

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 274 514**

51 Int. Cl.:

C12N 15/19 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.1994 E 94926324 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **26.02.2014 EP 0719331**

54 Título: **Eotaxina = citocina quimiotáctica de eosinófilos**

30 Prioridad:

14.09.1993 GB 9318984

29.04.1994 GB 9408602

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:

09.06.2014

73 Titular/es:

**IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (100.0%)
LEVEL 12 ELECTRICAL AND ELECTRONIC
ENGINEERING BUILDING IMPERIAL COLLEGE
LONDON SW7 2AZ, GB**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, TIMOTHY JOHN;
JOSE, PETER JOHN;
GRIFFITHS-JOHNSON, DAVID A. y
HSUAN, JOHN JUSTIN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 274 514 T5

DESCRIPCIÓN

Eotaxina = citocina quimiotáctica de eosinófilos.

5 La presente invención se refiere a una citocina quimiotáctica.

La acumulación de leucocitos eosinófilos es una propiedad característica de las reacciones alérgicas mediadas por IgE tales como el asma alérgica, la rinitis y el eccema. La acumulación eosinófila también se produce en el asma alérgica. La broncoconstricción inmediata en respuesta a un estímulo de provocación en el asmático implica la activación de los mastocitos y la liberación de mediadores constrictores. Esto va acompañado después de varias horas en algunos individuos por una respuesta broncoconstrictora tardía asociada a una entrada masiva de eosinófilos (1). La provocación repetida produce la inflamación crónica en las vías respiratorias y una hipersensibilidad notable a los mediadores constrictores. La magnitud tanto de la respuesta tardía como de la hipersensibilidad crónica se correlaciona con el número de eosinófilos presentes en los pulmones (2, 3).

15 La presente invención proporciona una proteína quimioatrayente susceptible de atraer a los eosinófilos y de provocar la acumulación eosinófila *in vitro* e *in vivo*. La proteína quimioatrayente de la presente invención se denomina "eotaxina".

20 Con mayor detalle, según un aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína quimioatrayente aislada capaz de atraer los eosinófilos y de producir acumulación eosinófila *in vitro* e *in vivo* y que no presenta sustancialmente ningún efecto atractivo para los neutrófilos *in vivo*, que consiste en una secuencia de aminoácidos o que comprende la misma tal como se expone en la SEC. ID n°: 1, o un fragmento de dicha proteína quimioatrayente que conserva sus actividades biológicas.

25 Las eotaxinas son proteínas del ramal C-C de la superfamilia del factor 4 de plaquetas de citocinas quimiotácticas. Dentro del ramal C-C de la superfamilia del factor 4 de plaquetas de las citocinas quimiotácticas o quimiocinas, algunos miembros tienen la propiedad de atraer los eosinófilos *in vitro* y algunos pueden producir la acumulación eosinófila *in vivo*. Por ejemplo, las quimiocinas RANTES y MIP-1 α atraen a los eosinófilos *in vitro* mientras que MCP-1 y MIP-1 β no. ("RANTES" significa Reguladas en la Activación en linfocitos T Normales Expresados y Segregados, "MIP" significa Proteína Inflamatoria del Macrófago y "MCP" significa Proteína Quimioatrayente de Monocitos)

30 Las citocinas naturales en la superfamilia del factor 4 de plaquetas de las citocinas quimiotácticas pueden presentar variaciones interespecies notables en la longitud de la molécula de la proteína, en la secuencia de aminoácidos de la proteína, y en las modificaciones del carbohidrato de la proteína, mientras que se conservan las mismas propiedades funcionales características. Similares variaciones en la estructura pueden producirse en las citocinas obtenidas a partir de diferentes individuos dentro de la misma especie. Muchas quimiocinas dentro del ramal C-C de la superfamilia del factor 4 de plaquetas presentan promiscuidad de la fijación del receptor, y la capacidad de las diferentes quimiocinas para fijarse al mismo receptor no depende necesariamente del alto grado de homología a nivel de aminoácidos. Por consiguiente, tanto las variaciones interespecie como intraespecie en la longitud de las proteínas, la secuencia de aminoácidos y en las modificaciones del carbohidrato son de esperar generalmente en las eotaxinas.

35 La aptitud para atraer eosinófilos y para producir la acumulación eosinófila y/o la activación *in vitro* e *in vivo* es una propiedad característica de las eotaxinas. Además, las eotaxinas generalmente no presentan sustancialmente ningún efecto atractivo para los neutrófilos *in vivo*. El efecto quimioatrayente eosinófilo puede ser un efecto entre las especies, por ejemplo, la eotaxina del cobaya parece ser potente para producir quimiotaxia de los eosinófilos humanos *in vitro*.

40 Aunque no forme parte de la invención, puede obtenerse una eotaxina a partir de un fluido corporal apropiado, por ejemplo, del fluido del lavado broncoalveolar obtenido de un ser humano o de un individuo no humano, particularmente un individuo alérgico después de una prueba de provocación con alérgeno, ya sea provocada experimentalmente o contraída de forma natural. Otras fuentes de eotaxinas son, por ejemplo, los fluidos del exudado inflamatorio y los cultivos *in vitro* de macrófagos, linfocitos, neutrófilos, mastocitos, células epiteliales de las vías respiratorias, células de tejido conectivo, células endoteliales vasculares y los propios eosinófilos.

45 Por ejemplo, una eotaxina puede obtenerse a partir de un cobaya sensibilizado tras la prueba de provocación con alérgeno. Los modelos de cobaya son útiles ya que comparten muchas propiedades comunes con la respuesta asmática en el hombre. La eotaxina que puede obtenerse del fluido del lavado broncoalveolar de un cobaya sensibilizado mediante purificación sucesiva por HPLC presenta generalmente un peso molecular comprendido en el intervalo entre 6 y 16 kDa. (Como se indicó anteriormente, las variaciones del peso molecular intraespecie de este orden de magnitud se observan en los miembros de la superfamilia del factor 4 de plaquetas).

50 Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para la producción de una proteína quimioatrayente de la presente invención, que comprende el cultivo *in vitro* de macrófagos, linfocitos, neutrófilos, mastocitos, células epiteliales de las vías respiratorias, células de tejido conectivo, y el aislamiento de las células o

del fluido del cultivo celular de una fracción que demuestra la actividad quimiotáctica eosinófila *in vitro* e *in vivo* y que no presenta sustancialmente ningún efecto atractivo para los neutrófilos *in vivo*.

5 La secuencia de aminoácidos de la eotaxina del cobaya esta expuesta en la SEC. ID nº: 1, SEC. ID nº: 2 y en las Figuras 7 y 8 de los dibujos adjuntos. Otras eotaxinas de cobaya generalmente tendrán por lo menos el 40 o el 50% de homología total con el listado de secuencias presentado en la SEC. ID nº: 1 (Figura 7) a nivel de aminoácidos. La homología puede ser por lo menos del 60%, por ejemplo por lo menos del 70%, por ejemplo por lo menos del 80% con la secuencia expuesta en la SEC. ID nº: 1 y en la Figura 7.

10 El porcentaje de homología en el presente caso se calcula sobre la base de los aminoácidos que son idénticos en las posiciones correspondientes en las dos secuencias en investigación. Las sustituciones conservadoras no se tienen en cuenta. En el cálculo del porcentaje de homología de una supuesta molécula de eotaxina en investigación con la secuencia mostrada en la SEC. ID nº: 1 (Figura 7) o con la SEC. ID nº: 2 (Figura 8) si la molécula en investigación presenta una longitud diferente de la eotaxina expuesta en la SEC. ID nº: 1 o en la SEC. ID nº: 2 (Figura 7 o Figura 15 8), entonces el cálculo se basa en los aminoácidos en la parte de la molécula en investigación que se solapan con la secuencia mostrada en la SEC. ID nº: 1 (Figura 7) o en la SEC. ID nº: 2 (Figura 8). Los paquetes del programa informático para la alineación de las secuencias de aminoácidos y el cálculo de la homología están disponibles en el mercado, por ejemplo, el programa "Bestfit" disponible en Genetics Computer Group Sequence Analysis Software, Madison, Wisconsin, U.S.A.

20 A menos que se especifique de otro modo, los valores específicos del porcentaje de homología entre la eotaxina y otras citocinas quimiotácticas dadas en la presente memoria se han calculado basándose en la eotaxina expuesta en la SEC. ID nº: 1 (Figura 7).

25 Como se indicó anteriormente, las eotaxinas que pueden obtenerse de otras especies aparte de los cobayas, por ejemplo de seres humanos, presentarán diferencias interespecie del tipo demostrado por otros miembros del ramal C-C de la superfamilia del factor 4 de plaquetas de quimocinas, por ejemplo, diferencias en la longitud de la proteína, secuencia de aminoácidos y modificaciones de carbohidrato. Pueden, por ejemplo, existir variaciones en los restos de los terminales en C y/o N. Por ejemplo, es de esperar que el peso molecular de una eotaxina 30 procedente de una especie distinta de cobaya esté comprendida en el intervalo entre 6 kDa y 16 kDa, pero en algunos casos una eotaxina puede tener un peso molecular inferior a 6 kDa o superior a 16 kDa.

35 Asimismo, es de esperar que en general una eotaxina de otra especie distinta del cobaya, presente por lo menos 40% de homología total con la secuencia expuesta en la SEC. ID nº: 1 y en la Figura 7. La homología puede ser de por lo menos 50%, por ejemplo de por lo menos 60%, por ejemplo de por lo menos 70%, por ejemplo de por lo menos 80% con la secuencia expuesta en la SEC. ID nº: 1 y en la Figura 7. Sin embargo, pueden existir eotaxinas procedentes de otras especies aparte de los cobayas que presenten menos de 40% de homología con la SEC. ID nº: 1 (Figura 7).

40 Las eotaxinas pueden ser identificadas por una cualquiera o más de las características expuestas anteriormente, en particular por su capacidad para atraer y/o activar eosinófilos *in vitro* y dar lugar a su acumulación y/o activación *in vivo*. Una característica que ayuda a la identificación de una molécula como una eotaxina es la falta de efecto atractivo sobre los eosinófilos.

45 Se proporciona un método de determinación de la capacidad de una sustancia para producir la acumulación eosinófila *in vivo*, es decir, un método para la experimentación de supuestas eotaxinas, que comprende la administración de la sustancia, generalmente por vía intradérmica, a un animal de ensayo tratado previamente con eosinófilos marcados, por ejemplo marcados con ¹¹¹In y posteriormente la determinación del número de eosinófilos marcados en un punto de la piel.

50 Un método *in vitro* que puede utilizarse para ensayar la susceptibilidad de una supuesta eotaxina para atraer y/o activar eosinófilos *in vitro* es la susceptibilidad de la sustancia para aumentar las concentraciones en el eosinófilo del calcio intracelular. Otros métodos generales de determinación de la actividad quimiotáctica *in vitro* pueden utilizarse para ensayar las supuestas eotaxinas *in vitro*.

55 La confirmación de que un eosinófilo táctico es una eotaxina puede hacerse también considerando la homología de secuencia de esta proteína con la secuencia expuesta en la SEC. ID nº: 1 (Figura 7) y/o con la secuencia expuesta en SEC. ID nº: 2 (Figura 8) y/o considerando la relación estructural entre la proteína y la eotaxina de cobaya.

60 Como se mencionó anteriormente, tanto RANTES como MIP-1 α son activadores eosinófilos. La eotaxina presenta similitudes funcionales pero baja homología estructural con RANTES y MIP-1 α (31% de homología con MIP-1 α a nivel de aminoácido calculada basándose en la SEC. ID nº: 1 (Figura 7); 32% de homología cuando se calcula sobre la base de las secuencias de solapamiento y 26% de homología con RANTES a nivel de aminoácido calculada sobre la base de la SEC. ID nº: 1 (Figura 7); 27% de homología cuando se calcula sobre la base de las secuencias de solapamiento). Una eotaxina puede distinguirse de RANTES y de MIP-1 α no sólo por el grado de homología sino 65 también por diferencias generales en la secuencia y en la estructura.

Además de la molécula completa de eotaxina, la presente invención proporciona asimismo moléculas que comprenden menos que la secuencia completa de eotaxina. Dichas moléculas (denominadas "fragmentos" en la presente memoria) pueden ser polipéptidos o péptidos. Para su utilización como sustituto de eotaxina, un fragmento debería conservar una o más de las actividades biológicas de la molécula precursora.

Los eosinófilos contienen un arsenal de productos químicos necesarios para destruir los parásitos. Estos productos químicos han estado implicados en el daño al epitelio de las vías respiratorias que produce asma y puede relacionarse con los cambios observados en la función de las vías respiratorias (26, 27). Para los estudios de los inventores se sugiere que las eotaxinas deberían considerarse como importantes mediadores de la acumulación eosinófila *in vivo*. Los propios macrófagos, linfocitos, neutrófilos, mastocitos, células epiteliales de las vías respiratorias, células del tejido conectivo, células endoteliales vasculares y eosinófilos son asimismo candidatos como fuente de actividad quimiotáctica de eosinófilos generada en los pulmones. Las plaquetas pueden desempeñar también una función ya que se ha demostrado que pueden liberar quimiocinas del C-C (22). Además, una deposición de plaquetas inicial puede estar implicada en la acumulación posterior de eosinófilos *in vivo* (28, 29) y existen pruebas de que el factor activador de plaquetas produce la síntesis de un eosinófilo quimioatrayente no identificado *in vivo* (30). A este respecto, es de interés que el factor de crecimiento derivado de plaquetas pueda provocar la expresión génica de las quimiocinas del C-C en fibroblastos (31). Además, las quimiocinas del C-C han estado implicadas en la cicatrización de la herida (18). Esto puede ser importante en la fibrosis subepitelial de la membrana basal que es una característica destacada del pulmón asmático. Por lo tanto, las eotaxinas pueden estar implicadas tanto en la acumulación de eosinófilos como en los cambios estructurales crónicos en los pulmones.

Las eotaxinas pueden desempeñar una función importante en el asma y en otras enfermedades con un componente inflamatorio en las que la acumulación de eosinófilos y/o la activación es una característica destacada, por ejemplo, rinitis y eccema, especialmente el eccema alérgico. Por consiguiente, los agentes que inhiben o si no ocultan la producción, liberación o acción de eotaxinas tienen potencial como agentes terapéuticos selectivos. Dichos agentes y su utilización terapéutica se describen en la presente memoria.

Dichos agentes incluyen los inhibidores que afectan la interacción de una eotaxina con los receptores de eotaxina, por ejemplo, uniéndose a una eotaxina o a un receptor de eotaxina. Un ejemplo de dicho inhibidor son los propios receptores que, en la administración, pueden unirse a una eotaxina e impedir su interacción con los receptores naturales. Dichos receptores inhibidores pueden ser solubles o insolubles. Los receptores que no están implicados en la activación en la activación celular pueden unirse a células o producirse en ellas. Dichos receptores pueden utilizarse también para eliminar la eotaxina endógena.

Más ejemplos de agentes que afectan la interacción de las eotaxinas con los receptores de eotaxina son los antagonistas del receptor, y anticuerpos, ambos anticuerpos dirigidos contra (susceptibles de unirse a) una eotaxina y los anticuerpos dirigidos contra un receptor de eotaxina, especialmente los anticuerpos monoclonales. Cualquier otro agente que inhiba o si no oculte la unión de una eotaxina a un receptor de eotaxina presenta también potencial terapéutico, por ejemplo, cualquier otro agente que se una a una eotaxina o a un receptor de eotaxina. Más agentes que presentan potencial terapéutico son los que impiden o reducen la activación de los receptores de eotaxina.

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la proteína quimiotáctica como se reivindica en la invención.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de un anticuerpo reivindicado en la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del asma o de otra enfermedad inflamatoria.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una preparación farmacéutica que comprende, como principio activo, un anticuerpo reivindicado en la invención mezclado con un portador farmacéuticamente adecuado o junto con el mismo. Más agentes que inhiben o si no ocultan la acción de las eotaxinas son los que cambian la estructura de una eotaxina de modo que ya no es capaz de unirse a un receptor de eotaxina, por ejemplo, una enzima u otro agente que degrade específicamente eotaxina.

La promiscuidad del receptor es frecuente entre las quimiocinas, de modo que aunque es esencial que un receptor sea capaz de unirse a una eotaxina, el receptor no necesita necesariamente ser específico para la eotaxina. Por ejemplo, un receptor puede unirse a MIP-1 α , RANTES y/o otras quimiocinas atrayentes de eosinófilo así como una eotaxina.

Como se indicó anteriormente, las posibilidades para la intervención terapéutica incluyen la utilización de un receptor al que se une una eotaxina, especialmente un receptor soluble. Puede presentar ventajas el utilizar un receptor específico para eotaxina. Otras posibilidades de intervención terapéutica incluyen los antagonistas del receptor, por ejemplo, basados en las estructuras tridimensionales o en las secuencias de aminoácidos de las eotaxinas y/o de los receptores de eotaxina, y los agentes descubiertos para inhibir la eotaxina u otros agonistas que se unen a receptores de eotaxina o los activan. Por ejemplo, un antagonista del receptor o un inhibidor del agonista puede ser

un polipéptido en el que se ha modificado la secuencia completa de una eotaxina natural, por ejemplo, mediante sustitución de aminoácidos, o puede ser un fragmento de una eotaxina (es decir, un polipéptido o péptido pequeño que comprenda parte de la secuencia de aminoácidos de una eotaxina natural) o un fragmento modificado de una eotaxina, por ejemplo, modificado por sustitución de aminoácidos.

5 Además, el conocimiento de la secuencia y/o de la estructura de las eotaxinas ya sea solo o en combinación con el conocimiento de la secuencia y/o estructura de otras quimiocinas que se unen a el/los mismo(s) receptor(es) como eotaxinas, proporciona información útil para el diseño de agentes terapéuticos.

10 Pueden utilizarse agentes que impiden o inhiben la síntesis o liberación de eotaxina también terapéuticamente. Dichos agentes y su utilización se describen también en la presente memoria.

15 Todos los inhibidores de actividad de, síntesis y liberación de eotaxina, incluyendo los receptores solubles, anticuerpos, antagonistas e inhibidores de la unión del agonista y su utilización se describen en la presente memoria.

20 Se describe por consiguiente un agente que inhibe o si no oculta la producción, liberación o acción de una eotaxina, especialmente un agente descrito anteriormente, para su utilización como medicamento. Aunque no forme parte de la invención, también se proporciona también la utilización de un agente que inhibe u oculta la producción, liberación o acción de una eotaxina, especialmente un agente descrito anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del asma o de otra enfermedad que tenga un componente inflamatorio, particularmente con acumulación de eosinófilos, por ejemplo, rinitis o eccema, especialmente eccema alérgico.

25 La utilización de la información estructural y de la secuencia en relación con las eotaxinas en el diseño de agentes terapéuticos y de diagnóstico útiles, por ejemplo, en un diseño por ordenador basado en la estructura tridimensional de las eotaxinas forma parte de la presente invención.

30 Los supuestos inhibidores de actividad de eotaxina pueden identificarse utilizando ensayos *in vivo* e *in vitro* basados en la inhibición de la acción quimiotáctica y/o acumulación y/o activación de los eosinófilos por las eotaxinas. Se conocen algunos métodos generales para la determinación de la actividad de un compuesto para un efecto inhibidor en la actividad de una citocina quimioatrayente *in vitro*. Dichos ensayos pueden utilizarse para determinar la acción inhibidora de un supuesto inhibidor o de los efecto *in vitro* producidos en los eosinófilos por las eotaxinas.

35 Los análisis que son adecuados para identificar supuestos inhibidores de eotaxina incluyen, por ejemplo, la inhibición *in vitro* de la elevación de las concentraciones de calcio intracelular producidas en las células por la eotaxina. El método para determinar la capacidad de una sustancia para producir acumulación de eosinófilos *in vivo*, es decir, un método para analizar las supuestas eotaxinas, puede utilizarse también para determinar la capacidad de una sustancia para inhibir la acumulación de eosinófilos producida *in vivo* por una eotaxina: se pretrata un animal con eosinófilos marcados, se administra una eotaxina y un supuesto inhibidor, y se determinan posteriormente el número de eosinófilos marcados en una zona de la piel. La eotaxina se administra generalmente por vía intradérmica, y el supuesto inhibidor puede administrarse por la misma vía o por una vía diferente, por ejemplo de forma general.

45 En la presente memoria se describen ejemplos de análisis *in vitro* e *in vivo* para la determinación de la actividad de la eotaxina y para la determinación de la actividad inhibidora de la eotaxina. Por ejemplo, el Ejemplo 1 proporciona un protocolo detallado para el análisis *in vivo* de la presente invención, y el Ejemplo 4 proporciona protocolos detallados de varios análisis. Los análisis descritos en la presente memoria pueden utilizarse como tal, o pueden modificarse según se requiera. Los análisis pueden utilizarse solos o en combinación para demostrar la actividad de eotaxina e inhibidora de eotaxina. Los supuestos inhibidores pueden ser cualquiera de los tipos de las moléculas descritas anteriormente, incluyendo receptores, por ejemplo, receptores solubles, anticuerpos y antagonistas e inhibidores de la unión del agonista. Asimismo, se proporcionan métodos para el análisis de supuestos inhibidores de eotaxinas.

50 Con mayor detalle según la presente invención se proporciona un método de análisis del efecto inhibidor de un compuesto sobre la actividad de una citocina quimioatrayente *in vitro*, caracterizado porque la citocina quimioatrayente es una proteína quimioatrayente reivindicada en la invención.

55 La presente memoria describe asimismo una preparación farmacéutica que comprende, como principio activo, un agente que inhibe o si no oculta la producción, liberación o acción de una eotaxina, mezclada o junto con un portador farmacéuticamente adecuado. Dichos agentes están descritos anteriormente e incluyen, por ejemplo, un inhibidor de la síntesis o liberación de eotaxina, un receptor de eotaxina soluble, un antagonista receptor de eotaxina o un inhibidor de un agonista receptor de eotaxina, un anticuerpo contra eotaxina o un anticuerpo contra un receptor de eotaxina.

60 La presente memoria describe asimismo un método para el tratamiento del asma y de otras enfermedades inflamatorias, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un agente que inhibe o si no oculta la producción, liberación o actuación de una eotaxina. El agente puede ser tal como el descrito anteriormente, por ejemplo, un inhibidor de la síntesis o liberación de eotaxina, un receptor de eotaxina soluble, un antagonista receptor de eotaxina o un inhibidor de un agonista receptor de eotaxina o un anticuerpo contra eotaxina o contra un receptor

de eotaxina.

La presente memoria describe asimismo análisis de eotaxinas y de anticuerpos antieotaxina, especialmente inmunoanálisis y en particular los ELISA (ensayo inmunsorbente con enzima ligada). La invención proporciona, por ejemplo, un inmunoanálisis de un antígeno, caracterizado porque el antígeno es una eotaxina de la invención, y también proporciona un inmunoanálisis de un anticuerpo, caracterizado porque el anticuerpo forma un complejo con una proteína quimioatrayente de la invención. La presente memoria describe asimismo análisis de eotaxinas que son análogos a los inmunoanálisis de eotaxinas pero que utilizan un socio de enlace específico distinto de un anticuerpo. En dicho análisis del socio de enlace específico puede utilizarse un receptor de eotaxina en lugar de un anticuerpo antieotaxina.

En un inmunoanálisis, un anticuerpo antieotaxina puede, por ejemplo, recubrir una superficie sólida que permita la captura y por consiguiente la detección de eotaxina. Un anticuerpo antieotaxina puede utilizarse en un análisis para la detección de anticuerpos contra eotaxina, por ejemplo, en un análisis de anticuerpos competitivo. Una eotaxina marcada o un derivado de la misma, por ejemplo, una eotaxina recombinante o un péptido sintético que comprende parte de la secuencia de aminoácidos de una eotaxina puede utilizarse en un análisis de eotaxina con antígeno competitivo o puede utilizarse para recubrir una superficie sólida en un análisis de captura de anticuerpos contra eotaxina. Muchos tipos diferentes de formato de análisis están bien descritos en la bibliografía de la técnica tal como, véase por ejemplo "ELISA and Other Solid Phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects", eds. Kemeny D. M. y Challacombe S. J., John Wiley, 1988. (36). Los análisis que utilizan un receptor de eotaxina en lugar de un anticuerpo antieotaxina pueden realizarse de manera análoga.

Como se mencionó anteriormente, se proporciona un procedimiento para la producción de una eotaxina, que comprende la obtención de fluido de lavado bronqueoalveolar obtenido de un animal humano o no humano sometido a la prueba de provocación con un estímulo provocador, por ejemplo, de un ser humano que padece de asma alérgica o no alérgica, u otra enfermedad pulmonar, o un cobaya sensibilizado con una proteína extraña, y el aislamiento de una fracción que presenta actividad quimiotáctica de eosinófilo. Un método de aislamiento de una fracción que contiene eotaxina de fluido de lavado bronqueoalveolar es el intercambio catiónico sucesivo, la exclusión por tamaño y los sistemas de HPLC en fase inversa. La fracción deseada contiene generalmente un polipéptido que tiene un peso molecular comprendido en el intervalo entre 6 y 16 kDa. La pureza puede verificarse por SDS-PAGE. Si se desea, la autenticidad de la sustancia obtenida puede determinarse por comparación de su secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC. ID nº: 1 o en la SEC. ID nº: 2 (Figura 7 o Figura 8).

Las eotaxinas pueden obtenerse según el procedimiento anterior de otras fuentes, por ejemplo, de los fluidos del lavado broncoalveolar o de cultivos *in vitro* de macrófagos, linfocitos, neutrófilos, mastocitos, células epiteliales de las vías respiratorias, células de tejido conectivo, células endoteliales vasculares y de los propios eosinófilos.

Alternativamente, una eotaxina completa, o una parte (fragmento) de una eotaxina, por ejemplo, un polipéptido o fragmento de péptido, pueden producirse por síntesis química, por ejemplo, según la técnica de Merryfield. Otro método para producir una eotaxina completa o una parte de la misma es mediante la tecnología del ADN recombinante. Todos los métodos de producción de eotaxina forman parte de la presente invención.

Para producir un polipéptido o un fragmento de polipéptido (o péptido) de eotaxina completa por la tecnología del ADN recombinante, se inserta una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido en un vector de expresión bajo el control de las secuencias de control asociadas. Un polipéptido recombinante puede expresarse a continuación utilizando un sistema de expresión procariótico, por ejemplo en *E. coli*, o utilizando un sistema de células eucarióticas, en cuyo caso el polipéptido resultante puede estar glucosilado. Dichas técnicas son normalizadas véase, por ejemplo Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis T., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (37).

Un ácido nucleico que codifica la totalidad o parte de un polipéptido de eotaxina puede obtenerse cribando un banco preparado a partir de células apropiadas, por ejemplo, células de cobaya o de pulmón humano sometidas a la prueba de provocación con alérgeno. El cribado puede realizarse utilizando una sonda que comprende secuencias características de una eotaxina, en especial, las secuencias que distinguen la eotaxina de otras citocinas relacionadas, por ejemplo, RANTES y MIP-1 α . Puede ser preferible utilizar una sonda larga, por ejemplo, una sonda que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de eotaxina completo.

Alternativamente, puede utilizarse la secuencia polipeptídica de una eotaxina para diseñar cebadores de oligonucleótido, por ejemplo, cebadores degenerados. Los cebadores pueden comprender, por ejemplo, bases menos específicas en su interacción que las bases naturales, por ejemplo, puede utilizarse inosina. Ejemplos de cebadores son la secuencia transcrita

5' TGC TGT TTC CGI GTI ACI AAC AAA(SEC. ID nº: 3)

basada en la secuencia CCFRVTKN de aminoácidos y la secuencia antitranscrita

5' CAT CTT GTC IGG CTT IAT TTC(SEC. ID nº: 4)

5 basada en la secuencia de aminoácidos EIKPDKM. Dichos cebadores pueden utilizarse para la ampliación del ARNm transcrito complementario mediante la reacción en cadena de polimerasa. Esto proporciona sondas de ADNc para el cribado de bancos, por ejemplo, como se describió anteriormente, para aislar clones de eotaxina completa. Los cebadores pueden incluir codones seleccionados basándose en la preferencia por especies conocidas.

10 Como se indicó anteriormente, los derivados de eotaxinas naturales forman parte también de la presente invención. Dichos derivados incluyen polipéptidos que presentan una o más de las modificaciones siguientes en relación con una eotaxina natural:

(i) alargamiento o acortamiento del terminal C;

15 (ii) alargamiento o acortamiento del terminal N;

(iii) delección y/o inserción de secuencias internas;

(iv) sustituciones de aminoácidos, por ejemplo en el terminal C y/o N; y

20 (v) un modelo diferente de glucosilación. (Existe, por ejemplo, un punto potencial de O-glucosilación en el resto 70).

25 Dichos derivados pueden operar como agonistas en estudios de la relación estructura/actividad o como antagonistas del receptor.

Los anticuerpos antieotaxina y los anticuerpos del receptor antieotaxina tanto policlonales como monoclonales, puede producirse según técnicas normalizadas, por ejemplo, Kohler y Milstein (38). Puede utilizarse una eotaxina completa como antígeno, o puede preferirse utilizar un fragmento de una eotaxina para producir un anticuerpo contra un determinante antigénico específico. Puede utilizarse una eotaxina natural como antígeno. Alternativamente, puede utilizarse una eotaxina recombinante o sintética o un polipéptido o péptido de eotaxina. Por lo tanto, según otro aspecto aún de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de un anticuerpo según la invención que comprende la utilización de una proteína quimiotáctica según la invención.

35 Las Figuras 1 a 18 de los dibujos adjuntos ilustran la presente invención. A continuación proporciona una breve descripción de las Figuras. Una descripción más detallada de las Figuras se proporciona a continuación y en el apartado Ejemplos de la presente memoria.

40 Figura 1: Protocolo para la generación y ensayo de actividad quimioatrayente de eosinófilos *in vivo*.

Figura 2: Generación de actividad quimioatrayente de eosinófilos en los pulmones de cobayas sensibilizados tras la prueba de provocación con antígeno a lo largo del tiempo.

45 Las Figuras 3, 4 y 5 se refieren todas a la purificación de la eotaxina procedente de los fluidos del lavado brocoalveolar (BAL):

Figura 3: Perfil de HPLC en fase inversa final que presenta la absorbancia a 214 nm y el gradiente de acetonitrilo.

50 Figura 4: Medición de la actividad quimioatrayente de ¹¹¹In-eosinófilo de las fracciones obtenidas en la cromatografía HPLC.

Figura 5: Medición de la actividad quimioatrayente con ¹¹¹In-neutrófilo; falta de actividad significativa observada.

55 Figura 6: Análisis SDS-PAGE de las fracciones 50 a 56 por HPLC en fase inversa con C18.

Figuras 7 y 8: Secuencias de aminoácidos de una eotaxina aislada de cobaya.

60 Figura 9: Comparación de la secuencia de eotaxina de la Figura 7 con MCP-1, MCP-2, MCP-3 humano (21), MCP-1 de cobaya (24), MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES (18) humanas que presentan restos conservados (sombreadas).

Figura 10: Comparación de la acumulación de eosinófilos con ¹¹¹In *in vivo* utilizando eotaxina de cobaya y proteínas RANTES, MIP-1 α y MCP-1 recombinantes humanas.

65 Figura 11 (recuadro): Inhibición de la fijación de ¹²⁵I-RANTES a eosinófilos de cobaya producidos *in vitro* por eotaxina y RANTES pero no por un miembro IL-8 del ramal C-X-C de quimiocinas.

Las Figuras 12, 13 y 14 ilustran el potencial de bloqueo de la respuesta a la eotaxina de cobaya. Éstas hacen uso del hecho de que RANTES humano, mientras compete con eotaxina por las zonas de fijación, no activa los eosinófilos de cobaya.

5 Figura 12: Elevación de las concentraciones de calcio intracelular en eosinófilos humanos *in vitro* producida por eotaxina, RANTES y a alta concentración solamente, MCP-1.

10 Figura 13: Elevación de las concentraciones de calcio intracelular en eosinófilos de cobaya *in vitro* producida por eotaxina, pero no por RANTES ni por MCP-1 humanas.

15 Figura 14: Vestigios representativos que muestran la inhibición de la elevación producida por eotaxina de cobaya de las concentraciones de calcio intracelular en eosinófilos de cobaya *in vitro* por la exposición previa de las mismas células a RANTES humana.

Figura 15 (recuadro): Valores (media±SEM) para cuatro preparaciones de eosinófilos por separado.

20 Figura 16: Curva de respuesta a la dosis que muestra la inhibición de la elevación producida por eotaxina de cobaya de las concentraciones de calcio intracelular en eosinófilos de cobaya *in vitro* por la exposición previa de las mismas células a RANTES humana.

Figura 17: Histograma que presenta la comparación de la respuesta *in vivo* de eosinófilos de cobaya a la eotaxina, RANTES y RANTES más eotaxina inyectada conjuntamente por vía intradérmica.

25 Figura 18: Histograma que presenta el número de eosinófilos y de neutrófilos en el fluido de lavado broncoalveolar (BAL) después de la administración de eotaxina de cobaya como aerosol a las vías respiratorias del cobaya.

30 Como en los pacientes asmáticos alérgicos, la exposición de cobayas sensibilizados a antígeno aerosolizado produce una fase inmediata de broncoconstricción con desgranulación de mastocitos asociada seguida, en algunos individuos, de una fase tardía de broncoconstricción e hipersensibilidad en las vías respiratorias (4-7). Aunque de manera clara ningún modelo simula todas las propiedades de la enfermedad humana, el modelo de cobaya comparte características comunes con la respuesta asmática en el hombre que se ha utilizado ampliamente para investigar los posibles mecanismos (7). En especial, tanto en el cobaya como en el hombre, la respuesta inmediata al alérgeno activa la acumulación posterior en los pulmones de gran número de eosinófilos. Se diseñaron experimentos para detectar el aspecto en el pulmón de quimioatrayentes que pueden ser responsables de la acumulación de eosinófilos. Se empleó una estrategia que se había aplicado anteriormente a la identificación de quimioatrayentes neutrófilos en exudados inflamatorios (8-10).

40 Se sensibilizaron cobayas con ovoalbúmina intraperitoneal el día 1 seguido de una corta exposición de sus pulmones a la ovoalbúmina aerosolizada el día 8. Los días 15 a 21 los animales se sometieron a la prueba de provocación con ovoalbúmina aerosolizada y se sacrificaron a diferentes intervalos utilizando una sobredosis de barbitúrico. Inmediatamente después de la muerte se lavaron las vías respiratorias con solución salina. El fluido de lavado broncoalveolar (BAL) se centrifugó para separar las células, y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C para análisis o se sometieron a purificación. La actividad quimioatrayente de eosinófilos en muestras de fluido BAL o fracciones de HPLC se ensayó inyectándoles por vía intradérmica en el ensayo de cobayas administrados previamente con inyecciones intravenosas de eosinófilos con ¹¹¹In (11, 12). Después de un intervalo de 2 ó 4 h, los animales de ensayo se sacrificaron y se punzaron las zonas de la piel donde se hizo el recuento con un contador gamma (Figura 1).

50 La Figura 2 presenta el aspecto de la actividad quimioatrayente de eosinófilos en el fluido BAL a lo largo del tiempo. Se observó actividad significativa 30 min después de la prueba de provocación con antígeno. La actividad aumentó hasta 3 h, permaneció elevada a las 6 h, pero no fue significativa en las muestras de 24 h. Las muestras de referencia (fluido BAL de cobayas pseudosensibilizados o sometidos a prueba de provocación o sensibilizados o pseudosometidos a prueba de provocación) tomadas a las 3 h no presentaban actividad significativa.

60 La actividad quimioatrayente de eosinófilos, que se denominó eotaxina, se purificó a partir de fluido BAL de 3 h por intercambio catiónico sucesivo, exclusión por tamaño y HPLC en fase inversa utilizando el ensayo de acumulación de eosinófilos con ¹¹¹In *in vivo* para medir la actividad de las fracciones completamente. La eotaxina eluyó como un pico discreto aislado de bioactividad tanto del intercambio catiónico como en las etapas de exclusión por tamaño, lo que indica una proteína fuertemente catiónica de 7 a 14 kDa. La cromatografía en fase inversa separó la actividad quimioatrayente de eosinófilos en dos picos (fracciones 51+52 y fracción 54), que estaban asociados a picos discretos de absorbancia de proteínas (Figuras 3 y 4). La selectividad por los eosinófilos se mostró por la falta de actividad quimioatrayente neutrófila significativa en estas fracciones medida por la acumulación de neutrófilos con ¹¹¹In en el ensayo de la piel (Figura 5). El examen histológico de la piel inyectada con eotaxina (2 pmoles) demostró la acumulación de eosinófilos a las 4 y 24 h, especialmente alrededor de los vasos sanguíneos pequeños (cepas de

hematoxilina y eosina).

El análisis SDS-PAGE puso de manifiesto una sola banda de proteína en cada una de las fracciones 51, 52 y 54 (Figura 6). La proteína en las fracciones 51 y 52 fue ligeramente mayor que la de la fracción 54. Esto se confirmó por análisis de masas en los que las señales principales fueron aproximadamente 8,81 y 8,38 kDa respectivamente (véase el Ejemplo 3). El secuenciado N-terminal de las fracciones 51, 52 y 54 puso de manifiesto secuencias idénticas de aminoácidos (véase la Figura 7). La secuencia del resto 37 N-terminal de eotaxina expuesta en la SEC. ID nº: 1 y la Figura 7 presenta el 57% de homología con la proteína quimiotáctica de monocitos humanos (MCP-1 (13), conocida de otro modo como MCAF (14) y JE (15)). Los péptidos trípticos de la fracción 54 se secuenciaron también y se alinearon fácilmente por comparación con la MCP-1 humana para proporcionar la secuencia prácticamente completa de eotaxina con una homología global del 53%, véase la Figura 7. Es probable que las variaciones en la masa molecular reflejen la glucosilación diferencial ya que las cuatro señales de masa obtenidas (dos mayores y dos menores, véase el Ejemplo 3) son todas diferentes entre sí por múltiplos de aproximadamente 220 unidades de masa. La secuencia no contiene puntos de N-glucosilación, pero se ha identificado un punto potencial de O-glucosilación en la posición 70 (véase el Ejemplo 3). MCP-1 humana también presenta homogeneidad en SDS-PAGE debido a las diferencias en la modificación del carbohidrato ligado al O (16).

La superfamilia del factor 4 de plaquetas de las citocinas quimioatrayente, o quimiocinas, se caracteriza por cuatro cisteínas conservadas. La posición relativas de las dos cisteínas N-terminales permite la subdivisión de esta superfamilia en las quimiocinas de C-X-C (p. ej. IL-8 (17)) que son predominantemente quimioatrayente neutrófilos y las quimiocinas con C-C (p. ej. MCP-1, RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β (18)) que son quimiotácticas para otros leucocitos aparte de los neutrófilos. Eotaxina es un miembro del ramal C-C de las quimiocinas. La mayor homología (53%) es con MCP-1 humana que, en los estudios limitados *in vitro* hasta la fecha, se ha descrito que es inactiva en eosinófilos humanos (19, 20) y con la MCP-2 humana descrita recientemente (54%) y MCP-3 (51% de homología calculada sobre la base de la SEC. ID nº: 1 (Figura 7); 54% de homología cuando se calcula basándose en las secuencias de solapamiento) (21). La homología con otras quimiocinas humanas con C-C (Figura 9) es: MIP-1 β (37% calculado basándose en la SEC. ID nº: 1 (Figura 7); 39% cuando se calcula basándose en las secuencias de solapamiento), MIP-1 α (31% calculado basándose en la SEC. ID nº: 1 (Figura 7); 32% cuando se calcula basándose en las secuencias de solapamiento) y RANTES (26% calculado basándose en la SEC. ID nº: 1 (Figura 7); 27% cuando se calcula basándose en la secuencia de solapamiento). Se ha demostrado recientemente que las dos proteínas últimas son potentes activadores eosinófilos *in vitro* (20, 22) mientras que MIP-1 β activa los linfocitos *in vitro* (23) pero aparentemente no los eosinófilos (20). La eotaxina presenta la homología estructural mayor con MCP-1, MCP-2 y MCP-3 humanas. La eotaxina presenta similitudes funcionales, pero relativamente poca homología, cuando se compara con RANTES y MIP-1 α . La eotaxina es claramente una molécula distinta de MCP-1 de cobaya; esta última se ha clonado recientemente (24) y presenta solamente un 43% de homología con la secuencia de eotaxina, véase la Figura 9. MCP-1 de cobaya se demostró que era quimiotáctica para los monocitos pero no se demostró en eosinófilos (24). Es interesante que la eotaxina tiene un 41% de homología con una proteína con C-C cuyo gen se expresa en mastocitos de ratón y se regula por incremento 2 h después de la interacción entre IgE y el antígeno (25). No se ha descrito ninguna actividad funcional para esta proteína pero es distinta (51% de homología) de la MCP-1/JE de ratón (25).

La eotaxina del cobaya fue muy potente para producir la acumulación de eosinófilos *in vivo*: 1-2 pmoles/punto de piel proporcionando una respuesta de 730 \pm 140% (media \pm s.e.m., n=18 animales) en comparación con los puntos inyectados con solución salina. Además, la acumulación notable de eosinófilos se observó a los 30 minutos de inyección intradérmica (Figura 10). Esto está apoyado en experimentos *in vitro*. El efecto de la eotaxina en los eosinófilos *in vitro* se observó por (i) inhibición de la fijación de ¹²⁵I-RANTES a células de cobaya (Figura 11), (ii) elevación del calcio citoplasmático en células humanas y de cobaya (Figuras 12 y 13) y (iii) quimiotaxia de eosinófilos humanos en un sistema con cámara Boyden: las respuestas quimiotácticas a la eotaxina y RANTES fueron de magnitud similar en todo el intervalo entre 0,1 y 3,0 nm. A diferencia de la eotaxina, MCP-1 recombinante humana y RANTES no produjeron respuestas de eosinófilos de cobaya *in vitro* o *in vivo* (Figuras 10 y 13). Esto puede reflejar una diferencia de la especie aunque RANTES no se unió a los eosinófilos de cobaya sin producir activación (Figura 11, recuadro en Figura 10). La eotaxina tiene una potencia similar a RANTES en los eosinófilos humanos mientras que MCP-1 es inactiva (20) o activa solamente a grandes dosis (Figura 12). Por lo tanto, la eotaxina tiene un potente efecto directo tanto en eosinófilos humanos como de cobaya.

RANTES humana puede inhibir *in vitro* e *in vivo* las respuestas de los eosinófilos de cobaya a la eotaxina de cobaya. Las Figuras 14, 15 y 16 presentan la respuesta de eosinófilos de cobaya cargados con FURA-2 a la eotaxina de cobaya antes y después de la adición de RANTES humana. El aumento producido por la eotaxina en la concentración del calcio intracelular se reduce en un grado sustancial cuando las células se exponen en primer lugar a RANTES humana, que no puede producir una respuesta. La Figura 17 demuestra que RANTES humana, cuando se inyecta conjuntamente con la eotaxina, reduce la acumulación de eosinófilos de cobaya producidos por la eotaxina en la piel de cobaya *in vivo*. Los resultados apoyan las observaciones de los inventores de que la eotaxina presenta unión competitiva con RANTES humana radiomarcada en eosinófilos de cobaya y que la eotaxina es un potente estimulante operativo mientras que RANTES no lo es. Por consiguiente, RANTES parece actuar como antagonista receptor para eotaxina en eosinófilos de cobaya.

La Figura 18 demuestra que los eosinófilos se acumulan en la vías respiratorias del cobaya *in vivo* dentro de las 24 horas de la administración de la eotaxina aerosolizada de cobaya, mientras que sustancialmente no se observa acumulación de neutrófilos.

5 Los Ejemplos siguientes ilustran la presente invención.

Ejemplo 1

Producción y análisis del fluido de lavado broncoalveolar

10 MÉTODOS: Se sensibilizaron cobayas Dunkin Hartley macho (300 a 400 g) con ovoalbúmina intraperitoneal (OA, 1 mg) el día 1 seguido de exposición a antígeno aerosolizado (OA al 2% durante 5 min utilizando un nebulizador ultrasónico) el día 8 (6). Los días 15 al 21, se pretrataron los animales con una antihistamina para impedir la muerte aguda por accidente (pirilamina, 10 mg kg⁻¹, i.p.) y se sometieron a la prueba de provocación por exposición a antígeno aerosolizado (OA al 1% durante 20 min). En diferentes momentos después de la prueba de provocación con antígeno se trataron los animales con atropina (0,06 mg kg⁻¹, i.p.) para impedir la broncoconstricción y se sacrificaron con una sobredosis de barbitúrico. Se realizó el lavado broncoalveolar con 4 ml de solución salina. Las muestras se centrifugaron para separar las células y el sobrenadante se almacenó a -20°C antes del análisis. Las muestras de BAL se analizaron mediante inyección intradérmica (0,1 ml) en cobayas a los que se administraron previamente inyecciones intravenosas de 5x10⁶ eosinófilos con ¹¹¹In (producidos en animales donantes mediante inyecciones intraperitoneales repetidas de suero de caballo y purificados en gradientes de Percoll discontinuos, >94% de pureza) (11, 12). Después de 4 horas, los animales del ensayo se sacrificaron y se punzaron puntos de la piel para el recuento gamma. Los datos se presentan como media ± s. e. m. y se analizaron mediante análisis de varianza de una vía. Un valor p de <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

25 RESULTADOS: La Figura 1 presenta, esquemáticamente procedimientos para la generación y medición de la actividad quimioatrayente de eosinófilos *in vivo*. La Figura 2 ilustra la generación de actividad quimioatrayente de eosinófilos a lo largo del tiempo en pulmones de cobayas sensibilizados después de la prueba de provocación con antígeno (cuadrados negros, n=4-10). Se midió la actividad en un ensayo *in vivo* en la piel de la acumulación de eosinófilos con ¹¹¹In en cobayas no sensibilizados (3 animales de ensayo por muestra de BAL). Se observó actividad significativa en las muestras de lavado broncoalveolar tomadas 0,5, 1,5, 3 y 6 h después de la prueba de provocación con antígeno (comparadas con las respuestas a la solución salina intradérmica, mostradas como línea de puntos). No se observó actividad significativa en las muestras de 24 h. No se observó actividad en las muestras de lavado obtenidas 3 h después de la pseudoprueba de provocación (solución salina) de animales sensibilizados (círculos negros, n=5) o de la prueba de provocación con antígeno de pseudoanimales sensibilizados (solución salina) (rombos negros, n=5).

Ejemplo 2

Purificación de eotaxina en fluidos de lavado broncoalveolar

40 MÉTODOS: Se recogió fluido de lavado broncoalveolar (BAL) de 25 cobayas sensibilizados (cada lavado con 4 ml, seguido de 2x10 ml de solución salina) 3 h después de la prueba de provocación con antígeno (OA al 1%, exposición de 5 min) se aplicó a una columna HPLC de intercambio catiónico (Ultropac TSK535CM, 7,5x150 mm). Se eluyó la actividad en acetato amónico aprox. 1,4 M, pH 5,5, y se liofilizó para HPLC por exclusión de tamaño (columnas SWP Ultropac TSK, 7,5x75 mm, G4000SW, 7,5x600 mm y G2000SW, 7,5x600 mm en serie, equilibrada en TFA al 0,08%). Se eluyó la actividad a aprox. 7 a 14 kDa. Esto se aplicó a una columna HPLC (4x250 mm) en fase inversa Vydac C18 de poro amplio (300 Å) en TFA al 0,08%, se eluyó con un gradiente lineal de acetonitrilo (ACN del 0 al 80% en TFA al 0,08%, durante 80 min, en fracciones de 1 ml min⁻¹) y se recogieron fracciones de 0,5 min. Se liofilizaron alícuotas (4%) de cada fracción en presencia de proteína portadora (BSA, <0,1 ng de endotoxina mg⁻¹) y se redisolvieron en 0,8 ml de solución salina para experimentación en los bioanálisis en piel de acumulación de ¹¹¹In-eosinófilos y de ¹¹¹In-neutrófilos durante 2 horas (n=4). Se produjeron eosinófilos (99%, 0,5% de neutrófilos) con inyecciones intraperitoneales repetidas de suero de caballo (11, 12) y neutrófilos (99,4%, 0,6% de eosinófilos) se produjeron con una sola inyección intraperitoneal de caseína (5% p/v, 15 ml) 17 h antes de la purificación en gradientes discontinuos de Percoll y marcado con ¹¹¹In.

55 RESULTADOS: Los resultados se presentan en las Figuras 3, 4 y 5. La Figura 3 presenta el perfil de HPLC en fase inversa final mostrando la absorbancia a 214 nm y el gradiente de acetonitrilo. La Figura 4 demuestra que se observó actividad quimioatrayente eosinófila en 2 picos, que corresponden a las fracciones 51+52 y la fracción 54, que corresponde a picos discretos de absorbancia. La Figura 5 demuestra que no se detectó actividad quimioatrayente de neutrófilos significativa en estas fracciones. En cambio, C5a de cobaya des Arg (plasma activado con zymosan al 30% (11), aprox. 10 pmoles/punto) produjo la acumulación tanto de ¹¹¹In-eosinófilos (5.211±893) como de ¹¹¹In-neutrófilos (9.872±473). Las fracciones 50, 53, 55 y 56 proporcionaron poca o ninguna actividad continuamente en los bioanálisis de acumulación de leucocitos en la piel del cobaya. No se detectó absorbancia de proteína significativa en el gradiente restante (hasta el 80% de acetonitrilo).

Ejemplo 3**Pureza, análisis de masas y secuencia proteica de eotaxina**

5 MÉTODOS: Se liofilizaron 2% de alícuotas de cada fracción, se redisolvieron en 10 µl de tampón SDS, se calentaron (95°C, 5 min.) y se introdujeron 0,3 µl en gels de gradiente de 8 a 25% en un Pharmacia Phast System. Se observaron los gels con tinción de plata. Se realizó el análisis de masas en las fracciones 51, 52 y 54 utilizando un Finningan MAT Lasermat con matrices de ácido α-ciano-4-hidroxicinnámico y ácido sinapínico. Se calibraron las mediciones de masas internamente utilizando patrones de proteína. Se aplicaron 5% de alícuotas de cada fracción bioactiva (51, 52 y 54) directamente al análisis de la secuencia N-terminal automática utilizando ciclos rápidos en un Applied Biosystems 477A que contenían un microcartucho esencialmente como se describe (32). Se obtuvieron los residuos aminoterminales 37, 35 y 29 para las fracciones 51, 52 y 54 respectivamente. No se encontraron diferencias entre las posiciones correspondientes. Los campos iniciales visibles de estos tres análisis fueron todos aproximadamente de 7 a 8 pmoles. Por lo tanto las fracciones 51, 52 y 54 contenían aprox. 200 pmoles cada una, suponiendo el 70 al 80% de campos de secuenciado. Se observaron huecos en las posiciones 8, 9 y 33, correspondientes a la presencia de restos de cisteína en estas posiciones. Se redujeron aproximadamente 30 pmoles de la fracción 54 y se alquilaron por tratamiento sucesivo con ditiotreitól 1 mM durante 5 min a 50°C y a continuación acrilamida 10 mM durante 30 min a 37°C antes de la digestión con tripsina alquilada (Promega) en Tris/HCl 20 mM, pH 8,8, que contenía 0,5% de Thesit. Se separaron los péptidos utilizando una columna Reliasil C18 (300 Å, 5 µm) (1x150 mm) desarrollada con un gradiente lineal de concentración de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,08% en 50 µl/min o un sistema HPLC de Microm. Se sometieron los péptidos purificados a análisis de la secuencia N-terminal como anteriormente, pero los cuatro restos de cisteína se identificaron positivamente como derivado PTH-cys-S-β-propionamida (33). La posición 70 no dio derivado de PTH en los péptidos T6 y T7 y es una posición probable de O-glucosilación.

25 RESULTADOS: En las Figuras 6, 7, 8 y 9 se presentan los resultados. La Figura 6 es una fotografía del gel de SDS-PAGE. Como referencia, se introdujo IL-8 humana (72 aminoácidos, aprox. 8 kDa) en las bandas A, B y C (12, 2,4 y 0,5 ng/0,3 µl/banda respectivamente). La duración de la desorción con láser del análisis de masas por tramos proporcionó señales a 8,81 kDa (mayor) y a 9,03 kDa (menor) para cada una de las fracciones 51 y 52. La fracción 54 proporcionó señales a 8,38 kDa (mayor) y a 8,15 kDa (menor).

Las Figuras 7 y la SEC. ID nº: 1 presentan la secuencia de aminoácidos de eotaxina, que se determinó secuenciando la molécula íntegra así como los péptidos procedentes de la digestión con tripsina (T). El análisis N-terminal presentó la homología mayor con MCP-1 humana (57%) y los péptidos trípticos se alinearon fácilmente por comparación con la secuencia de MCP-1 humana. La Figura 8 presenta la secuencia de aminoácidos confirmada por secuenciado del ácido nucleico. La Figura 9 es una comparación de la secuencia de eotaxina con MCP-1, MCP-2, MCP-3 humanas (21), MCP-1 de cobaya (24), MIP-1α, MIP-1β y RANTES humanas (18) que presentan restos conservados (sombreados).

Ejemplo 4**Experimentación *in vitro* e *in vivo* de eotaxina**

MÉTODOS:

- 45 (i) Eotaxina era un grupo de ambos picos de bioactividad (fracciones 51+52 y fracción 54) de la separación por HPLC en fase inversa final descrita en el Ejemplo 2 (véase Figuras 3, 4 y 5). La acumulación de ¹¹¹In-eosinófilos en la piel de cobaya se midió durante 4 h como se describe en el Ejemplo 1 (véase Figuras 1 y 2). En los mismos animales (n=4) se inyectó eotaxina en puntos adicionales 30 minutos antes del sacrificio.
- 50 (ii) Durante los estudios de fijación, se incubaron 4x10⁵ eosinófilos con ¹²⁵I-RANTES 0,1 nM y varias concentraciones de ligando frío (50 µl a 0°C durante 2 h). La solución salina tamponada de Hank contenía HEPES 30 mM, EDTA 10 mM; azida sódica al 0,1% y BSA al 1% a pH 7,5. Los resultados son la media de dos análisis cada uno realizado por triplicado.
- 55 (iii) Para la medición de las concentraciones de calcio intracelular se cargaron eosinófilos humanos y de cobaya (10⁷ células/ml en PBS exento de Ca²⁺/Mg²⁺+BSA al 0,1%) con éster fura-2-acetoximetílico (2,5 µl, 30 min a 37°C). Después de dos lavados las células se volvieron a poner en suspensión a razón de 10⁶ células/ml en PBS exento de Ca²⁺/Mg²⁺ que contenía HEPES 10 mM, BSA al 0,25% y glucosa 10 mM (pH 7,4). Las alícuotas se dispensaron en cubetas de cuarzo y se ajustó el [Ca²⁺] externo a 1 mM con CaCl₂. Se controlaron los cambios de fluorescencia a 37°C utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer LS50 a longitudes de onda de excitación de 340 nm en 380 nm y longitud de onda de emisión de 510 nm. Se calcularon las concentraciones de [Ca²⁺]; tal como se describió anteriormente (34) utilizando la relación de las dos lecturas de fluorescencia y una Kd para la fijación de Ca²⁺ a 37°C de 224 nM. Se prepararon eosinófilos periféricos humanos tal como se describió anteriormente (35) por centrifugación por densidad en Percoll seguido de eliminación inmunomagnética de neutrófilos CD16⁺ utilizando el sistema MACS. Se prepararon eosinófilos de

cobaya tal como se describió en el Ejemplo 1 (11, 12).

- (iv) Para probar la supresión de la acumulación eosinófila *in vivo* utilizando RANTES humana, se midió la acumulación de eosinófilos de cobaya marcados con ^{111}I en los puntos de la piel tal como se describió anteriormente. Se inyectaron cobayas con 1,8 pmoles de eotaxina (n=2), 100 pmoles de RANTES (n=1) o con 1,8 pmoles de eotaxina de 100 pmoles de RANTES (n=2). Se utilizó como referencia solución salina intradérmica.
- (v) Para probar la actividad antagonista del receptor, se estimularon eosinófilos de cobaya cargados con éster fura-2-acetoximetílico con eotaxina 3 nM con o sin pretratamiento con RANTES humana.
- (vi) Para investigar el efecto de la exposición al aerosol de cobayas a la eotaxina, se expusieron cobayas naturales a un aerosol de eotaxina o un medio de referencia (n=8 por grupo). Se realizó la exposición colocando dos animales en una cámara aislada y nebulizando 24 pmoles de eotaxina disuelta en 100 ml de PBS que contenía proteína portadora BSA a razón de 80 $\mu\text{g}/\text{m}$ durante un periodo de 35 a 40 minutos. Los animales de referencia recibieron PBS/BSA aerosolizado de la misma manera. Se sacrificaron los animales 20 horas después de la exposición a eotaxina o al medio de referencia. Se recuperó el fluido BAL (5x10 ml de HBSS, EDTA 10 mM, pH 7,35) y se centrifugó (300 g, 20 min, 4°C). El recuento de células BAL totales se determinó con hemocitómetro y se realizaron recuentos de células diferenciadas en preparaciones coloreadas con citospina (DiffQuick) (3 por animal, 400 recuentos de células por portaobjetos).

RESULTADOS: Los resultados se presentan en las Figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

La Figura 10 demuestra que la eotaxina de cobaya (1,6 pmoles) produce acumulación significativa de ^{111}In -eosinófilos *in vivo* 30 min (cuadros blancos, $p<0,01$) y 4 h (cuadros negros, $p<0,01$) tras la inyección intradérmica. En cambio, las proteínas recombinantes humanas, RANTES, MIP-1 α y MCP-1 a dosis hasta de 100 pmoles, no tuvieron efecto durante 4 horas. El recuadro de la Figura 11 demuestra que eotaxina y RANTES, pero no la IL-8 de la quimiocina IL-8 C-X-C, inhiben la fijación de ^{125}I -RANTES ($B_0=14,4\%$) en eosinófilos de cobaya *in vitro*. La Figura 17 demuestra que (a) RANTES humano no produce acumulación significativa de eosinófilos y (b) que RANTES humana inhibe hasta un grado sustancial la acumulación eosinófila producida por eotaxina, lo que sugiere que RANTES actúa como antagonista receptor para la eotaxina *in vivo*.

La Figura 12 demuestra que eotaxina, RANTES y, a concentración elevada solamente, MCP-1 producen la elevación de concentraciones de calcio intracelular en eosinófilos humanos *in vitro*. Existen vestigios con eosinófilos procedentes de un donante. En otros dos donantes eotaxina 2 nM produjo una elevación de calcio media de 61 nM. En los tres donantes (97,3 \pm 1,2% de eosinófilos) las respuestas a RANTES 10 nM fueron $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 194 \pm 74 nM y las respuestas a MCP-1 100 nM fueron $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 93 \pm 38 nM.

La Figura 13 demuestra que eotaxina de cobaya, pero no RANTES o MCP-1 humanas, eleva las concentraciones de calcio intracelular en eosinófilos de cobaya *in vitro*. Existen vestigios con células procedentes de un donante. En tres donantes (97,5 \pm 0,8% de eosinófilos) las respuestas fueron: eotaxina 2 nM, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 90 \pm 13 nM; RANTES 100 nM, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 2,0 \pm 1,7 nM; MCP-1 100 nM, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 3,3 \pm 0,7 nM.

La Figura 14 y el recuadro de la Figura 15 demuestran que el tratamiento anterior de eosinófilos de cobaya con RANTES (100 nM) inhibe el aumento de las concentraciones de calcio libre intracelular observadas cuando se tratan eosinófilos con eotaxina (3 nM) sola. RANTES parece ser que actúa como antagonista receptor en eosinófilos de cobaya. La Figura 16 es una curva de respuesta a la dosis utilizando eotaxina 3 nM y aumentado las cantidades de RANTES.

La Figura 18 demuestra que la eotaxina de cobaya, administrada en forma de aerosol, produce acumulación eosinófila en las vías respiratorias del cobaya *in vivo*, mientras que no se observa sustancialmente acumulación de neutrófilos.

Referencias

1. de Monchy, J. G. R., Kauffman, H. F., Venge, P., *et al.* Am. Rev. Respir. Dis. 131, 373-376 (1985).
2. Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J. Y., *et al.* N. Engl. J. Med. 323, 1033-1039 (1990).
3. Bradley, B. L., Azzawi, M., Jacobson, M., *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 88, 661-674 (1991).
4. Dunn, C. J., Elliott, G. A., Oostveen, J. A. & Richards, I. M. Am. Rev. Respir. Dis. 137, 541-547 (1988).
5. Sanjar, S., Aoki, S., Kristersson, A., Smith, D. & Morley, J. Br. J. Pharmacol. 99, 679-686 (1990).
6. Griffiths-Johnson, D. A. & Karol, M. H. Toxicology 65, 283-294 (1991).

7. Campos, M. G. & Church, M. K. *Clin. Exp. Allergy* 22, 665-666 (1992).
- 5 8. Collins, P. D., Jose, P. J. & Williams, T. J. *J. Immunol.* 146, 677-684 (1991).
9. Beaubien, B. C., Collins, P. D., Jose, P. J., *et al.* *Biochem. J.* 271, 797-801 (1990).
10. Jose, P. J., Collins, P. D., Perkins, J. A., *et al.* *Biochem. J.* 278, 493-497 (1991).
11. Faccioli, L. H., Nourshargh, S., Moqbel, R., *et al.* *Immunology* 73, 222-227 (1991).
12. Weg, V. B., Williams, T. J., Lobb, R. R. & Nourshargh, S. *J. Exp. Med.* 177, 561-566 (1993).
- 15 13. Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S. K., Appella, E., Lerman, M. I. & Leonard, E. J. *FEBS Letts.* 244, 487-493 (1989).
14. Furutani, Y., Nomura, H., Notake, M., *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 249-255 (1989).
- 20 15. Rollins, B. J., Morrison, E. D. & Stiles, C. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3738-3742 (1988).
16. Jiang, Y., Valente, A. J., Williamson, M. J., Zhang, L. & Graves, D. T. *J. Biol. Chem.* 265, 18318-18321 (1990).
- 25 17. Jiang, Y., Valente, A. J., Williamson, M. J., Zhang, L. & Graves, D. T. *J. Biol. Chem.* 265, 18318-18321 (1990).
18. Schall, T. J. *Cytokine* 3, 165-183 (1991).
- 30 19. Leonard, E. J. & Yoshimura, T. *Immunology Today* 11, 97-101 (1990).
20. Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S. C., Schall, T. J. & Dahinden, C. A. *J. Exp. Med.* 176, 1489-1495 (1992).
- 35 21. Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J-P. & Opdenakker, G. *J. Exp. Med.* 176, 59-65 (1992).
22. Kameyoshi, Y., Dorschner, A., Mallet, A. I., Christophers, E. & Schroder, J-M. *J. Exp. Med.* 176, 587-592 (1992).
- 40 23. Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. & Shaw, S. *Nature* 361, 79-82 (1993).
24. Yoshimura, T. *J. Immunol.* 150, 5025-5032 (1993).
25. Kulmburg, P. A., Huber, N. E., Scheer, B. J., Wrann, M. & Baumruker, T. *J. Exp. Med.* 176, 1773-1778 (1992).
- 45 26. Frigas, E. & Gleich, G. J. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77, 527-537 (1986).
27. Wegner, C. D., Gundel, R. H., Reilly, P., Haynes, N., Letts, L. G. & Rothlein, R. *Science* 247, 456-459 (1990).
- 50 28. Lellouch-Tubiana, A., Lefort, J., Simon, M-T., Pfister, A. & Vargaftig, B. B. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 948-954 (1988).
29. Coyle, A. J., Page, C. P., Atkinson, L., Flanagan, R. & Metzger, W. J. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142, 587-593 (1990).
- 55 30. Silva, P. M. R., Martins, M. A., Castro-Faria-Neto, H. C., Cordeiro, R. S. B. & Vargaftig, B. B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257, 1039 (1991).
31. Cochran, B. H., Reffel, A. C. & Stiles, C. D. *Cell* 33, 939-947 (1983).
- 60 32. Totty, N. F., Waterfield, M. D. & Hsuan, J. J. *Protein-Science* 1, 1215-1224 (1992).
33. Brune, D. C. *Anal. Biochem.* 207, 285-290 (1992).
- 65 34. Gryniewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450 (1985).
35. Anwar, A. R. F., Moqbel, R., Walsh, G. M., Kay, A. B. & Wardlaw, A. J. *J. Exp. Med.* 177, 839-843 (1993).

36. ELISA and Other Solid Phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects" Eds. Kemeny D.M. & Challacombe S.J., John Wiley, 1988.

5 37. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

38. Kohler & Milstein, Nature 256, 495-497 (1975).

10 **Listado de secuencias**

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

15 (A) DENOMINACIÓN: Nacional Hert & Lung Institute
(B) CALLE: Dovehouse Street
(C) CIUDAD: Londres
(E) PAÍS: Inglaterra
20 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): SW3 6LY
(G) TELÉFONO: 071 352 8121
(H) Telefax: 071 376 3442

25 (A) DENOMINACIÓN: Ludwig Institute for Cancer Research
(B) CALLE: Hedges House, 153-155 Regent Street
(C) CIUDAD: Londres
(E) PAÍS: Inglaterra
30 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): W1R 7FD
(G) TELÉFONO: 071 494 0025
(H) Telefax: 071 494 1404

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: CITOCINA QUIMIOTÁCTICA

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4

(iv) LISTADO DESCIFRABLE POR ORDENADOR:

35 (A) TIPO DE SOPORTE: Disquete
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
40 (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release nº 1.0, Versión nº 1.25 (EPO)

(vi) DATOS ANTERIORES DE LA SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: GB 9318984
45 (B) FECHA DE SOLICITUD: 14-SEP-1993

(vi) DATOS ANTERIORES DE LA SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: GB 9408602
50 (B) FECHA DE SOLICITUD: 29-ABR-1994

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 73 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

60 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Cavia porcellus*
65 (D) ETAPA DE DESARROLLO: Adulto
(F) TIPO DE TEJIDO: Fluido de lavado broncoalveolar

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 1:

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

5 (2) INFORMACIÓN RELATIVAS A LA SEC ID nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 73 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Cavia cobaya*
 (F) TIPO DE TEJIDO: Fluido de lavado broncoalveolar

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 2:

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

25 (2) INFORMACIÓN RELATIVAS A LA SEC ID nº 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) NÚMERO DE CADENAS: una
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)
 (iii) HIPOTÉTICA: SÍ
 (iii) CADENA COMPLEMENTARIA: NO
 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) DENOMINACIÓN/CLAVE: base_modificada: N es inosina
(B) POSICIÓN: 12

5 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) DENOMINACIÓN/CLAVE: base_modificada: N es inosina
(B) POSICIÓN: 15

10 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) DENOMINACIÓN/CLAVE: base_modificada: N es inosina
(C) POSICIÓN: 18

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 3:

TGCTGTTTCC GNGTNACNAA CAAA

24

(2) INFORMACIÓN RELATIVAS A LA SEC ID nº 4:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) NÚMERO DE CADENAS: una
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)
(iii) HIPOTÉTICA: SÍ
(iii) ANTISENTIDO: SÍ
(ix) CARACTERÍSTICAS:

30

(A) DENOMINACIÓN/CLAVE: base_modificada: N es inosina
(B) POSICIÓN: 10

35 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) DENOMINACIÓN/CLAVE: base_modificada: N es inopina
(B) POSICIÓN: 16

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 4:

CATCTTGTCN GGCTTNATTT C

21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína quimioatrayente aislada capaz de atraer eosinófilos y de inducir acumulación eosinófila *in vitro* e *in vivo* y que no presenta sustancialmente ningún efecto atractivo para los neutrófilos *in vivo*, que consiste en o que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC. ID nº: 1, o un fragmento de dicha proteína quimioatrayente que conserva sus actividades biológicas.
- 10 2. Proteína quimioatrayente según la reivindicación 1, que consiste en o que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se ha expuesto en la SEC. ID nº: 1.
- 15 3. Procedimiento para la producción de una proteína quimioatrayente según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende el cultivo *in vitro* de macrófagos, linfocitos, mastocitos, células epiteliales de las vías respiratorias o células de tejido conectivo, y el aislamiento de las células o del fluido del cultivo celular de una fracción que demuestra actividad quimioatrayente de eosinófilos *in vitro* e *in vivo* y que no presenta sustancialmente ningún efecto atractivo para los neutrófilos *in vivo*.
- 20 4. Anticuerpo que se une específicamente a la proteína quimioatrayente según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 25 5. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. Anticuerpo según la reivindicación 4 o 5, para su utilización como medicamento o en diagnóstico.
7. Utilización de un anticuerpo según la reivindicación 4 o 5, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del asma o de otra enfermedad inflamatoria.
8. Utilización según la reivindicación 7, para el tratamiento de la rinitis o del eccema.
- 30 9. Preparación farmacéutica que comprende, como principio activo, un anticuerpo según la reivindicación 4 o 5, mezclado o junto con un vehículo farmacéuticamente adecuado.
- 35 10. Inmunoanálisis para un antígeno, caracterizado porque el antígeno es una proteína quimioatrayente según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 40 11. Inmunoanálisis para un anticuerpo, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo que forma un complejo con una proteína quimioatrayente según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
12. Método de ensayo de un compuesto para un efecto inhibitor sobre la actividad de una citocina quimioatrayente *in vitro*, caracterizado porque la citosina quimioatrayente es una proteína quimioatrayente según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
13. Procedimiento para la preparación de un anticuerpo según la reivindicación 4 o 5, que comprende la utilización de una proteína quimioatrayente según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

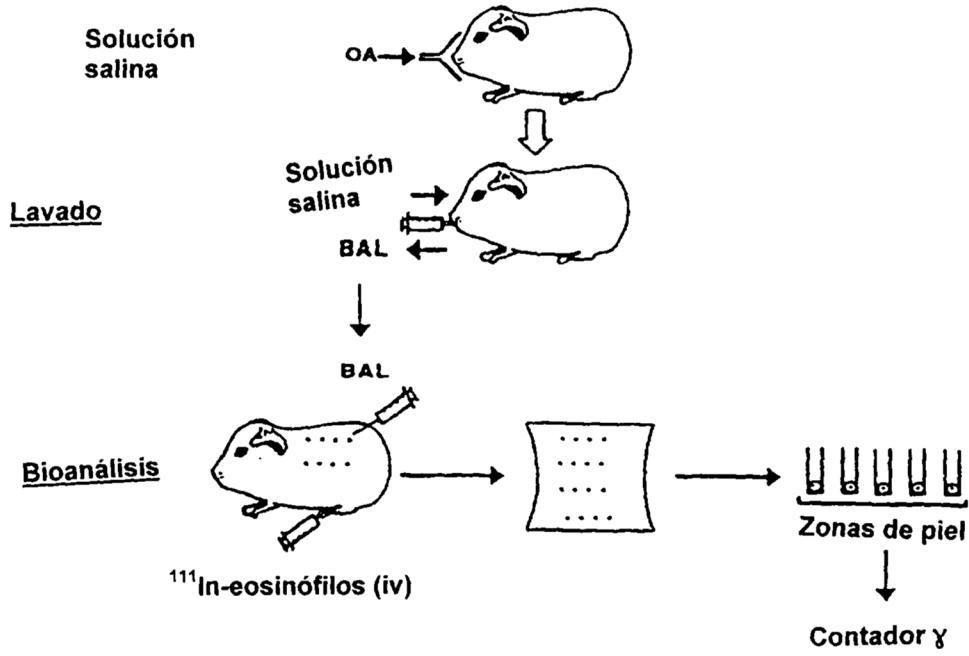


Figura 1

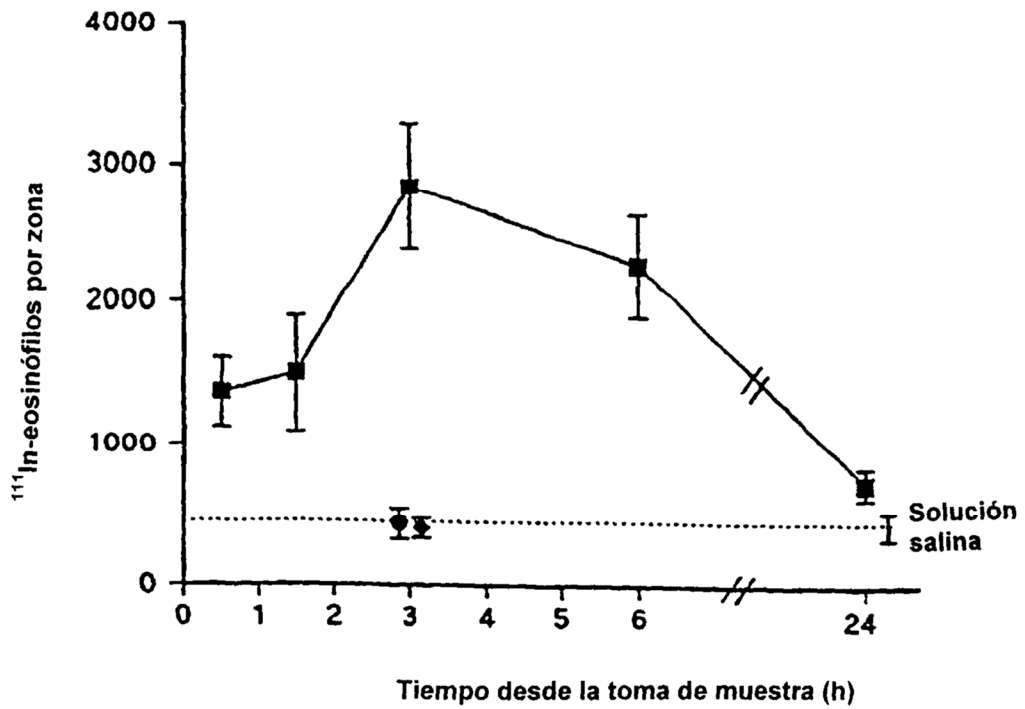


Figura 2

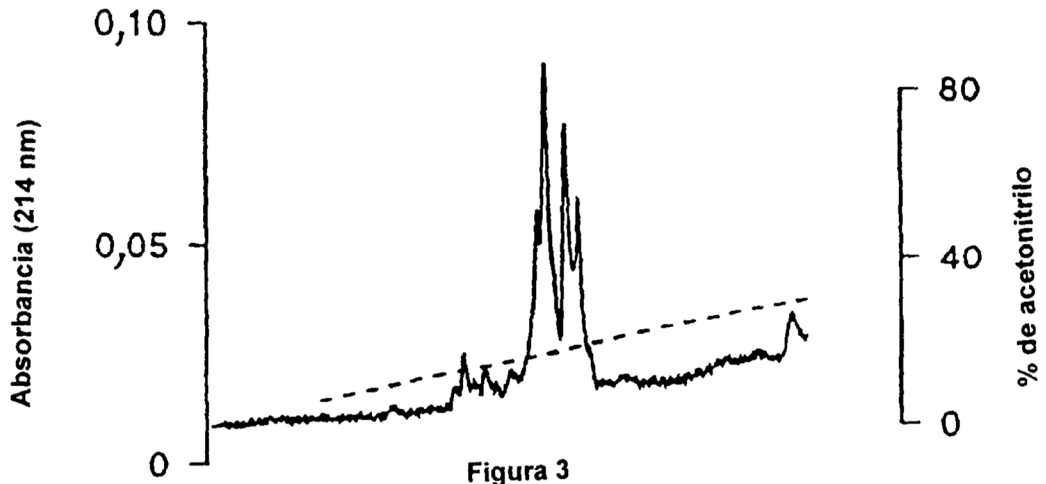


Figura 3

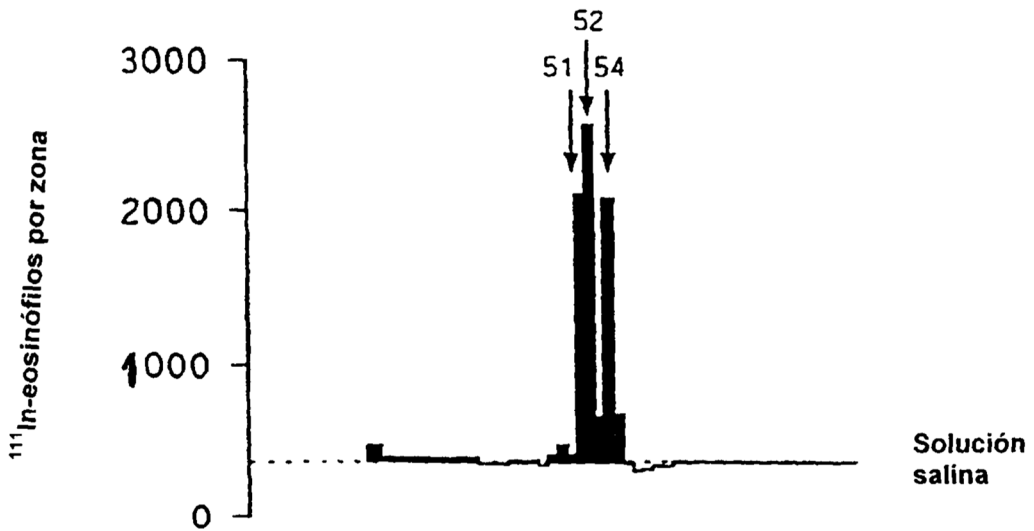


Figura 4

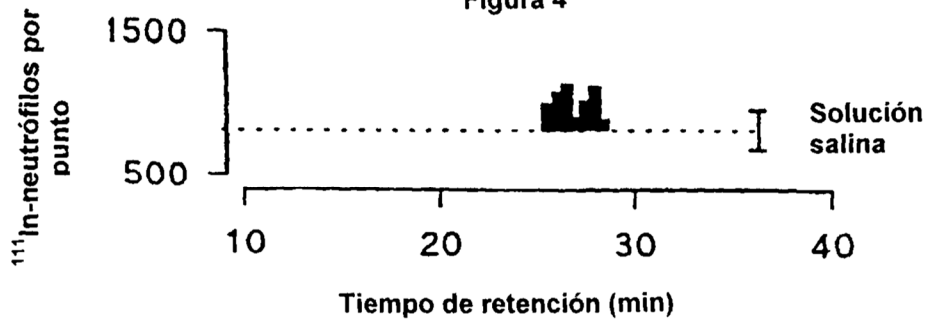


Figura 5

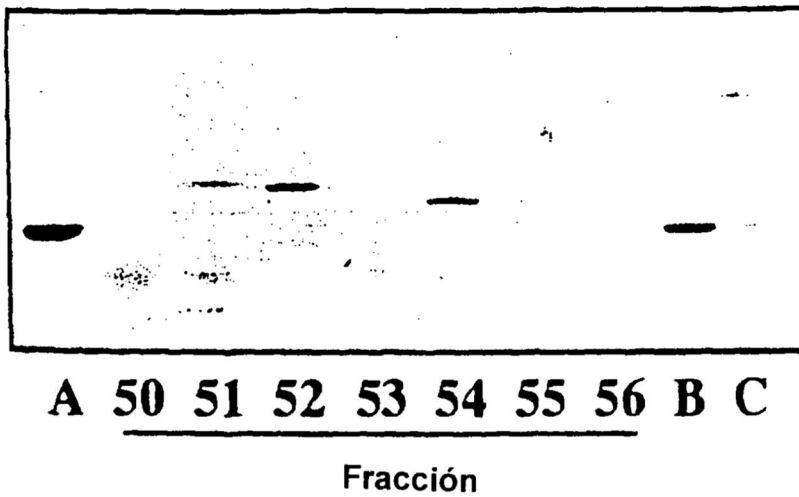


Figura 6

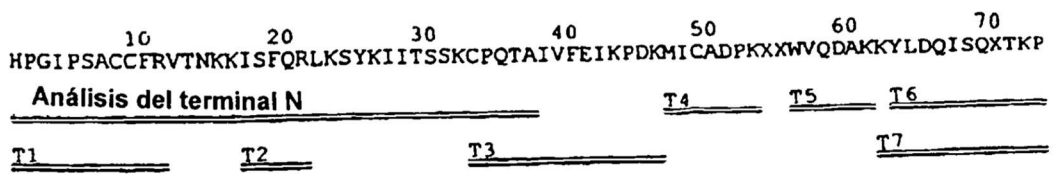


Figura 7

10 20 30 40 50 60 70
HPGIPSAACFRVTNKKISFORLKSYSKIITSSKCPQTAIVFEIKPDKMICADPKKXWVQDAKKYLDQISQTTKP

Figura 8

HPGIPSAACFRVTNKKISFORLKSYSKIITSSKCPQTAIVFEIKPDKMICADPKKXWVQDAKKYLDQISQTTKP
OPDAINAEVTCYNFNRKIEVORLASVRRITSSKCEKAVIEKTI VAKETCADPKOKWVQDSMDHLDKOTQTPET
DSVSEHITOCNWINRKEPIORLESYTRFNIQORKEAVIEKTIKRGKEVCADPKERURDSMDHLDOTFONLE
KSTTCGYLFINKKEPKORLESYRRITSSHCERAVIE K DEICADPTQKVVQDFMCHLDKKTQTPEL
GVNTE TOGYTF MKQIPLKVEGERTSSRCQKAVIEKTLKNEVCADPTQKVVQDYIAKTCORTQOKON
SLAADTETKOTSYESROEPONFIADY FETKQVSKPGVIELTERSRQVCADESEENVOYKVSDELSA
PMGSDPETACCESYFARKLPRNFVVDY YETSLCSQPAVVEQTKRSEQVCADESESTVQYVYDEELN
SPYSSDTTFCCTAYIARPLPRAHIKEY FYRGGKSNPAVVEVTRKNRQVCANFEKKNVREYINSLEMS

Figura 9

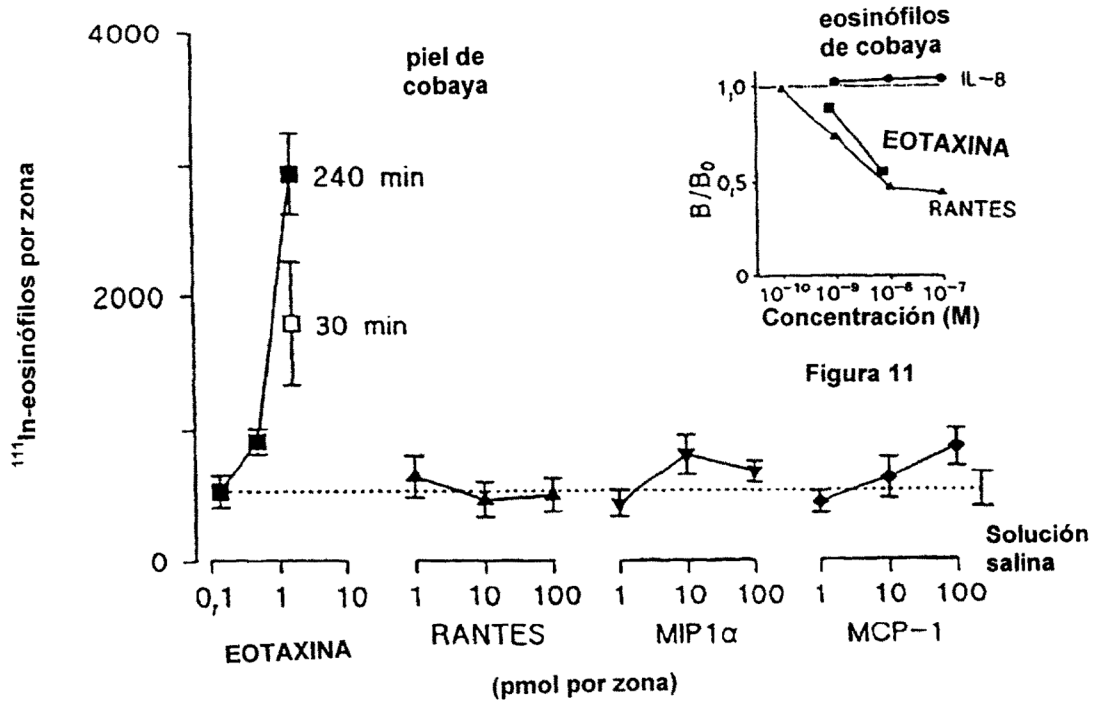


Figura 10

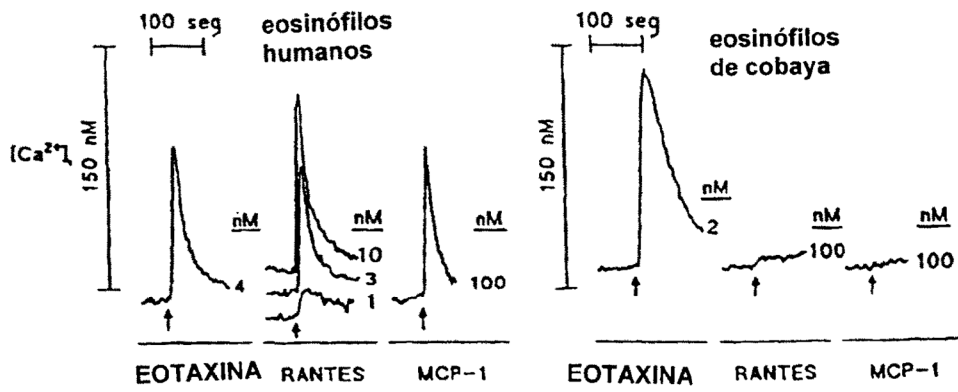


Figura 12

Figura 13

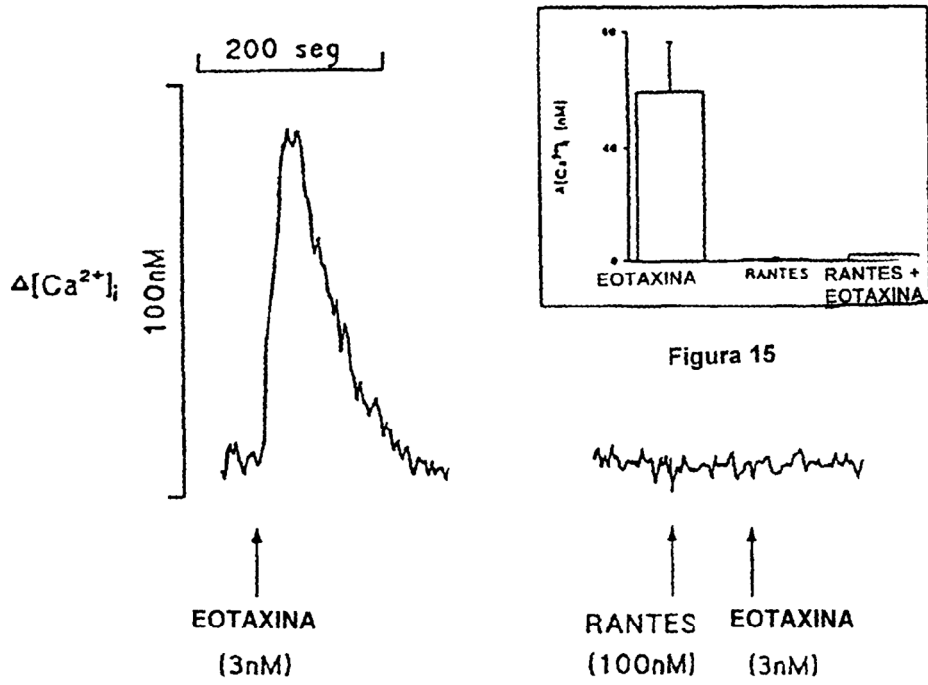


Figura 14

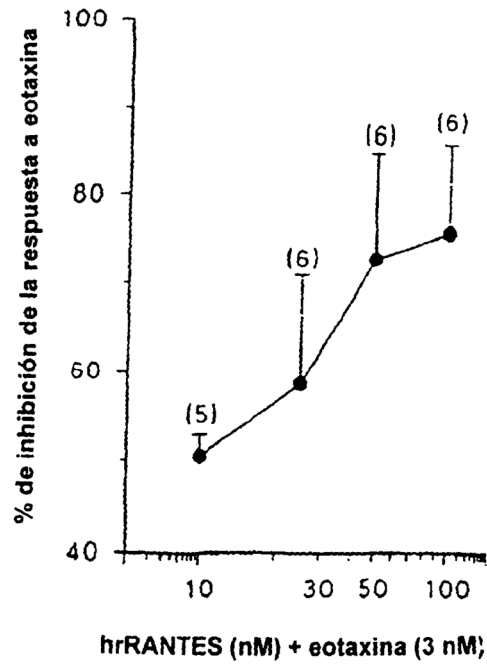


Figura 16

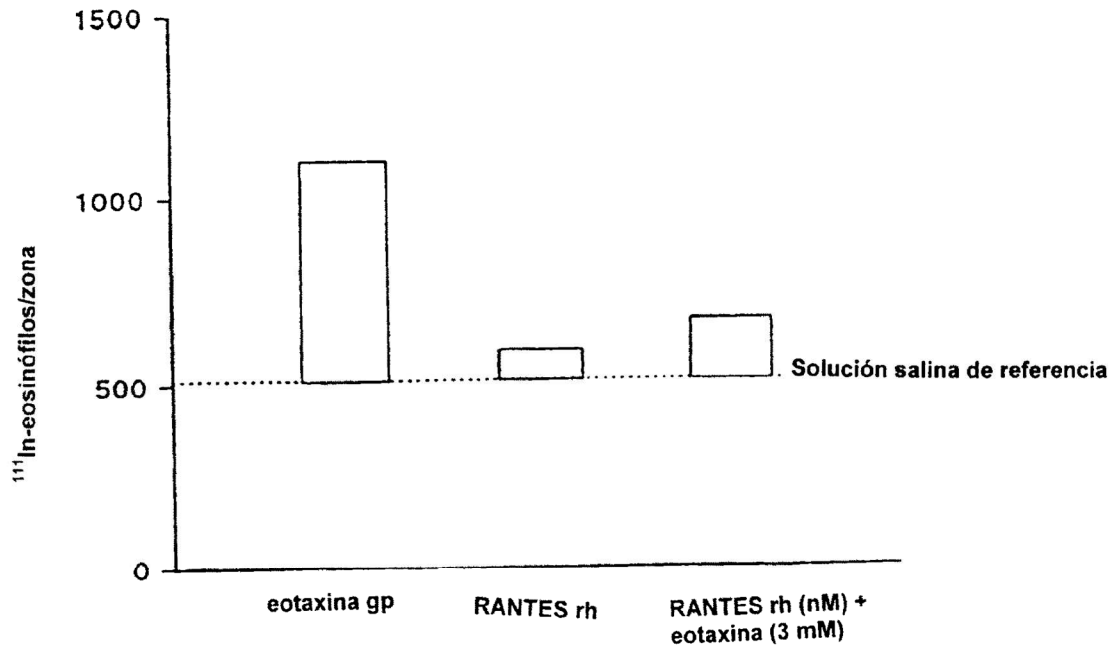


Figura 17

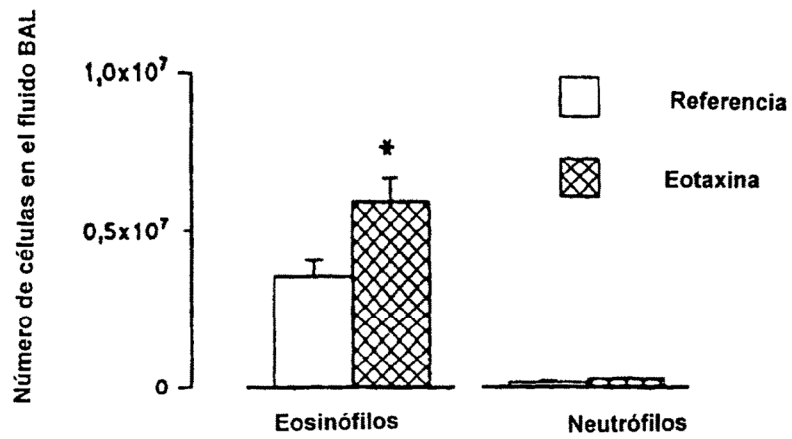


Figura 18