en células T y células NK (C. R. Mackay). La inyección de IP-10 en la piel de un animal de laboratorio apropiado puede abordar la significación de la expresión de CXCR3 en células T sanguíneas. En células T activadas, IP-10 es uno de los quimiotácticos más potentes. La activación de células T puede inducir las moléculas de señalización del receptor o el acoplamiento necesario para la transducción de la señal.

50 Ejemplo 7

El AcM 1C6 inhibe selectivamente la [Ca²⁺]_i por células T en respuesta a IP-10, pero no a Mig

55 Se determinó la concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) de la siguiente manera. Se preparó una disolución madre de Fura-2AM (Molecular Probes, Eugene, O) disolviendo 50 µg del colorante en 44 µl de DMSO. Inmediatamente antes de la adición a las células, se diluyó esta disolución madre 1:100 en HBSS con Ca²⁺ y Mg²⁺ y BSA al 2%. Se añadió Fura-2 AM a las células a una concentración final de 0,2 moles/10⁶ células a 37°C durante 30 minutos. Después del marcaje, se retiró el exceso de colorante por centrifugación y se resuspendieron las células a una concentración de 10⁶/ml en NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, glucosa 0,5 mM, BSA al 0,025% y HEPES 20 mM, pH 7,4. Se midió [Ca²⁺]_i usando excitación a 340 y 380 nm en un espectrómetro de fluorescencia Hitachi F-2000. Se realizó la calibración usando NP-40 al 1% para la liberación total y EGTA 25 µM para quesar el Ca²⁺ libre.

IP-10 y Mig inducen [Ca²⁺] por células T humanas, y cada quimiocina pudo desensibilizar completamente la 65 respuesta a la otra quimiocina (figuras 13A-13B). Una titulación de las quimiocinas reveló que la [Ca²⁺]_i máxima se logró con cantidades tan pequeñas como IP-10 2 nM o Mig 2 nM. Para examinar la función agonista/antagonista de AcM 1C6, se evaluaron células T activadas para determinar la [Ca²⁺]_i tras la inyección de AcM 1C6, o un AcM control emparejado por isotipo irrelevante. Las células T inyectadas con un AcM control emparejado por isotipo irrelevante

ES 2 288 305 T3

mostró una fuerte respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a la inyección posterior de IP-10 (no se muestra). Sin embargo, las células T tratadas con AcM 1C6 no mostraron $[Ca^{2+}]_i$ en la estimulación con IP-10 2 nM. Se suprimió completamente la $[Ca^{2+}]_i$ en células T activadas en respuesta a IP-10 por 12,5 mg de 1C6. Sin embargo, cantidades tan grandes como 50 μ g/ml de 1C6 no tuvieron efecto sobre la respuesta de las células T a Mig 2 nM (figura 13D), indicando que este AcM 5 afectaba de forma diferente a los dos ligandos. Como control, se sometió a prueba el AcM 1C6 para determinar sus efectos sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de células T en respuesta a MIP-1 α o RANTES, que se produce mediante receptores distintos a CXCR3 (no se muestra). El AcM no tuvo efecto en las condiciones usadas.

10 El AcM 1C6, que inhibe la unión de IP-10 y la quimiotaxis inducida por IP-10, también inhibió el flujo de calcio por células T activadas, pero no inhibió el flujo de calcio inducido por Mig en estas condiciones. Estos resultados sugieren que IP-10 y Mig se unen y/o señalizan mediante regiones distintas del CXCR3, y que AcM 1C6 pudo bloquear el sitio de unión a IP-10 y la posterior señalización. Por tanto, es posible desarrollar antagonistas del receptor que inhiban selectivamente los efectos de quimiocinas individuales, ilustrado aquí usando AcM 1C6.

15 Tal como se discute a continuación, la tinción de transfectantes con CXCR3 puede inhibirse por un péptido que comprende los primeros 15 residuos de aminoácidos del extremo N terminal de CXCR3. La inhibición de la unión de IP-10 y las respuestas posteriores por AcM 1C6 sugieren que esta región es de particular importancia funcional para la unión del ligando. Basándose en la incapacidad de 1C6 para inhibir el flujo de calcio inducido por Mig en las 20 condiciones usadas, el epítopo reconocido por AcM 1C6, que parece ser importante para la unión y señalización de IP-10, no parece estar implicado en la unión y/o señalización de Mig.

Ejemplo 8

Mapeo de epítopos

25 Se pidieron péptidos a Genemed, South San Francisco, CA. Los péptidos, de 15 aminoácidos de longitud cada uno, corresponden a diferentes partes de los primeros 45 residuos del extremo N terminal de la proteína CXCR3:

30 P1: MVLEVSDHQVLNDAE (SEQ ID NO:2, residuos 1-15)
P2: VAALLENFSSSYDYG (SEQ ID NO:2, residuos 16-30)
P3: ENESDSCCTSPPCPQ (SEQ ID NO:2, residuos 31-45)

35 En primer lugar se disolvieron los péptidos en DMSO y se diluyeron hasta 1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para someter a prueba la capacidad de los péptidos para bloquear la tinción con anticuerpo 1C6, se incubó 1 μ g/ml de anticuerpo 1C6 en 1X PBS, suero de ternero fetal (FCS) al 5% con transfectantes L1.2 con CXCR3 (10^5 células; véase Materiales y métodos para los ejemplos 3-9) en presencia de 100 μ g/ml de cada péptido durante 30 minutos a 4°C. El volumen final fue de 100 μ l. Se llevó a cabo la tinción positiva en ausencia de péptido. Se detectó el 40 AcM unido con IgG-FITC anti-ratón y se analizaron los resultados mediante citometría de flujo.

45 El marcaje con AcM 1C6 se inhibió completamente por P1, lo que sugiere que el AcM reconoce un epítopo en los primeros 15 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína CXCR3 (figuras 14A-14D). También se inhibió por el péptido P1, la unión de otro AcM denominado 3A8 (también denominado en lo sucesivo LS77-3A8), que se produjo a partir de la misma fusión (LS-77) que el AcM 1C6.

Ejemplo 9

Producción de anticuerpos monoclonales anti-CXCR3 mediante inmunización con células transfectadas

50 Se generaron anticuerpos monoclonales anti-CXCR3 mediante inmunización de ratones con células L1.2 transfectadas con un constructo de CXCR3 y que expresan altos niveles de CXCR3 humano (véase Materiales y métodos anteriormente). Se realizó la inmunización y generación de hibridomas de fusión tal como se describe (Qin, S. et al., Eur. J. Immunol., 26: 640 (1996); y Heath, H. et al., J. Clin. Invest., 99(2): 178 (1997)). Se identificaron AcM 55 anti-CXCR3 por tinción positiva de células T humanas activadas y transfectantes con CXCR3. Se obtuvieron ocho anticuerpos anti-CXCR3 en una fusión (LS-104).

60 Se sometió a prueba la capacidad de estos anticuerpos para inhibir la unión de IP-10 a CXCR3. Se incubaron sobrenadantes (25 μ l) de cultivos tisulares de los clones positivos con células transfectantes L1.2 con CXCR3 (Materiales y métodos para los ejemplos 3-9) y 0,05 nM de IP-10 marcado con 125 I radiomarcado en 1X PBS, suero de ternero fetal (FCS) al 5% (FCS) (volumen final de 100 μ l) durante 30 minutos a 4°C. También se usaron sobrenadantes de AcM 1C6 y un AcM anti-CXCR2 (receptor B de IL-8) como controles de AcM específico e inespecífico, respectivamente. Se determinó la unión total en ausencia de anticuerpos. Se obtuvo la unión inicial usando IP-10 sin marcar 40 nM como el competidor y se usó este valor para calcular el porcentaje de inhibición por los AcM. Se muestran los resultados en la figura 15. Todos los anticuerpos de esta fusión (LS-104) pudieron bloquear la unión de IP-10, con un porcentaje de 65 inhibición que oscila desde el 50-70%.

También se evaluaron estos AcM para determinar su capacidad para inhibir la señalización (capacidad para inducir el flujo de Ca^{2+}) esencialmente tal como se describió en el ejemplo 7, pero ninguno de los anticuerpos pudo bloquear

ES 2 288 305 T3

la señalización de Ca^{2+} mediada por Mig en las condiciones usadas. La inhibición por anticuerpo de la señalización y unión de CXCR3 mediada por IP-10, pero no la señalización mediada por Mig mediante CXCR3, indica que estos anticuerpos puede inhibir selectivamente las funciones de CXCR3 mediadas por IP-10.

5 También se llevaron a cabo estudios de mapeo de epítopos usando los anticuerpos de la fusión LS-104 esencialmente tal como se describió en el ejemplo 8. Los resultados indican que se reconocen una variedad de sitios de unión (tabla 2). Los resultados sugieren que tres de los anticuerpos reconocen epítopo(s) dentro de los primeros 15 aminoácidos del extremo N-terminal de CXCR3 (residuos 1-15 de la SEQ ID NO: 2), y dos de los anticuerpos reconocen epítopo(s) dentro de los aminoácidos 16-30 de CXCR3 (residuos 16-30 de la SEQ ID NO: 2). El péptido P3 no bloqueó la tinción con ninguno de estos anticuerpos, indicando que ninguno de estos anticuerpos se unió al péptido que representa los aminoácidos 31-45 de CXCR3 (residuos 31-45 de la SEQ ID NO: 2). La tinción usando los tres AcM restantes no pudo inhibirse significativamente mediante cualquiera de los péptidos en las condiciones usadas, sugiriendo que estos AcM pueden unirse a epítopos que comprenden segmentos solapantes de los péptidos, epítopos conformacionales mostrados sobre la superficie celular o epítopos de otras partes del receptor. Estos datos también sugieren que también 10
15 pueden obtenerse AcM frente a diversas partes de CXCR3 inmunizando ratones con transfectantes con el receptor.

TABLA 2

	Número de AcM fusión	Nombre de AcM	Mapeo de epítopos de AcM Anti-CXCR3	Región de unión ³
20	LS-77 ¹		Péptidos que inhiben la tinción con AcM de transfectantes con CXCR3	
25		1C6	P1	AA 1-15
		3A8	P1	AA 1-15
30	LS-104 ²			
		2F8	ninguno	
		3A12	P1	AA 1-15
35		3E2	P1	AA 1-15
		4B4	P2	AA 16-30
		4D2	ninguno	
		5B12	ninguno	
40		7B8	P2	AA 16-30
		8D5	P1	AA 1-15

¹ Anticuerpos obtenidos mediante inmunización con péptidos
² Anticuerpos obtenidos mediante inmunización con transfectantes con CXCR3
³ Posición de los residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2

50 Ejemplo 10

Análisis inmunohistoquímico de tejidos normales e inflamados usando AcM 1C6

Tejidos

Se obtuvieron tejidos humanos (normales e inflamados) del Instituto Nacional de Investigación de Enfermedades (National Disease Research Institute), una organización de servicio fundada por los Institutos Nacionales de Salud. Se obtuvieron tejidos de macaco (*Macaca mulatta*) normales del New England Regional Primate Research Center, Southboro, MA.

Inmunohistoquímica

60 Técnica de la fosfatasa alcalina. Se hicieron cortes de tejido a un grosor de 4 μm , se desecaron y después se fijaron en paraformaldehído al 2%/0,5X PBS durante 10 minutos a 4°C. Tras lavar con PBS, se bloquearon los sitios de unión del anticuerpo inespecíficos con suero de cabra normal al 10%/suero AB humano al 5%/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el AcM 1C6 murino anti-CXCR3, purificado se diluyó hasta una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en Triton X 100 al 0,3%/Tween 20 al 0,2%/FCS al 1%/suero AB humano al 5% y azida

ES 2 288 305 T3

de sodio al 0,1%, y se aplicó a los cortes de tejido que se incubaron la noche a 4°C. Se usó un anticuerpo monoclonal irrelevante emparejado por isotipo como control negativo en cortes seriados de tejidos (IgG1, MOPC-21, Sigma, St. Louis, MO). Posteriormente, se añadieron IgG anti-ratón de cabra biotinilado (Vector, Burlingame, CA) y complejos avidina-biotina-fosfatasa alcalina (Biogenex, San Ramon, CA) secuencialmente. Se usó Fast Red (Biogenex, San Ramon, CA), que contenía levamisol para bloquear la actividad de la fosfatasa alcalina endógena, como cromógeno y hematoxilina de Mayers como tinción de contraste.

Resultados

10 Ganglios linfáticos normales humanos y de macaco: En ambas especies, la tinción se limitó al 70-80% de los linfocitos dentro de la paracorteza y cordones medulares, lo que concuerda con la expresión de CXCR3 en linfocitos T.

15 Bazo humano y de macaco: En ambas especies, se limitó la tinción a linfocitos a lo largo de la periferia de los folículos linfoides de la pulpa blanca y a linfocitos dispersos dentro de los sinusoides esplénicos. Este patrón concuerda con la expresión de CXCR3 en linfocitos T.

20 Timo humano: La médula tímica contenía células mononucleares inmunorreactivas para CXCR3 dispersas que concuerdan morfológicamente con linfocitos.

Este análisis reveló que el AcM 1C6 reconoce el CXCR3 de macaco. Estudios por separado mostraron que CXCR3 está regulado por incremento cultivando linfocitos T de macaco con concanavalina A e IL-2, que los blastos de células T de macaco pueden realizar quimiotaxis en respuesta a IP-10 humana, que el AcM 1C6 puede bloquear esta quimiotaxis, y que la incubación previa con IP-10 humana desensibiliza los blastos de macaco, tal como se evaluó por quimiotaxis.

En la siguiente discusión, se identificaron números variables de “células mononucleares” inmunorreactivas para CXCR3 tanto en tejidos normales como inflamados. Estas células mononucleares son lo más probablemente linfocitos T por los siguientes motivos:

- 30 a) la citometría de flujo reveló que la mayoría de las células CXCR3⁺ son linfocitos T, aunque se ha detectado CXCR3 en algunas células B y células NK, pero no en otras células mononucleares;
- b) dentro de los ganglios linfáticos y el bazo, los linfocitos de las regiones que se sabe que están pobladas por células T son las únicas células que son inmunorreactivas para CXCR3; y
- c) las células mononucleares inmunorreactivas para CXCR3 en los tejidos enumerados a continuación concuerdan morfológicamente con linfocitos.

40 Tejidos humanos no inflamados: En tejidos humanos no inflamados incluyendo corazón, hígado, riñón, pulmón, piel, mama, músculo esquelético, glándula salival, páncreas, vagina, útero y ovario, se limitó la expresión de CXCR3 a células mononucleares intersticiales dispersas, raras. En cortes de intestino delgado y grueso, se observaron células mononucleares que expresan CXCR3 en la lámina propia y las placas de Peyer. En el hígado también se tiñeron los linfocitos periductales y se tiñeron ligeramente los hepatocitos.

45 Cerebro humano: no se observó tinción.

Tejidos humanos inflamados: Se examinaron varios cortes de tejidos inflamados de manera crónica caracterizados por acumulación intersticial y perivascular de células mononucleares para determinar la expresión de CXCR3. En 50 estos casos, incluyendo tejidos de pacientes humanos con nefritis intersticial (1 caso, tejido renal), colitis ulcerosa (1 caso, tejido colónico), enteritis (1 caso, intestino delgado) y vaginitis crónica (4 casos, vagina), aproximadamente el 50%-90% de las células mononucleares eran inmunorreactivas para CXCR3. Por tanto, en comparación con los tejidos normales, los tejidos inflamados de manera crónica contenían un mayor número de células mononucleares intersticiales, y un mayor porcentaje de estas células eran inmunorreactivas para CXCR3.

55 El análisis de los tejidos inflamados reveló que aproximadamente el 50-90% de los linfocitos expresaron CXCR3, mientras que porcentajes mucho menores de los linfocitos en los tejidos normales correspondientes expresaron CXCR3. Estas observaciones sugieren reclutamiento específico de linfocitos que expresan CXCR3, lo más probablemente linfocitos T que expresan CXCR3, en los sitios de inflamación crónica. El CXCR3 parece marcar células T con una predilección por el guiado o migración a los sitios inflamatorios.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una proteína del receptor 3 de quimiocinas CXC (CXCR3) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe una o más funciones de dicha proteína CXCR3 humana seleccionadas del grupo que consiste en unión a un ligando, actividad de señalización inducida por ligando y función de respuesta celular inducida por ligando, en el que dicho ligando se selecciona del grupo que consiste en IP-10 y Mig.
- 10 2. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe selectivamente la unión de IP-10 a dicha proteína CXCR3 humana.
- 15 3. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la actividad de señalización inducida por IP-10 o la función de respuesta celular.
- 20 4. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 3, en el que dicha actividad de señalización es un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico $[Ca^{2+}]_i$, y dicha respuesta celular es quimiotaxis.
- 25 5. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que la unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a una proteína CXCR3 humana se inhibe mediante un polipéptido que corresponde al segmento N terminal extracelular de la SEQ ID NO: 2.
- 30 6. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que la unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a una proteína CXCR3 humana se inhibe mediante un polipéptido que consiste en los residuos 1-15 de la SEQ ID NO: 2.
- 35 7. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 6, en el que dicha unión no se inhibe mediante un polipéptido que consiste en los residuos 16-30 de la SEQ ID NO: 2 o mediante un polipéptido que consiste en los residuos 31-45 de la SEQ ID NO: 2.
- 40 8. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que la unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a una proteína CXCR3 humana se inhibe mediante un polipéptido que consiste en los residuos 16-30 de la SEQ ID NO: 2.
- 45 9. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento inhibe la activación de células T.
- 50 10. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que dicho ligando es Mig humana.
- 55 11. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que dicho ligando es IP-10 humana.
- 60 12. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno compite con el anticuerpo monoclonal 1C6 (número de registro ATCC HB-12330) por la unión a una proteína CXCR3 humana.
- 65 13. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es una inmunoglobulina humanizada que comprende las CDR de cadena ligera (CDR1, CDR2 y CDR3) y las CDR de cadena pesada (CDR1, CDR2 y CDR3) del anticuerpo monoclonal 1C6 (número de registro ATCC HB-12330) y una región de entramado de origen humano, en el que dicha inmunoglobulina humanizada tiene la especificidad epítópica del anticuerpo monoclonal 1C6 (número de registro ATCC HB-12330).
- 70 14. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es el anticuerpo monoclonal 1C6 (número de registro ATCC HB-12330) o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 75 15. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 10 y 11, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo químico o un fragmento de unión a antígeno de uno cualquiera de los anteriores.
- 80 16. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 10, 11 y 15, en el que dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)'₂ y un fragmento Fv.
- 85 17. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 5-9 y 12-14, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo químico o un fragmento de unión a antígeno de uno cualquiera de los anteriores.

ES 2 288 305 T3

18. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 5-9, 12-14 y 17, en el que dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)'₂ y un fragmento Fv.

5 19. Línea celular de hibridoma HB-12330 (número de registro ATCC HB-12330).

20. Anticuerpo anti-CXCR3 producido por la línea celular de hibridoma según la reivindicación 19, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

10 21. Composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 10, 11, 15 y 16, y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

15 22. Composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 5-7, 12-14, 17, 18 y 20, y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

15 23. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 10, 11, 15 y 16 para su uso en tratamiento o diagnóstico.

20 24. Uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 10, 11, 15 y 16 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o estado inflamatorio.

25 25. Uso según la reivindicación 24, en el que dicha enfermedad o estado inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, nefritis, esclerosis múltiple y rechazo de injerto.

25 26. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 5-7, 12-14, 17, 18 y 20 para su uso en tratamiento o diagnóstico.

30 27. Uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 5-7, 12-14, 17, 18 y 20 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o estado inflamatorio.

35 28. Uso según la reivindicación 27, en el que dicha enfermedad o estado inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, nefritis, esclerosis múltiple y rechazo de injerto.

29. Método de detección de una proteína del receptor 3 de quimiocinas CXC (CXCR3) humana en una muestra que comprende:

40 a) poner en contacto una muestra con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 10, 11, 15 y 16, en condiciones adecuadas para la unión específica de dicho anticuerpo o fragmento a una proteína CXCR3 humana que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2; y

45 b) detectar complejos anticuerpo-CXCR3 o fragmento de anticuerpo-CXCR3,

en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de un CXCR3 humano en dicha muestra.

50 30. Método de detección de una proteína CXCR3 humana según la reivindicación 29, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una etiqueta detectable.

50 31. Método de detección de una proteína del receptor 3 de quimiocinas CXC (CXCR3) humana en una muestra que comprende:

55 a) poner en contacto una muestra con un anticuerpo fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 5-7, 12-14, 17, 18 y 20, en condiciones adecuadas para la unión específica de dicho anticuerpo o fragmento a una proteína CXCR3 humana que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2; y

60 b) detectar complejos anticuerpo-CXCR3 o fragmento de anticuerpo-CXCR3,

en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de un CXCR3 humano en dicha muestra.

65 32. Método de detección o identificación de un inhibidor de la unión de ligando a una proteína del receptor 3 de quimiocinas CXC (CXCR3) de mamífero que comprende:

a) combinar un agente que va a someterse a prueba, un ligando de dicha proteína CXCR3 de mamífero, en el que dicho ligando se selecciona del grupo que consiste en IP-10 y Mig, y una composición que

ES 2 288 305 T3

comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o una variante funcional de la misma en condiciones adecuadas para la unión del ligando a ella; y

- 5 b) detectar o medir la formación de un complejo entre dicha proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional y dicho ligando, mediante lo cual la inhibición de la formación del complejo por el agente es indicativa de que el agente es un inhibidor,

en el que dicha proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional de la misma se une a una o más quimiocinas seleccionadas del grupo que consiste en IP-10 y Mig, y

- 10 i) tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2; o

- 15 ii) está codificada por un ácido nucleico que hibrida con un segundo ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en el complementario de la SEQ ID NO: 1 y el complementario del marco de lectura abierto de la SEQ ID NO: 1 en condiciones de lavado de alta rigurosidad de 2X SSC, SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante diez minutos seguido de dos lavados en 1X SSC, SDS al 0,1% a 65°C durante treinta minutos y un lavado final en 0,5X SSC, SDS al 0,1% a 65°C durante diez minutos.

20 33. Método según la reivindicación 32, en el que dicha composición que comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o una variante funcional de la misma contiene una proteína CXCR3 humana aislada o recombinante.

25 34. Método según la reivindicación 32, en el que dicha composición que comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o variante funcional de la misma contiene una célula huésped que expresa la proteína CXCR3 humana recombinante.

30 35. Método según la reivindicación 32, en el que dicha composición que comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o una variante funcional de la misma contiene una proteína de fusión aislada o recombinante que comprende proteína CXCR3 humana.

35 36. Método según la reivindicación 32, en el que dicha composición que comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o una variante funcional de la misma contiene una célula huésped que expresa una proteína de fusión recombinante que comprende la proteína CXCR3 humana.

37. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33-36, en el que dicha proteína CXCR3 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

40 38. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33-36, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha proteína CXCR3 humana es una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 1.

45 39. Método según la reivindicación 32, en el que dicho ligando se marca con una etiqueta seleccionada del grupo que consiste en un radioisótopo, marcador de espín, etiqueta de antígeno, etiqueta enzimática, grupo fluorescente o grupo quimioluminiscente.

50 40. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 32-38, en el que dicha proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional de la misma o dicha proteína CXCR3 humana media la señalización celular y/o una respuesta celular, y se monitoriza la formación de un complejo detectando o midiendo una actividad de señalización o respuesta celular de dicha proteína CXCR3 inducida al unirse el ligando.

41. Método según la reivindicación 40, en el que dicha actividad de señalización es un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico $[Ca^{2+}]_i$, y dicha respuesta celular es quimiotaxis.

55 42. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 33-38, en el que dicha proteína CXCR3 humana se une selectivamente al menos a una quimiocina seleccionada del grupo que consiste en IP-10 humana y Mig humana.

43. Método de detección o identificación de un inhibidor de una proteína CXCR3 de mamífero que comprende:

- 60 a) combinar un agente que va a someterse a prueba, una célula huésped que expresa una proteína recombinante que comprende una proteína CXCR3 de mamífero o una variante funcional de la misma, y un ligando de dicha proteína CXCR3 de mamífero seleccionada del grupo que consiste en IP-10 y Mig, en condiciones adecuadas para detectar una respuesta inducida por ligando; y

- 65 b) evaluar la capacidad del agente de pruebas para inhibir dicha respuesta inducida por ligando, mediante lo cual la inhibición de dicha respuesta inducida por ligando por el agente es indicativa de que el agente es un inhibidor,

ES 2 288 305 T3

en el que dicha proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional de la misma se une a una o más quimiocinas seleccionadas del grupo que consiste en IP-10 y Mig, y

- 5 i) tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2; o
- ii) está codificada por un ácido nucleico que hibrida con un segundo ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en el complementario de la SEQ ID NO: 1 y el complementario del marco de lectura abierto de la SEQ ID NO: 1 en condiciones de lavado de alta rigurosidad de SSC 2X, SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante diez minutos seguido de dos lavados en SSC 1X, SDS al 0,1% a 10 65°C durante treinta minutos y un lavado final en SSC 0,5X, SDS al 0,1% a 65°C durante diez minutos.

15 44. Método según la reivindicación 43, en el que dicha célula huésped que expresa una proteína recombinante que comprende una proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional de la misma es una célula huésped que expresa una proteína CXCR3 humana recombinante.

20 45. Método según la reivindicación 43, en el que dicha célula huésped que expresa una proteína recombinante que comprende una proteína CXCR3 de mamífero o una variante funcional de la misma es una célula huésped que expresa una proteína de fusión recombinante que comprende proteína CXCR3 humana.

25 46. Método según la reivindicación 44 o la reivindicación 45, en el que dicha proteína CXCR3 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

25 47. Método según la reivindicación 44 o la reivindicación 45, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha proteína CXCR3 humana es una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 1.

30 48. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 43-47, en el que la respuesta inducida por promotor o por ligando es una actividad de señalización o respuesta celular de dicha proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional de la misma inducida al unirse el ligando.

35 49. Método según la reivindicación 48, en el que dicha actividad de señalización es un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico $[Ca^{2+}]_i$, y dicha respuesta celular es quimiotaxis.

35 50. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 44-47, en el que dicha proteína CXCR3 humana se une selectivamente al menos a una quimiocina seleccionada del grupo que consiste en IP-10 humana y Mig humana.

40 51. Método de detección o identificación de un agente que se une a una proteína del receptor 3 de quimiocinas CXC (CXCR3) de mamífero, que comprende combinar un agente que va a someterse a prueba y una composición que comprende una proteína aislada y/o recombinante que comprende proteína CXCR3 de mamífero o una variante funcional de la misma en condiciones adecuadas para la unión del ligando a ella, y detectar o medir la formación de un complejo entre dicho agente y dicha proteína CXCR3 o variante funcional de la misma, en el que el método es un ensayo de competición en el que se determina la unión en presencia de uno o más ligandos seleccionados del grupo que consiste en IP-10 y Mig,

45 en el que dicha proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional se une a una o más quimiocinas seleccionadas del grupo que consiste en IP-10 y Mig, y

- 50 i) tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2; o
- ii) está codificada por un ácido nucleico que hibrida con un segundo ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en el complementario de la SEQ ID NO: 1 y el complementario del marco de lectura abierto de la SEQ ID NO: 1 en condiciones de lavado de alta rigurosidad de SSC 2X, SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante diez minutos seguido de dos lavados en SSC 1X, SDS al 0,1% a 65°C durante treinta 55 minutos y un lavado final en SSC 0,5X, SDS al 0,1% a 65°C durante diez minutos.

60 52. Método según la reivindicación 51, en el que dicha composición que comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o una variante funcional de la misma contiene una proteína CXCR3 humana aislada y/o recombinante.

53. Método según la reivindicación 51, en el que dicha composición que comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o una variante funcional de la misma contiene una proteína de fusión aislada o recombinante que comprende proteína CXCR3 humana.

65 54. Método según la reivindicación 51, en el que dicha composición que comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o una variante funcional de la misma contiene una célula huésped que expresa una proteína CXCR3 humana recombinante.

ES 2 288 305 T3

55. Método según la reivindicación 51, en el que dicha composición que comprende una proteína CXCR3 de mamífero aislada y/o recombinante o una variante funcional de la misma contiene una célula huésped que expresa una proteína de fusión recombinante que comprende proteína CXCR3 humana.

5 56. Método según la reivindicación 51, en el que dichos uno o más ligandos se marcan con una etiqueta seleccionada del grupo que consiste en un radioisótopo, marcador de espín, etiqueta de antígeno, etiqueta enzimática, grupo fluorescente o grupo quimioluminiscente.

10 57. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 51-56, en el que dicha proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional de la misma media la señalización celular y/o una respuesta celular, y se monitoriza la formación de un complejo detectando o midiendo una actividad de señalización o respuesta celular de dicha proteína CXCR3 inducida al unirse el ligando.

15 58. Método según la reivindicación 57, en el que dicha actividad de señalización es un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico $[Ca^{2+}]_i$, y dicha respuesta celular es quimiotaxis.

19 59. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 51-55, en el que dicha proteína CXCR3 de mamífero o variante funcional de la misma se une selectivamente a al menos una quimiocina seleccionada del grupo que consiste en IP-10 humana y Mig humana.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 288 305 T3

Secuencia de nucleótidos completa de ADNc de IP-10/MigR (MLRA)

CCAAACACAA GCACCAAAGC AGAGGGGCAG GCAGCACACC ACCCAGCAGC CAGAGCACCA	60
GCCCAGCCAT GGTCTTTGAG GTGAGTGACC ACCAAGTGT AAATGACGCC GAGGGTTGCCG	120
CCCTCTGGG AACTTCAGC TCTTCCTATG ACTATGGAGA AACCGAGAGT GACTCTGCT	180
GTACCTCCCC GGCCTGCCCA CAGGACTTCA GCCTGAACCT CGACCGGGCC TTCCCTGCCAG	240
CCCTCTACAG CCTCCCTCTT CTGCTGGGGC TGCTGGGCMA CGGGCGCGTG GCAGCCGTGCG	300
TGCTGAGCCG GCGGACAGCC CTGAGCAGCA CCGAACACCTT CCTGCTCCAC CTAGCTGTAG	360
CAGACACGCT GCTGGTGTG ACACCTGCGC TCTGGGAGT GGACGCTGCC GTCCAGTGGG	420
TCTTGGCTC TGGCCTCTGC AAAGTGGCAG GTGCCCTCTT CAACATCAAC TTCTACGCCAG	480
GAGCCCTCT GCTGGCTCTGC ATCAGCTTTG ACCGCTACCT GAACATAGTT CATGCCACCC	540
AGCTCTACCG CGGGGGGCCCG CGGGCCCGCG TGACCCCTCAC CTGCTGGCT GTCTGGGGCC	600
TCTGCTGCT TTTGGCCCTC CCAGACTTCA TCTTCCTGTC GGCCACCCAC GACGAGCACC	660
TCAACGCCAC CCACTGCCAA TACAATTCC CACAGGTGGG CGGCACGGCT CTGGGGGTGCG	720
TGCAGCTGGT GGCTGGCTTT CTGCTGGCCC TGCTGGTCAT GGCTACTGCG TATGCCACCA	780
TCTGGCGGT GCTGCTGGTT TCCAGGGGCC AGCQGCGCCT CGGGGCCATG CGCTGGTGG	840
TGGTGGTGT GGTGGCTTT GCCCTCTGCT GGACCCCTA TCACCTGGTG GTGCTGGTGG	900
ACATCCTCAT GGACCTGGGC GCTTTGGCCC GCAACTGTGG CGAGAGAAAGC AGGGTAGACG	960
TGGCCAAGTC GGTACACCTCA GGCCTGGCT ACATGCACTG CTGCTCTCAC CGCTGCTCT	1020
ATGCCTTTGT AGGGGTCAAG TTGGGGAGC GGATGTGGAT GCTGCTCTTG CGCCCTGGCT	1080
GCCCCAACCA GAGAGGGCTC CAGAGGCAGC CATGCTCTC CGCCGGGAT TCATCTGGT	1140
CTGAGACCTC AGAGGCCTCC TACTGGGCT TGTGAGGCCG GAAATCCGGGC TCCCCTTGCG	1200
CCCAAGTCT GACTTCCCCG CATTCCAGGC TCTCCCTCC CTCTGGCCGGC TCTGGCTCTC	1260
CCCAATAATCC TCGCTCCCCG GACTCACTGG CAGCCCCAGC ACCACCAAGT CTCCCGGGAA	1320
GCCACCCCTCC CAGCTCTGAG GACTGCACCA TTGGCTGCTCC TTAGCTGCCA AGCCCCATCC	1380
TGCCGCCCGA GGTGGCTGCC TGGAGCCCCA CTGCCCTCT CATTGGAAA CTAAACCTTC	1440
ATCTTCCCCA AGTGGGGGA GTACAGGCA TGGCGTAGAG GGTGCTGCC CATGAAGCCA	1500
CAGCCCAGGC CTCCAGCTCA GCAGTGACTG TGGCCATGGT CCCCAAGACC TCTATATTTG	1560
CTCTTTTATT TTATAGCTA AAACTCTGCT TAAAGCTTTT CAATAAACAA GATGCTCGG	1620
ACCTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT	1670

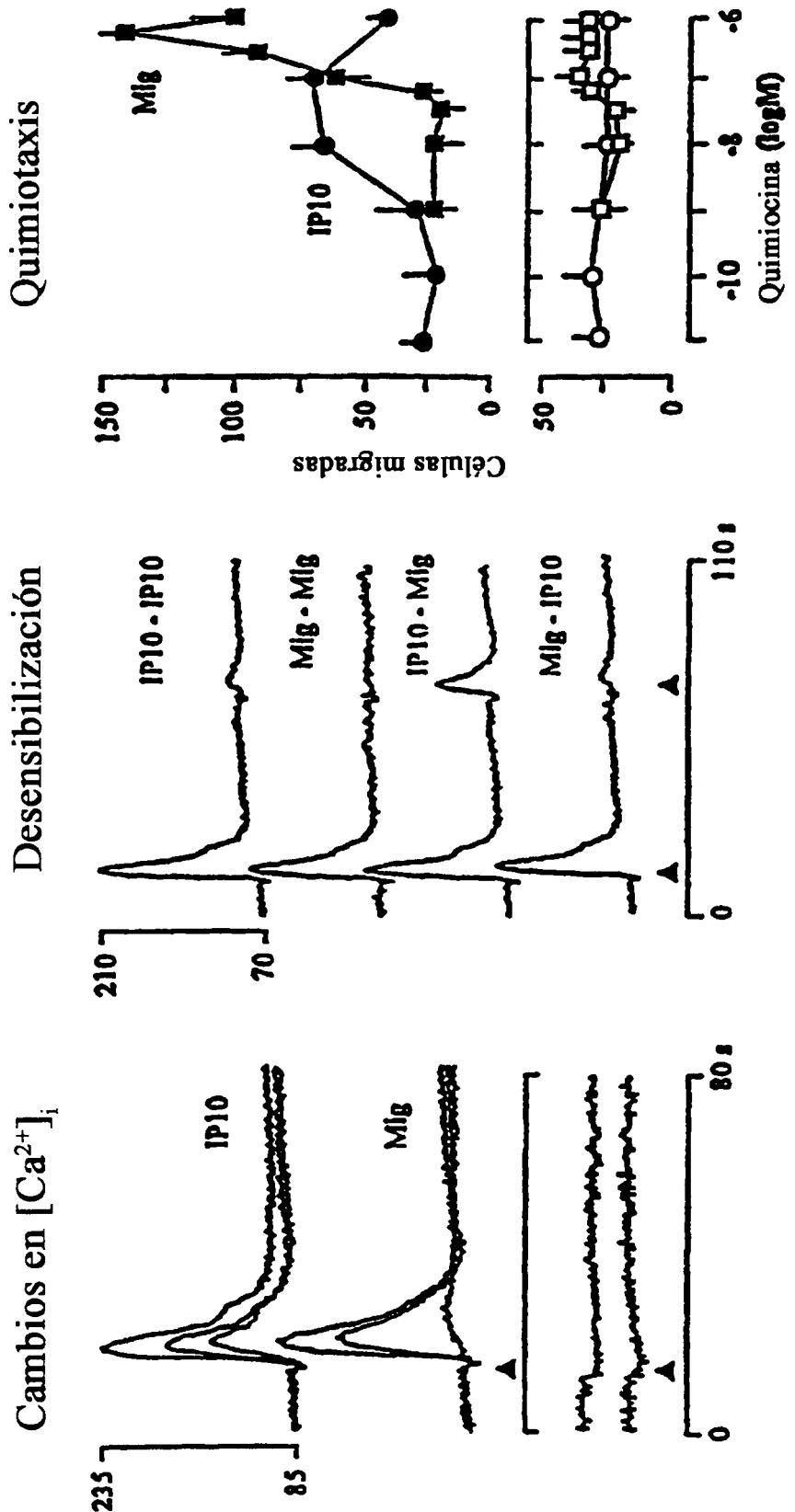
FIGURA 1

ES 2 288 305 T3

IP10/Migr TM1 MVLEVSDHQVLNDAEVAALLENFSSSYDGENESDSCCTSPPCPQDFSLNEDRAFLPALYSLLFLIGLILNGAVAPAVISSLRRTAASSDT 90	TM2 FLLHLAVADTLVLVLTPLMAV-DAAVQWVFQSGGLCKVAGALFNVINFYAGALLACISFDRYNYVHATQLYRGCPPARVITLLCLAVNGLC	TM3 TM4 LLFALPDFLLSAHHDERLNATHCQYNTFPQVG-----RTALLLQLVAGELLPLPLIVMAYCYAHILLAVLLVERGQRRL-RAMRLVVVVVV	TM5 TM6 AFLICWTPYHVYVVLVDILMDLGALARNCRESRVYAKSWSTYGYMCCLNPLLYAFYGVKFRERMMLLLR--LGCPNQRGLLQROPS 262	TM7 IP10/Migr SSRDSSWSETSEASYSGL 368	TM8 IP10/Migr 41
--	---	---	--	--	---

FIGURA 2

ES 2 288 305 T3



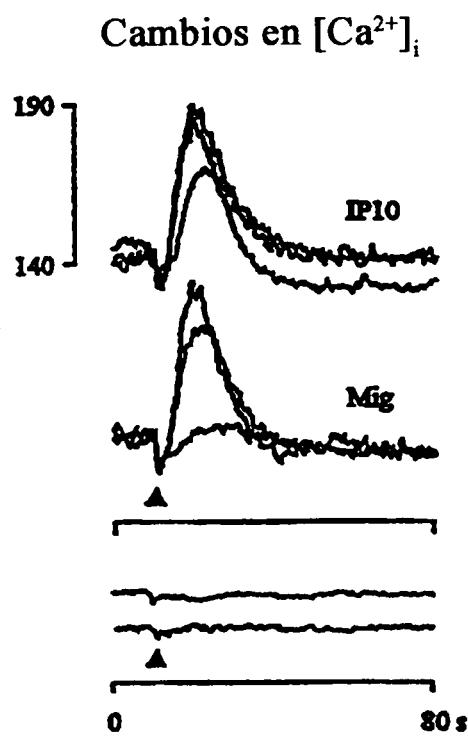


FIGURA 4A

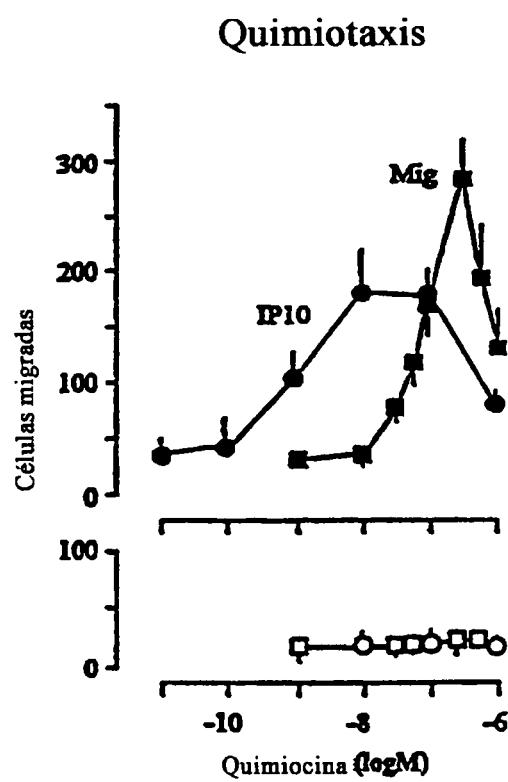


FIGURA 4B

ES 2 288 305 T3

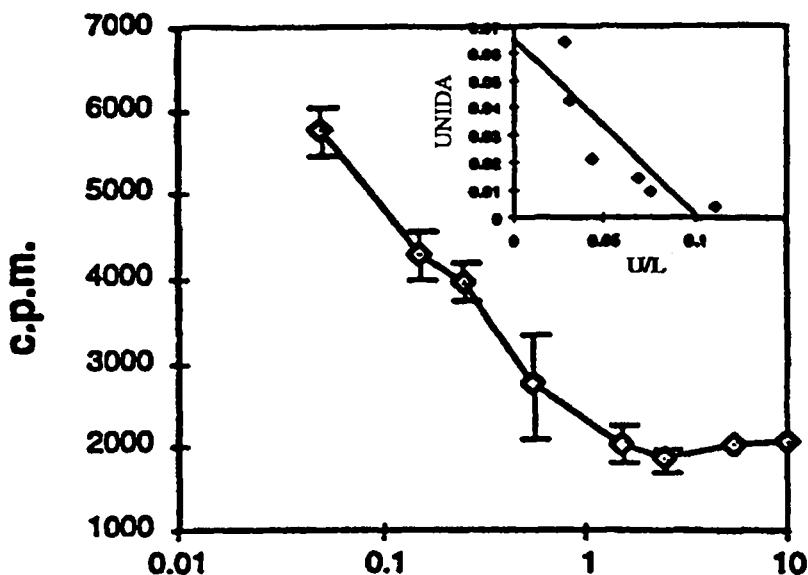


FIGURA 5A

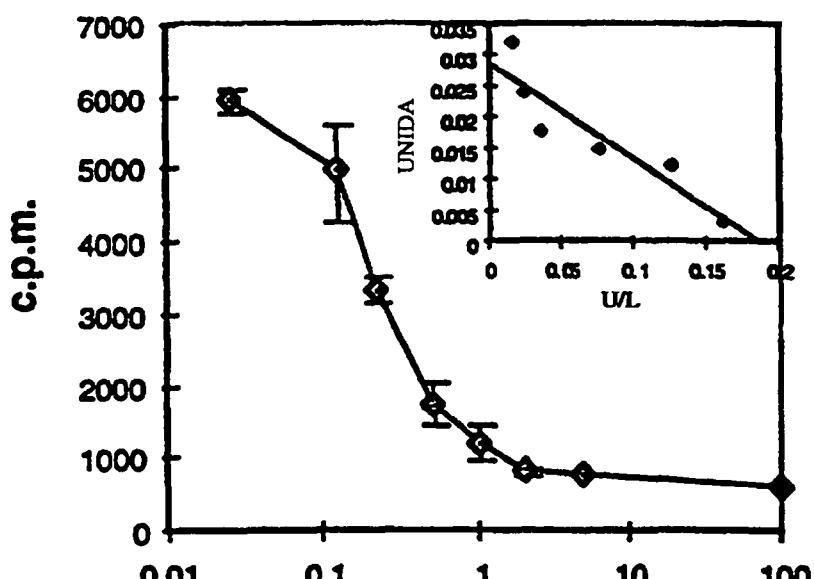


FIGURA 5B

IP-10 fría (nM)

ES 2 288 305 T3

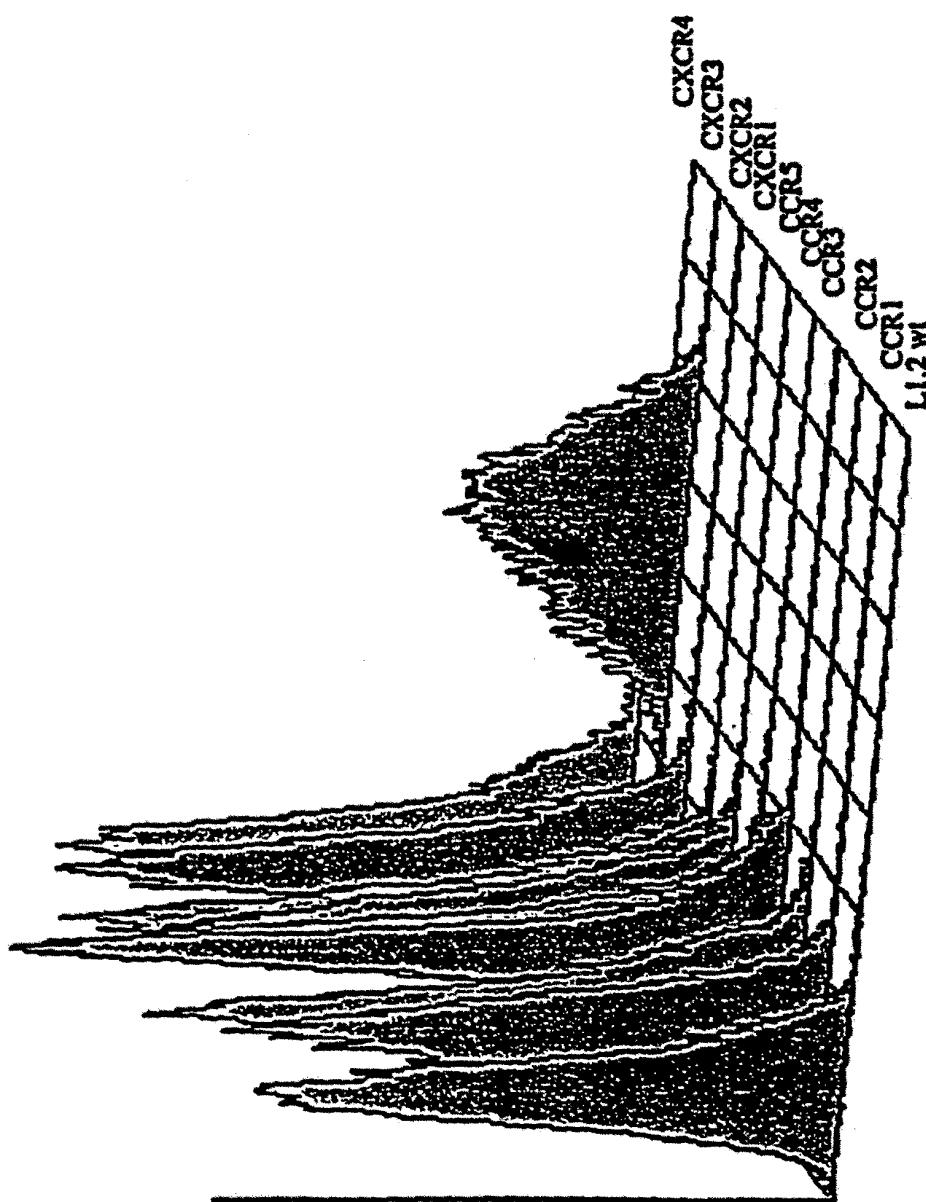


FIGURA 6

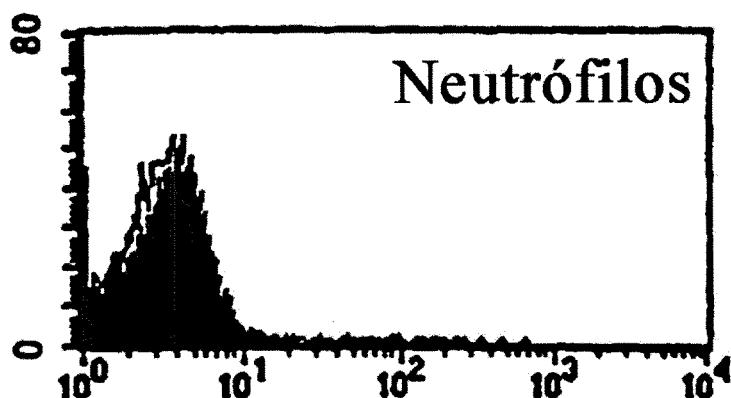


FIGURA 7A

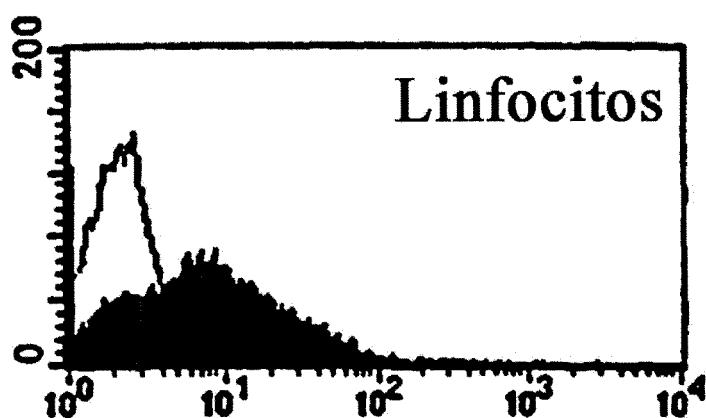


FIGURA 7B

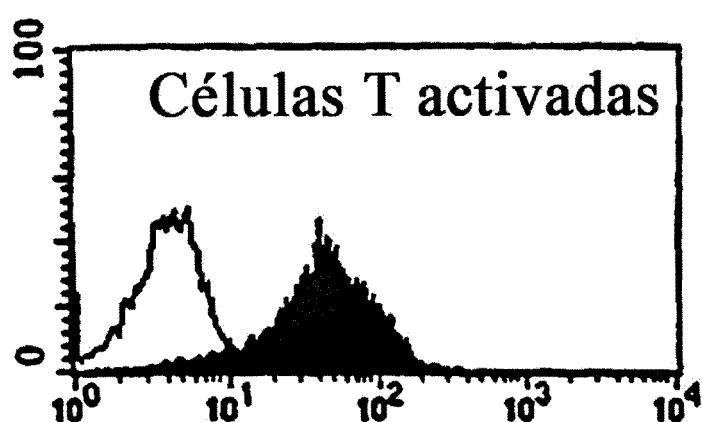


FIGURA 7C

Marcaje con CXCR3 →

ES 2 288 305 T3

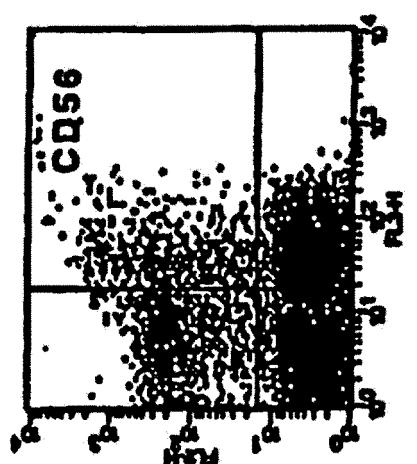


FIGURA 8C

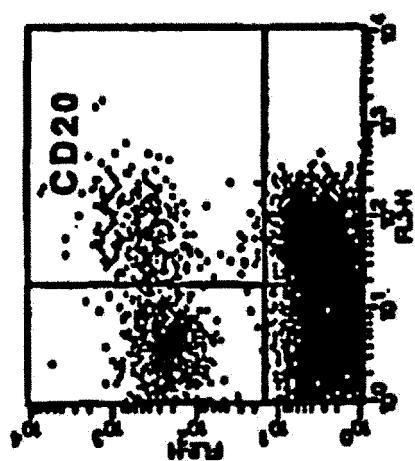


FIGURA 8B

CXCR3

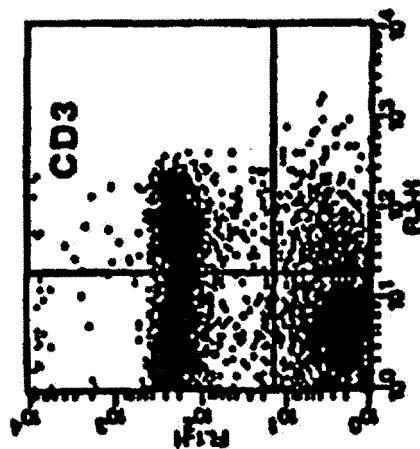


FIGURA 8A

ES 2 288 305 T3

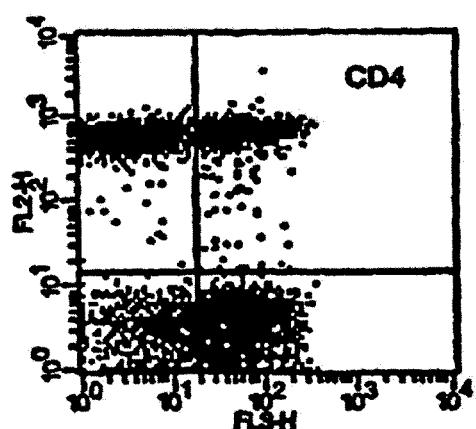


FIGURA 9A

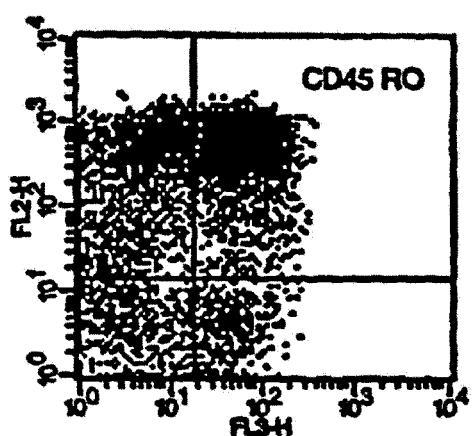
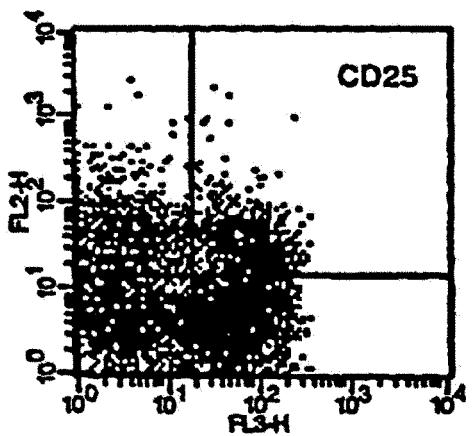


FIGURA 9B



→ CXCR3

FIGURA 9C

ES 2 288 305 T3

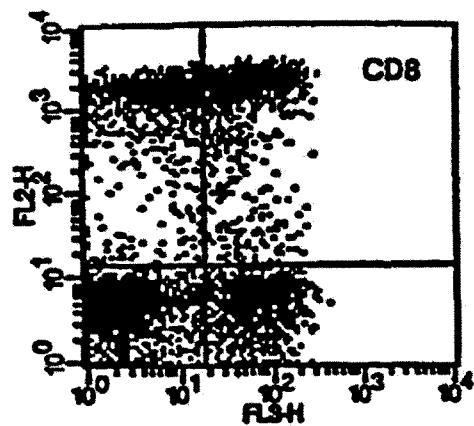


FIGURA 9D

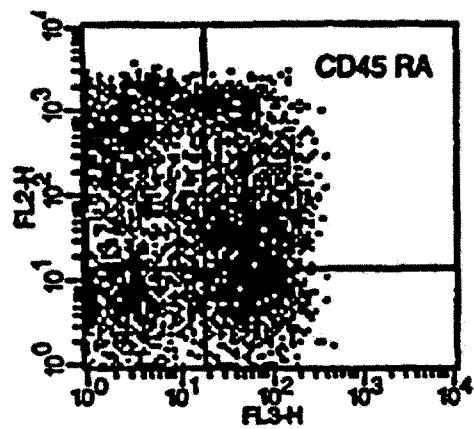
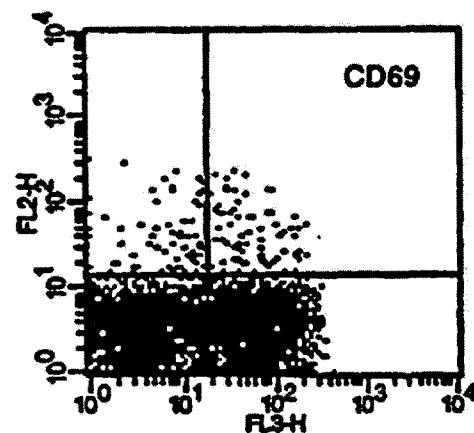


FIGURA 9E



→ CXCR3

FIGURA 9F

ES 2 288 305 T3

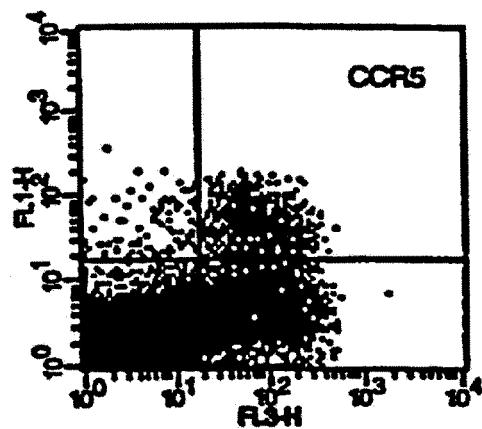


FIGURA 9G

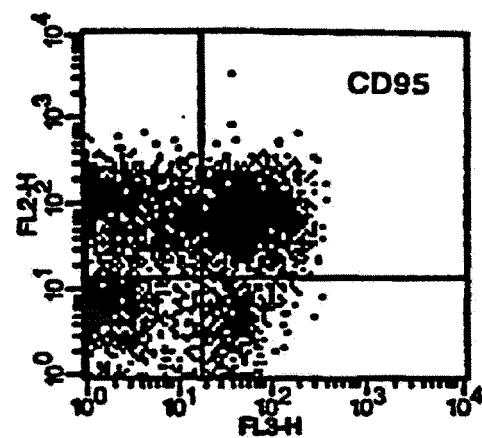
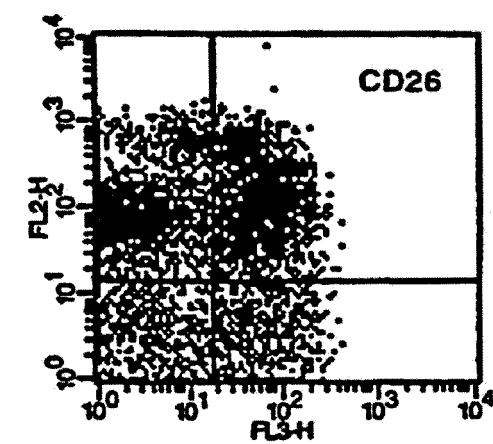


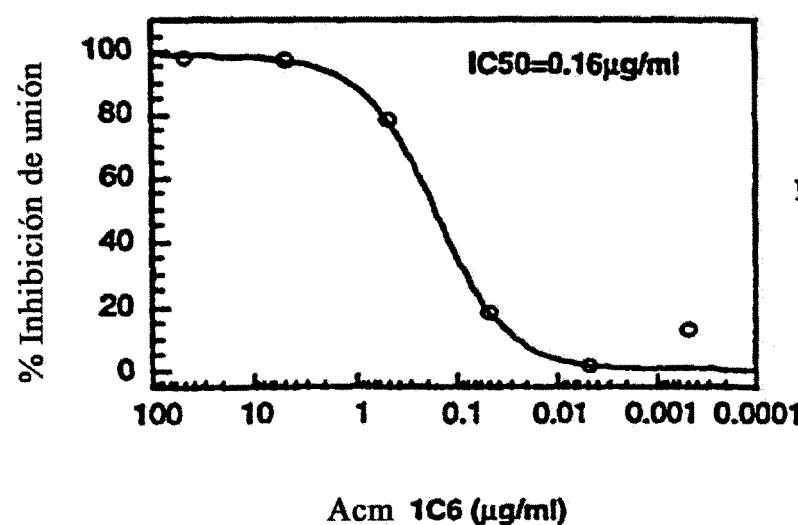
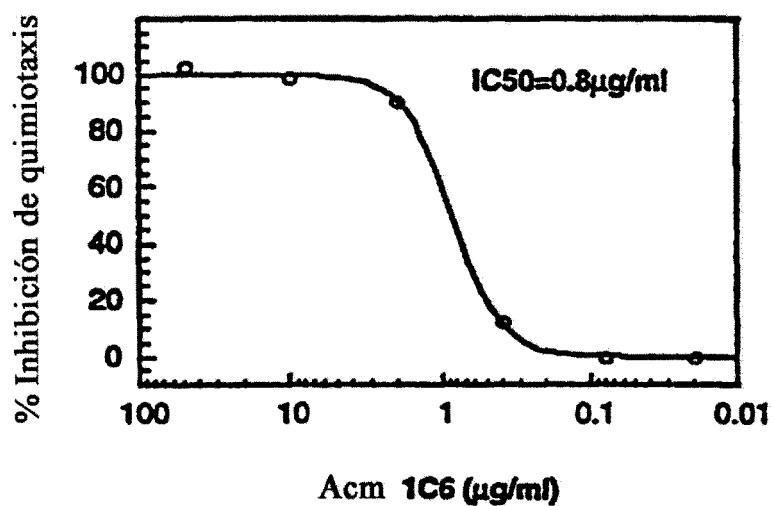
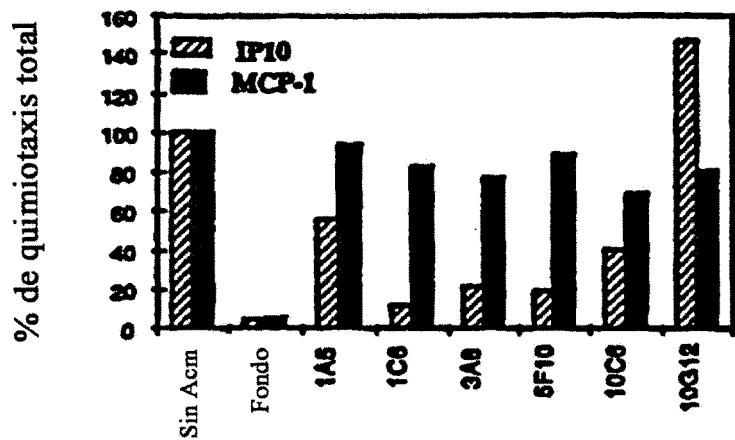
FIGURA 9H



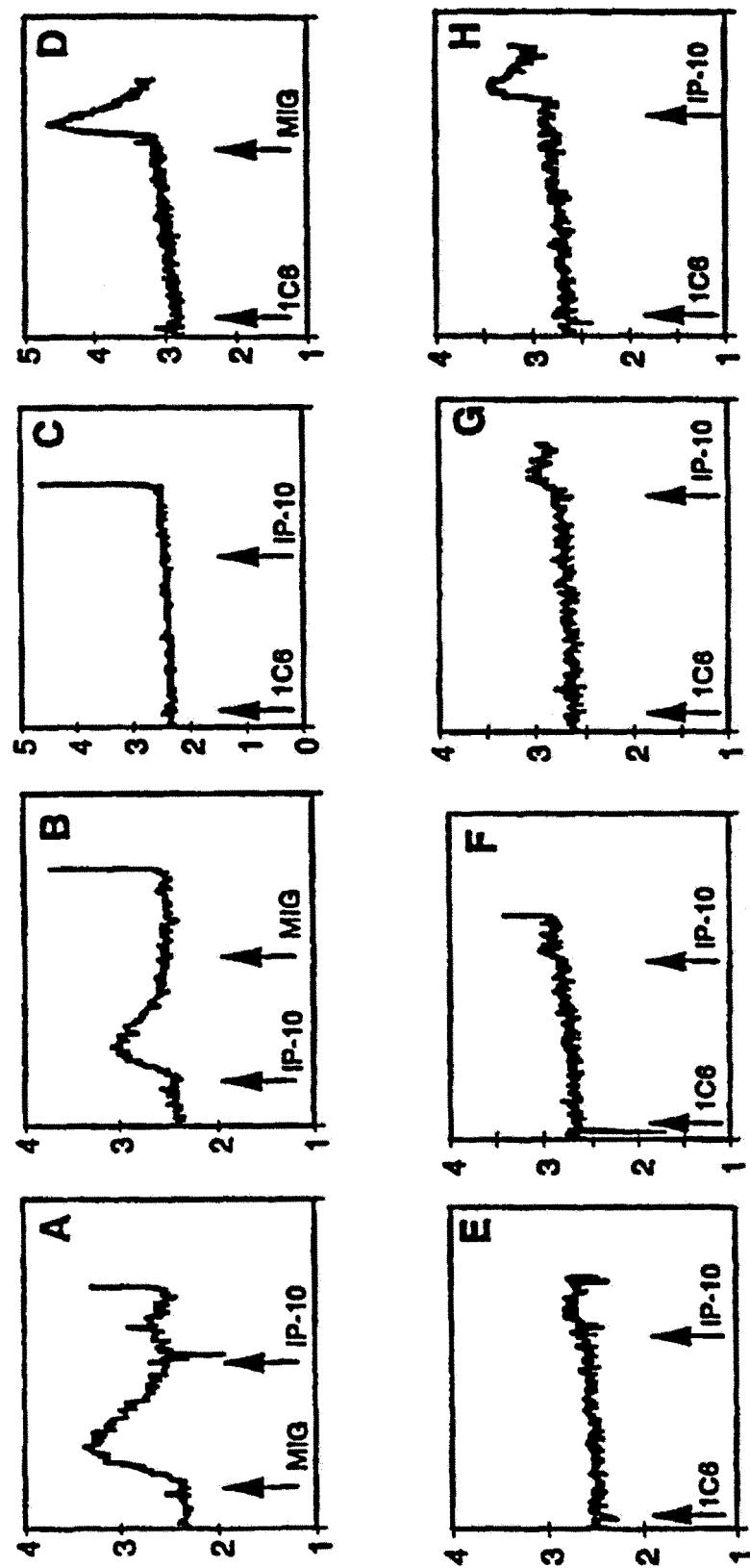
→ CXCR3

FIGURA 9I

ES 2 288 305 T3



ES 2 288 305 T3



FIGURAS 13A - 13H

ES 2 288 305 T3

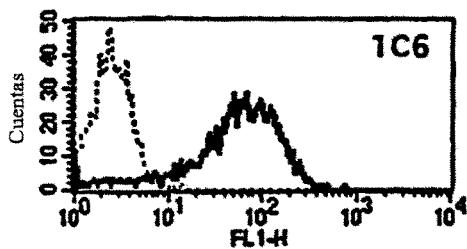


FIGURA 14A

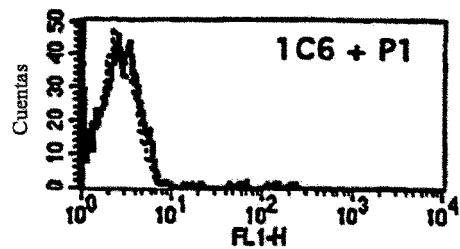


FIGURA 14B

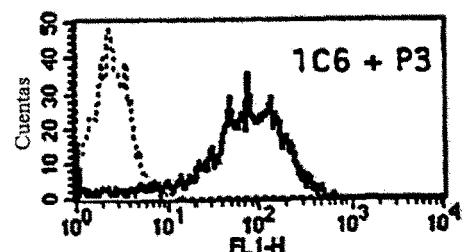


FIGURA 14C

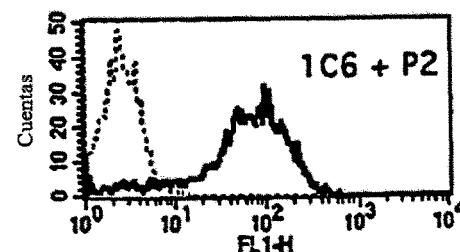


FIGURA 14D

ES 2 288 305 T3

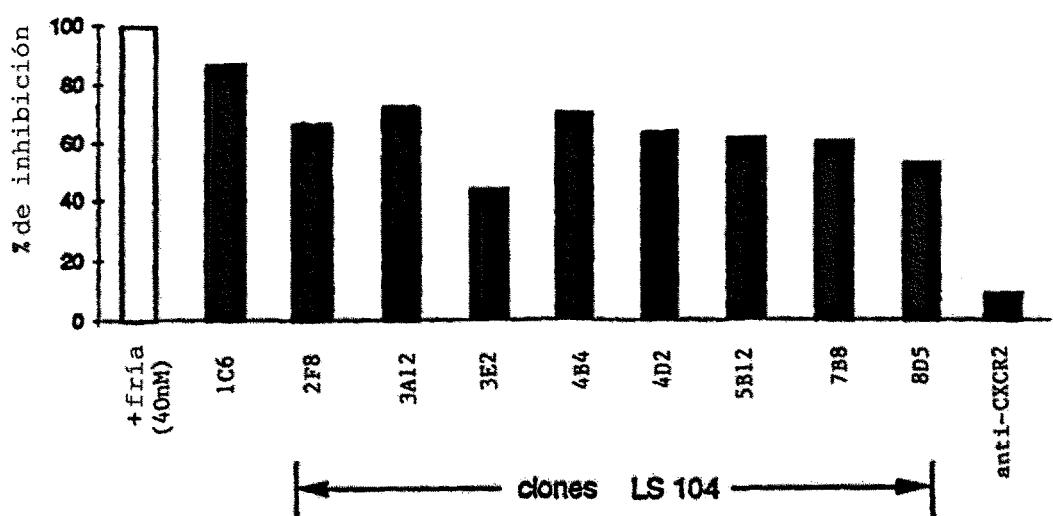


FIGURA 15

ES 2 288 305 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
 (A) NOMBRE: Theodor-Kocher Institute
 (B) CALLE: Freiestrasse 1
10 (C) CIUDAD: Berna
 (D) ESTADO/PROVINCIA:
 (E) PAÍS: Suiza
15 (F) CÓDIGO POSTAL: CH-3012
 (G) TELÉFONO: 41-31-631-4141
 (I) FAX: 41-31-631-3799
- 20 (i) SOLICITANTE:
 (A) NOMBRE: LeukoSite, Inc.
 (B) CALLE: 215 First Street
 (C) CIUDAD: Cambridge
25 (D) ESTADO/PROVINCIA: MA
 (E) PAÍS: EE. UU.
 (F) CÓDIGO POSTAL: 02142
 (G) TELÉFONO: 617-621-9350
30 (I) FAX: 617-621-9349
- 35 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: CXCR3, ANTICUERPOS, ÁCIDOS NUCLEICOS, Y MÉTODOS DE USO
 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
 (A) DESTINATARIO: Hamilton, Brook, Smith & Reynolds, P. C.
40 (B) CALLE: Two Militia Drive
 (C) CIUDAD: Lexington
 (D) ESTADO: MA
 (E) PAÍS: EE. UU.
45 (F) CÓDIGO POSTAL: 02173
- 50 (v) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:
 (A) TIPO DE MEDIO: disquete
 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release # 1.0, Versión # 1.30
- 55 (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:
 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
60 (C) CLASIFICACIÓN:
 (vii) DATOS ANTERIORES DE LA SOLICITUD:
 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/829.839
 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 31-MAR-1997
- 65 (viii) DATOS ANTERIORES DE LA SOLICITUD:

ES 2 288 305 T3

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/709.838

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 10-SEP-1996

5 (viii) INFORMACIÓN DE APODERADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Brook Esq., David E.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 22.592

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: TKI96-01A2 PCT

10 (ix) INFORMACIÓN DE COMUNICACIONES TELEFÓNICAS:

(A) TELÉFONO: (781) 861-6240

(B) FAX: (781) 861-9540

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1670 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

25 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 69..1172

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

	CCAACCACAA GCACCAAAGC AGAGGGGCAG GCAGCACACC ACCCAGCAGC CAGAGCACCA	60
35	GCCCAGCC ATG GTC CTT GAG GTG AGT GAC CAC CAA GTG CTA AAT GAC GCC Met Val Leu Glu Val Ser Asp His Gln Val Leu Asn Asp Ala 1 5 10	110
	GAG GTT GCC GCC CTC CTG GAG AAC TTC AGC TCT TCC TAT GAC TAT GGA Glu Val Ala Ala Leu Leu Glu Asn Phe Ser Ser Ser Tyr Asp Tyr Gly 15 20 25 30	158
40	GAA AAC GAG AGT GAC TCG TGC TGT ACC TCC CCG CCC TGC CCA CAG GAC Glu Asn Glu Ser Asp Ser Cys Cys Thr Ser Pro Pro Cys Pro Gln Asp 35 40 45	206
	TTC AGC CTG AAC TTC GAC CGG GCC TTC CTG CCA GCC CTC TAC AGC CTC Phe Ser Leu Asn Phe Asp Arg Ala Phe Leu Pro Ala Leu Tyr Ser Leu 50 55 60	254
45	CTC TTT CTG CTG GGG CTG CTG GGC AAC GGC GCG GTG GCA GCC GTG CTG Leu Phe Leu Leu Gly Leu Leu Gly Asn Gly Ala Val Ala Ala Val Leu 65 70 75	302
50	CTG AGC CGG CGG ACA GCC CTG AGC AGC ACC GAC ACC TTC CTG CTC CAC Leu Ser Arg Arg Thr Ala Leu Ser Ser Thr Asp Thr Phe Leu Leu His 80 85 90	350
55	CTA GCT GTA GCA GAC ACG CTG CTG GTG CTG ACA CTG CCG CTC TGG GCA Leu Ala Val Ala Asp Thr Leu Leu Val Leu Thr Leu Pro Leu Trp Ala 95 100 105 110	398
60	GTG GAC GCT GCC GTC CAG TGG GTC TTT GGC TCT GGC CTC TGC AAA GTG Val Asp Ala Ala Val Gln Trp Val Phe Gly Ser Gly Leu Cys Lys Val 115 120 125	446
	GCA GGT GCC CTC TTC AAC ATC AAC TTC TAC GCA GGA GCC CTC CTG CTG Ala Gly Ala Leu Phe Asn Ile Asn Phe Tyr Ala Gly Ala Leu Leu Leu 130 135 140	494

ES 2 288 305 T3

	GCC TGC ATC AGC TTT GAC CGC TAC CTG AAC ATA GTT CAT GCC ACC CAG Ala Cys Ile Ser Phe Asp Arg Tyr Leu Asn Ile Val His Ala Thr Gln 145 150 155	542
5	CTC TAC CGC CGG GGG CCC CCG GCC CGC GTG ACC CTC ACC TGC CTG GCT Leu Tyr Arg Arg Gly Pro Pro Ala Arg Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala 160 165 170	590
10	GTC TGG GGG CTC TGC CTG CTT TTC GCC CTC CCA GAC TTC ATC TTC CTG Val Trp Gly Leu Cys Leu Leu Phe Ala Leu Pro Asp Phe Ile Phe Leu 175 180 185 190	638
15	TCG GCC CAC CAC GAC GAG CGC CTC AAC GCC ACC CAC TGC CAA TAC AAC Ser Ala His His Asp Glu Arg Leu Asn Ala Thr His Cys Gln Tyr Asn 195 200 205	686
20	TTC CCA CAG GTG GGC CGC ACG GCT CTG CGG GTG CTG CAG CTG GTG GCT Phe Pro Gln Val Gly Arg Thr Ala Leu Arg Val Leu Gln Leu Val Ala 210 215 220	734
25	GGC TTT CTG CTG CCC CTG CTG GTC ATG GCC TAC TGC TAT GCC CAC ATC Gly Phe Leu Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Tyr Cys Tyr Ala His Ile 225 230 235	782
30	CTG GCC GTG CTG CTG GTT TCC AGG GGC CAG CGG CGC CTG CGG GCC ATG Leu Ala Val Leu Leu Val Ser Arg Gly Gln Arg Leu Arg Ala Met 240 245 250	830
35	CGG CTG GTG GTG GTC GTG GTG GCC TTT GCC CTC TGC TGG ACC CCC Arg Leu Val Val Val Val Ala Phe Ala Leu Cys Trp Thr Pro 255 260 265 270	878
40	TAT CAC CTG GTG GTG CTG GTG GAC ATC CTC ATG GAC CTG GCC GCT TTG Tyr His Leu Val Val Leu Val Asp Ile Leu Met Asp Leu Gly Ala Leu 275 280 285	926
45	GCC CGC AAC TGT GGC CGA GAA AGC AGG GTA GAC GTG GCC AAG TCG GTC Ala Arg Asn Cys Gly Arg Glu Ser Arg Val Asp Val Ala Lys Ser Val 290 295 300	974
50	ACC TCA GGC CTG GGC TAC ATG CAC TGC TGC CTC AAC CCG CTG CTC TAT Thr Ser Gly Leu Gly Tyr Met His Cys Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr 305 310 315	1022
55	GCC TTT GTA GGG GTC AAG TTC CGG GAG CGG ATG TGG ATG CTG CTC TTG Ala Phe Val Gly Val Lys Phe Arg Glu Arg Met Trp Met Leu Leu Leu 320 325 330	1070
60	CGC CTG GGC TGC CCC AAC CAG AGA GGG CTC CAG AGG CAG CCA TCG TCT Arg Leu Gly Cys Pro Asn Gln Arg Gly Leu Gln Arg Gln Pro Ser Ser 335 340 345 350	1118
65	TCC CGC CGG GAT TCA TCC TGG TCT GAG ACC TCA GAG GCC TCC TAC TCG Ser Arg Arg Asp Ser Ser Trp Ser Glu Thr Ser Glu Ala Ser Tyr Ser 355 360 365	1166
	GGC TTG TGAGGCCGGA ATCCGGGCTC CCCTTCGCC CACAGTCTGA CTTCCCCGCA Gly Leu	1222
	TTCCAGGCTC CTCCCTCCCT CTGCCGGCTC TGGCTCTCCC CAATATCCTC GCTCCCCGGGA	1282
	CTCACTGGCA GCCCCAGCAC CACCAAGGTCT CCCGGGAAGC CACCCCTCCCA GCTCTGAGGA	1342
	CTGCACCATT GCTGCTCCTT AGCTGCCAAG CCCCCATCCTG CGGCCCGAGG TGGCTGCCCTG	1402
	GAGCCCCACT GCCCTTCTCA TTGGAAAAT AAAACTTCAT CTTCCCCAAG TGGGGGGAGT	1462
	ACAAGGCATG GCGTAGAGGG TGCTGCCCCA TGAAGGCCACA GCCCAGGGCT CCAGCTCAGC	1522
	AGTGACTGTG GCCATGGTCC CCAAGACCTC TATATTTGCT CTTTTATTTT TATGTCTAAA	1582
	ATCCTGCTTA AAACTTTCA ATAAACAAGA TCGTCAGGAC CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT	1642
	TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTT	1670

ES 2 288 305 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 368 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Val Leu Glu Val Ser Asp His Gln Val Leu Asn Asp Ala Glu Val
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Leu Glu Asn Phe Ser Ser Ser Tyr Asp Tyr Gly Glu Asn
20 25 30

Glu Ser Asp Ser Cys Cys Thr Ser Pro Pro Cys Pro Gln Asp Phe Ser
35 40 45

Leu Asn Phe Asp Arg Ala Phe Leu Pro Ala Leu Tyr Ser Leu Leu Phe
50 55 60

Leu Leu Gly Leu Leu Gly Asn Gly Ala Val Ala Ala Val Leu Leu Ser
65 70 75 80

Arg Arg Thr Ala Leu Ser Ser Thr Asp Thr Phe Leu Leu His Leu Ala
85 90 95

Val Ala Asp Thr Leu Leu Val Leu Thr Leu Pro Leu Trp Ala Val Asp
100 105 110

Ala Ala Val Gln Trp Val Phe Gly Ser Gly Leu Cys Lys Val Ala Gly
115 120 125

Ala Leu Phe Asn Ile Asn Phe Tyr Ala Gly Ala Leu Leu Leu Ala Cys
130 135 140

Ile Ser Phe Asp Arg Tyr Leu Asn Ile Val His Ala Thr Gln Leu Tyr
145 150 155 160

Arg Arg Gly Pro Pro Ala Arg Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Val Trp
155 170 175

50

55

60

ES 2 288 305 T3

Gly Leu Cys Leu Leu Phe Ala Leu Pro Asp Phe Ile Phe Leu Ser Ala
180 185 190

5 His His Asp Glu Arg Leu Asn Ala Thr His Cys Gln Tyr Asn Phe Pro
195 200 205

Gln Val Gly Arg Thr Ala Leu Arg Val Leu Gln Leu Val Ala Gly Phe
210 215 220

10 Leu Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Tyr Cys Tyr Ala His Ile Leu Ala
225 230 235 240

Val Leu Leu Val Ser Arg Gly Gln Arg Arg Leu Arg Ala Met Arg Leu
245 250 255

15 Val Val Val Val Val Ala Phe Ala Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His
260 265 270

Leu Val Val Leu Val Asp Ile Leu Met Asp Leu Gly Ala Leu Ala Arg
275 280 285

20 Asn Cys Gly Arg Glu Ser Arg Val Asp Val Ala Lys Ser Val Thr Ser
290 295 300

Gly Leu Gly Tyr Met His Cys Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Ala Phe
305 310 315 320

Val Gly Val Lys Phe Arg Glu Arg Met Trp Met Leu Leu Leu Arg Leu
325 330 335

30 Gly Cys Pro Asn Gln Arg Gly Leu Gln Arg Gln Pro Ser Ser Ser Arg
340 345 350

Arg Asp Ser Ser Trp Ser Glu Thr Ser Glu Ala Ser Tyr Ser Gly Leu
355 360 365

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 28 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: base modificada
(B) POSICIÓN: 11
(D) OTRA INFORMACIÓN: /mod_base= i

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: base modificada
(B) POSICIÓN: 12
(D) OTRA INFORMACIÓN: /mod_base= i

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: base modificada
(B) POSICIÓN: 23
(D) OTRA INFORMACIÓN: /mod_base= i

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: base modificada

ES 2 288 305 T3

- (B) POSICIÓN: 26
(D) OTRA INFORMACIÓN: /mod_base= i
5 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

GGGCTGCAGC NNTKKCMGAC MTNCTNYT

28

- 10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

- 20 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: base modificada
(B) POSICIÓN: 10
(D) OTRA INFORMACIÓN: /mod_base= i

- 25 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: base modificada
(B) POSICIÓN: 16
(D) OTRA INFORMACIÓN: /mod_base= i

- 30 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: base modificada
(B) POSICIÓN: 18
(D) OTRA INFORMACIÓN: /mod_base= i

- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

40 GGGCTAGAN GGGTTNANRC ARCWRYG

27

45

50

55

60

65