



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 205**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99968543 .1**

86 Fecha de presentación : **23.12.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1140174**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

54

Título: **Anticuerpos antagonistas de quimiocina de atracción de células T cutáneas (CTACK) o quimiocinas de contractor intestinal vasoactivo (Vic).**

30

Prioridad: **24.12.1998 US 113858 P**
27.05.1999 US 322580

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73

Titular/es: **SCHERING CORPORATION**
2000 Galloping Hill Road
Kenilworth, New Jersey 07033-0530, US

72

Inventor/es: **Wang, Wei;**
Oldham, Elizabeth, R.;
Soto, Hortensia;
Lui, Ying;
Hudak, Susan, A.;
Homey, Bernhard;
Morales, Janine, M.;
Kellermann, Sirid-Aimee;
McEvoy, Leslie, M. y
Zlotnik, Albert

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Anticuerpos antagonistas de quimocina de atracción de células T cutáneas (CTACK) o quimiocinas de contractor intestinal vasoactivo (Vic).

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones relacionadas con proteínas que actúan en el control de la fisiología, el desarrollo y/o la diferenciación de las células de mamíferos. En particular, proporciona proteínas que están implicadas en la regulación de la fisiología, el desarrollo, la diferenciación o la función de diversos tipos de células, p. ej., quimiocinas, receptores transmembrana 7, reactivos relacionados con cada uno de ellos, p. ej., anticuerpos o los ácidos nucleicos que los codifican, y sus usos. También proporciona métodos para el uso de las diversas composiciones de quimiocinas, y las composiciones usadas para ello, y más en particular, métodos para tratar enfermedades o trastornos cutáneos asociados a la regulación incorrecta de las quimiocinas CTACK y/o Vic.

Antecedentes

El sistema inmunitario consiste en una amplia variedad de distintos tipos de células, cada uno con importantes funciones que desempeñar. Véase Paul (ed. 1997) *Fundamental Immunology* 4ª ed., Raven Press, Nueva York. Los linfocitos ocupan una posición central, porque son las células que determinan la especificidad de la inmunidad, y es su respuesta la que organiza las ramas efectoras del sistema inmunitario. Se reconocen dos clases generales de linfocitos: los linfocitos B, que son los precursores de las células secretoras de anticuerpos, y los linfocitos T (dependientes del timo). Los linfocitos T expresan funciones reguladoras importantes, tales como la capacidad de promover o inhibir el desarrollo de tipos específicos de respuestas inmunitarias, que incluyen la producción de anticuerpos y la actividad microbicida incrementada de los macrófagos. Otros linfocitos T están implicados en funciones efectoras directas, tales como la lisis de células infectadas por virus o de ciertas células neoplásicas.

Las quimiocinas son una superfamilia grande y variada de proteínas. La superfamilia se subdivide en dos ramas clásicas, basándose en si las dos primeras cisteínas del motivo de quimiocina son adyacentes (denominada rama "C-C"), o si están espaciadas mediante un residuo intermedio ("C-X-C"). Una rama identificada más recientemente de quimiocinas carece de las dos cisteínas en el motivo correspondiente, y está representada por las quimiocinas conocidas como linfotactinas. Otra rama identificada recientemente tiene tres residuos intermedios entre las dos cisteínas, p. ej., quimiocinas CX3C. Véase, p. ej., Schall y Bacon (1994) *Current Opinion in Immunology* 6:865-873; y Bacon y Schall (1996) *Int. Arch. Allergy & Immunol.* 109:97-109.

Se han identificado muchos factores que influyen en el proceso de diferenciación de las células precursoras, o que regulan la fisiología o las propiedades de migración de tipos celulares específicos. Estas observaciones indican que existen otros factores cuyas funciones en la función inmunitaria no se han reconocido hasta ahora. Estos factores proporcionan actividades biológicas cuyo espectro de efectos puede ser distinto del de los factores de diferenciación o activación conocidos. La falta de conocimiento sobre las propiedades estructurales, biológicas y fisiológicas de los factores reguladores que regulan la fisiología celular *in vivo* impide la modulación de los efectos de tales factores. Así, los estados médicos en los que es necesaria la regulación del desarrollo o de la fisiología de células relevantes siguen sin ser controlables.

Resumen de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de diversas moléculas de unión de quimiocina para los receptores transmembrana 7, y en el descubrimiento sorprendente de que las quimiocinas CTACK y Vic se expresan en las células cutáneas. Se ha demostrado que tienen efectos sobre las células inmunitarias relacionadas con la salud dermatológica.

La presente invención se refiere, p. ej., a métodos de modulación del movimiento de una célula dentro o hacia la piel de un mamífero, y el método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de: un antagonista de CTACK; o un antagonista de Vic. También se describen métodos que comprenden administrar una cantidad eficaz de un agonista de CTACK o de un agonista de Vic. A menudo, en el método, la modulación es el bloqueo y la administración es un antagonista de CTACK o Vic, p. ej., en el que: el movimiento es: dentro de la piel, quimiotáctico o quimiocinético; la administración es local, tópica, subcutánea, intradérmica o transdérmica; la administración es un antagonista de CTACK o Vic; la célula es una célula CLA+, una célula T, una célula dendrítica, o un precursor de célula dendrítica, o la célula se mueve hacia las capas de la dermis y/o epidermis de la piel. En particular, tal método será uno en el que: el antagonista se selecciona de una muteína de CTACK o Vic natural, un anticuerpo que neutraliza CTACK o Vic, o un anticuerpo que bloquea la unión del ligando a GPR2; el mamífero es objeto de un trasplante o injerto de piel; o el antagonista se administra en combinación con un antibiótico, analgésico, compuesto terapéutico inmunosupresor, fármaco antiinflamatorio, factor de crecimiento o agente inmunoadyuvante.

En otros métodos descritos aquí, la modulación es la atracción y la administración es un agonista de CTACK o Vic. En ciertas realizaciones, el movimiento es: dentro de la piel, quimiotáctico o quimiocinético; la administración es local, tópica, subcutánea, intradérmica o transdérmica; la administración es un ligando de CTACK o Vic; la célula es una célula CLA+, una célula T, una célula dendrítica, o un precursor de célula dendrítica; o la célula se mueve hacia

las capas de la dermis y/o epidermis de la piel. Habrá ciertos métodos preferidos en los que el agonista se selecciona de CTACK o Vic, o un ligando de GPR2; el mamífero es objeto de una lesión cutánea; o el agonista se administra en combinación con un antibiótico, analgésico, agente terapéutico inmunosupresor, fármaco antiinflamatorio, factor de crecimiento o agente inmunoadyuvante.

Otros aspectos de la invención incluyen métodos de identificación de células que expresan un receptor para CTACK o Vic, que comprenden permitir que una célula migre hacia CTACK o Vic, en el que se identifica que dicha célula expresa el receptor si ésta migra. Las formas particulares incluyen aquellas en las que la puesta en contacto da como resultado el movimiento específico de las células hacia un sitio para la purificación, p. ej., a través de los poros de una membrana.

La invención también proporciona métodos *in vitro* de producción de un complejo ligando:receptor, que comprenden poner en contacto: un CTACK de mamífero con un receptor GPR2; o un Vic de mamífero con un receptor GPR2; en el que al menos uno del ligando o el receptor es recombinante o purificado, por lo que permite que se forme el complejo. En tales métodos se incluyen aquellos en los que: el complejo da como resultado un flujo de Ca^{++} ; el receptor GPR2 está en una célula; la formación del complejo da como resultado un cambio fisiológico en la célula que expresa el receptor GPR2; la puesta en contacto se da en combinación con IL-2 y/o interferón- α ; o la puesta en contacto permite la detección cuantitativa del ligando.

Además, se describen métodos de modulación de la fisiología o del desarrollo de una célula que expresa GPR2, que comprenden poner en contacto la célula con un agonista o antagonista de Vic o CTACK de mamífero, en el que uno del receptor GPR2 o del agonista o del antagonista es recombinante o purificado. Esto incluirá aquellos en los que: el antagonista es: un anticuerpo que: neutraliza el Vic de mamífero, neutraliza el CTACK de mamífero, o bloquea la unión del ligando a GPR2; o una muteína de Vic o CTACK; o la fisiología se selecciona de: un flujo de calcio celular; una respuesta quimioatrayente; una respuesta de modificación de la morfología celular; recambio de lípidos de fosfatidilinositol; o una respuesta antiviral. Dentro de tales métodos están aquellos en los que: el antagonista es un anticuerpo y la fisiología es una respuesta quimioatrayente; o la modulación es el bloqueo, y la fisiología es una respuesta inflamatoria.

Se proporcionan métodos de ensayo, p. ej., el ensayo de un compuesto en función de su capacidad para afectar a la interacción receptor GPR2-ligando, y el método comprende comparar la interacción de GPR2 con Vic o CTACK en presencia y ausencia del compuesto. Entre tales métodos están aquellos en los que el compuesto es un anticuerpo contra GPR2, Vic o CTACK.

La invención también proporciona el uso de un anticuerpo antagonista de CTACK o Vic para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar la inflamación cutánea en un mamífero.

También se describen diversas composiciones de GPR2, p. ej., un GPR2 de primate, que comprende la secuencia MGTEVLEQ (véase la ID SEC N°: 2); un GPR2 de roedor (véase la ID SEC N°: 4); un ácido nucleico que codifica el GPR2 de la ID SEC N°: 2 ó 4; o un anticuerpo que se une de forma selectiva a MGTEVLEQ (véase la ID SEC N°: 2).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. General

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento sorprendente de que las quimiocinas CTACK y Vic desempeñan un papel en la inmunidad de la piel. La piel consiste en una capa superficial de epitelio denominada epidermis y una capa subyacente de tejido conectivo llamada dermis. Debajo de la dermis hay una capa que contiene grandes cantidades de tejido adiposo, la hipodermis. La piel cumple una diversidad de funciones, y las variaciones en el carácter de la dermis y de la epidermis ocurren según las necesidades funcionales. Los anejos de la piel, pelo, uñas y glándulas sudoríparas y sebáceas, son las especializaciones locales de la epidermis. Juntos, la piel y sus anejos forman el integumento. Véase, p. ej., Fitzpatrick, *et al.* (eds. 1993) *Dermatology in General Medicine* 4ª ed., McGraw-Hill, NY; Bos (ed. 1989) *Skin Immune System* CRC Press, Boca Raton, FL; Callen (1996) *General Practice Dermatology*, Appleton y Lange; Rook, *et al.* (eds. 1998) *Textbook of Dermatology* Blackwell; Habifor y Habie (1995) *Clinical Dermatology: A Color Guide to Diagnosis and Therapy* Mosby; y Grob (ed. 1997) *Epidemiology, Causes and Prevention of Skin Diseases* Blackwell.

La epidermis consiste en muchos tipos celulares diferentes en diversas proporciones. El tipo celular más prevalente son los queratinocitos, que constituyen alrededor del 95% de las células. Las células en el intervalo del 1-2% incluyen los melanocitos y las células de Langerhans. Las células de Langerhans son particularmente importantes porque retienen los antígenos que han penetrado en la piel, y transportan los antígenos a los ganglios linfáticos regionales. Una pequeña población de células T $\gamma\delta$ puede residir también en epidermis.

La dermis varía en grosor en las diferentes regiones del organismo. Es fuerte, flexible y sumamente elástica, y consiste en una red de fibras de colágeno con abundantes fibras elásticas. El tejido conectivo está dispuesto en la capa reticular profunda y la capa papilar superficial.

Además, la invención proporciona combinaciones quimiocina-receptor de quimiocinas con un receptor transmembrana 7. Véase, p. ej., Ruffolo y Hollinger (eds. 1995) *G-Protein Coupled Transmembrane Signaling Mechanisms* CRC Press, Boca Raton, FL; Watson y Arkinstall (1994) *The G-Protein Linked Receptor FactsBook* Academic Press, San Diego, CA; Peroutka (ed. 1994) *G Protein-Coupled Receptors* CRC Press, Boca Raton, FL; Houslay y Milligan (1990) *G-Proteins as Mediators of Cellular Signaling Processes* Wiley and Sons, Nueva York, NY. Aquí se describen realizaciones en humano y ratón.

Entre los muchos tipos de ligandos que intervienen en procesos biológicos a través de los receptores transmembrana 7 están las quimiocinas y ciertas proteasas. Las quimiocinas desempeñan un papel importante en las respuestas inmunitarias e inflamatorias induciendo la migración y la adhesión de los leucocitos. Véase, p. ej., Schall (1991) *Cytokine* 3:165-183; y Thomson (ed.) *The Cytokine Handbook* Academic Press, NY. Las quimiocinas son secretadas por los leucocitos activados y actúan como quimioatrayentes para una diversidad de células que están implicadas en la inflamación. Además de las propiedades quimioatrayentes, se ha demostrado también que las quimiocinas inducen otras respuestas biológicas, p. ej., la modulación de los niveles de segundos mensajeros tales como Ca^{++} ; cambios en la reserva de fosfato de inositol (véase, p. ej., Berridge (1993) *Nature* 361:315-325 o Billah y Anthes (1990) *Biochem. J.* 269:281-291); respuestas de modificación de la morfología celular; recambio de lípidos de fosfatidilinositol, posibles respuestas antivirales; y otros. Así, las quimiocinas proporcionadas aquí pueden, solas o en combinación con otros reactivos terapéuticos, tener efectos combinados ventajosos.

Además, hay razones para sugerir que las quimiocinas pueden tener efectos sobre otros tipos de células, p. ej., atracción o activación de monocitos, células dendríticas, células T, eosinófilos, basófilos y/o neutrófilos. También pueden tener efectos quimioatrayentes sobre diversas células neuronales que incluyen, p. ej., neuronas de los ganglios de la raíz dorsal en el sistema nervioso periférico y/o neuronas del sistema nervioso central.

Los receptores acoplados a proteína G, p. ej. los receptores de quimiocinas, son importantes en los mecanismos de transducción de señales mediados por sus ligandos. Son marcadores útiles para distinguir las poblaciones celulares, y se les ha identificado como receptores específicos para infecciones retrovirales.

La superfamilia de quimiocinas se dividió de manera clásica en dos grupos que exhibían motivos estructurales característicos, las familias Cys-X-Cys (C-X-C) y Cys-Cys (C-C). Estas se distinguían basándose en la inserción de un único aminoácido entre el par NH-proximal de residuos de cisteína y la similitud de secuencias. Típicamente, las quimiocinas C-X-C, es decir, IL-8 y MGSA/Gro- α , actúan sobre los neutrófilos pero no sobre los monocitos, mientras las quimiocinas C-C, es decir, MIP-1 α y RANTES, son quimioatrayentes potentes para los monocitos y los linfocitos, pero no para los neutrófilos. Las quimiocinas CC son eficaces preferentemente sobre los macrófagos, linfocitos y eosinófilos. Véase, p. ej., Miller, *et al.* (1992) *Crit. Rev. Immunol.* 12:17-46. Una quimiocina recientemente aislada, linfotactina, no pertenece a ningún grupo y puede constituir el primer miembro de una tercera familia de quimiocinas, la familia C. Linfotactina no tiene un motivo característico CC o CXC, y actúa sobre los linfocitos pero no sobre los neutrófilos y monocitos. Véase, p. ej., Kelner *et al.* (1994) *Science* 266:1395-1399. Esta quimiocina define una nueva familia C de quimiocinas. Aún más recientemente se ha identificado otra quimiocina que exhibe un motivo CX3C, lo que establece una cuarta clase estructural.

La quimiocina GWCC, de ratón y humano, se ha descrito anteriormente en el documento WO 98/23750, que se incorpora aquí como referencia para todos los fines. Basándose en las nuevas observaciones dirigidas a la biología de esta quimiocina, se denomina aquí quimiocina atrayente de células T cutáneas o CTACK. Las secuencias se proporcionan en las ID SEC N°s 11 y 12 (primate) y en las ID SEC N°s 13 y 14 (ratón), y se han depositado en las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ con los números de acceso AF082392 (CTACK de ratón) y AF082393 (CTACK de humano). Los clones de CTACK de humano y de ratón se cartografiaban en regiones cromosómicas sinténicas, el segmento humano 9p13 y la región proximal del cromosoma 4 de ratón, respectivamente. Las quimiocinas C-C con la mayor similitud a CTACK (6Ckine, y MIP-3 β) también se cartografiaban en estas regiones cromosómicas. De manera similar, se describe la quimiocina Vic. Se proporciona una realización de humano de una quimiocina de primate designada Vic en las ID SEC N°s 5 y 6 (el sitio de escisión predicho está alrededor del enlace peptídico ala(-1) - ile(1)). El término "Vic" abarcará otros homólogos de primate. Se proporciona una variante humana en las ID SEC N°s 7 y 8. Se proporciona un homólogo de roedor (ratón) en las ID SEC N°s: 9 y 10. La quimiocina Vic exhibe una biología similar a CTACK, pero es ligeramente diferente, p. ej., en la expresión en las placas de Peyer del intestino delgado, una segunda superficie epitelial respecto del exterior topológico, y que tiene un patrón de expresión más regulado, p. ej., aumento en la psoriasis.

Las quimiocinas o los receptores descritos deberían ser importantes para intervenir en diversos aspectos de la fisiología o del desarrollo celular, de los órganos, de los tejidos o de los organismos. En particular, la quimiocina Vic es una quimiocina proinflamatoria clásica que interviene en procesos inflamatorios. CTACK es una quimiocina expresada de forma cutánea. Véase, p. ej., el documento de EE.UU. de n° de serie 08/978.964 y los casos relacionados.

En contraste con los linfocitos vírgenes, los linfocitos memoria/efectores pueden acceder a sitios efectores no linfoides y exhibir un comportamiento de migración restringido, a menudo selectivo de tejido. El antígeno asociado a linfocitos cutáneos (CLA) define un subgrupo bien descrito de células T memoria circulantes que se localizan de forma selectiva en sitios cutáneos, en parte mediante la interacción de CLA con su ligando vascular E-selectina. Picker, *et al.* (1991) *Nature* 349:796-799; y Rossiter, *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:205-210. E-selectina se expresa en general en el endotelio inflamado; así, la infiltración específica de la piel por células CLA⁺ debe requerir señales

adicionales. Aquí está la descripción de quimiocinas C-C particulares, una originariamente designada GWCC pero aquí denominada CTACK, y la otra Vic. Véanse los documentos de EE.UU. de nº de serie 08/978.964 o WO 98/23750, que se incorporan aquí como referencia para todos los fines.

5 Basándose en la nueva información dirigida a la función, una quimiocina se denomina aquí quimiocina atrayente de células T cutáneas o CTACK. CTACK tanto de humano como de ratón se detecta exclusivamente en la piel, específicamente en la epidermis de ratón y en los queratinocitos humanos. El mensaje de CTACK se incrementa en los queratinocitos tras tratamiento con citocinas proinflamatorias. CTACK atrae de forma selectiva a las células T memoria CLA⁺, y también tiene efectos sobre las células dendríticas de la piel (células de Langerhans) y sus precursores. La quimiocina Vic tiene características similares, pero también se expresa en el intestino y a veces está aumentada. Estas características sugieren un papel importante para CTACK y/o Vic en el reclutamiento de células T CLA⁺ y de células dendríticas hacia los sitios cutáneos. CTACK es la primera quimiocina descrita que se expresa específicamente en la piel y que atrae de forma selectiva a una subpoblación específica de tejido de linfocitos memoria.

15 Al haberse identificado CTACK y Vic como quimiocinas relacionadas con la piel, tendrán utilidad para influir en las anomalías médicas de la piel. Los trastornos cutáneos comunes que implican al sistema inmunitario incluyen psoriasis, cánceres cutáneos, carcinomas, inflamación, alergias, dermatitis, cicatrización, infecciones (tanto microbianas como parasitarias), y muchos otros. Véase, p. ej., *The Merck Manual*, en particular el capítulo sobre trastornos dermatológicos. Estos agentes terapéuticos pueden tener efectos útiles sobre el crecimiento o la salud de los anejos de la piel, que incluyen, p. ej., pelo, uñas y glándulas sudoríparas y sebáceas.

La psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica que está asociada a queratinocitos epidérmicos hiperplásicos y células mononucleares infiltrantes, que incluyen células T memoria CD4⁺, neutrófilos y macrófagos. Debido a este cuadro inflamatorio sumamente mezclado y a las interrelaciones complejas resultantes entre estas diferentes células, ha sido muy difícil analizar minuciosamente los mecanismos que subyacen en la inducción y la progresión de la enfermedad.

Esta hipótesis también implica que aunque pueden preexistir células T autorreactivas latentes en los individuos susceptibles, es necesario un estímulo ambiental para desencadenar la inducción de la enfermedad. Otros creen que el sistema inmunitario desempeña solamente un papel modulador menor en el proceso de la enfermedad y que la hiperproliferación de los queratinocitos es, de hecho, el suceso iniciador en un hospedador genéticamente susceptible. La investigación de la patogénesis de la psoriasis ha estado dificultada durante mucho tiempo por la carencia de modelos animales adecuados.

35 Existen datos crecientes que indican que las células T, y no los queratinocitos, son el componente patógeno principal en la enfermedad. Las presentes observaciones proporcionan pruebas que apoyan el concepto de que los trastornos similares a psoriasis pueden ser el resultado, de hecho, de respuestas de células T sin regular.

Además, los cánceres cutáneos, tales como el carcinoma basocelular y el carcinoma espinocelular, están entre las neoplasias malignas más comunes. Véase, p. ej., Miller y Maloney (eds. 1997) *Cutaneous Oncology: Pathophysiology, Diagnosis, and Management* Blackwell; Emmett y O'Rourke (1991) *Malignant Skin Tumours* Churchill Livingstone; Friedman (1990) *Cancer of the Skin* Saunders. La mayoría de esos tumores surgen en áreas de la piel expuestas al sol. La regulación o remisión inmunitaria de tales tumores puede depender de la función del sistema inmunitario de la piel. Las células que efectúan tales procesos pueden estar comprometidas por una regulación incorrecta o una supresión local. CTACK o Vic o los antagonistas pueden interrumpir una homeostasis temporal que inhibe la respuesta inmunitaria normal, por lo que llevan a la activación de rutas reguladoras e inmunitarias correctas.

La dermatitis es una inflamación superficial de la piel, caracterizada por vesículas (cuando es aguda), eritema, edema, exudado, formación de costras, descamación y prurito. Véase, p. ej., Lepoittevin (ed. 1998) *Allergic Contact Dermatitis: The Molecular Basis* Springer-Verlag; Rietschel y Fowler (eds. 1995) *Fisher's Contact Dermatitis* Lippincott; y Rycroft, et al. (eds. 1994) *Textbook of Contact Dermatitis* Springer-Verlag. La expresión dermatitis eccematosa se usa a menudo para referirse a una dermatitis vesicular. La dermatitis puede acompañar a diversos trastornos o enfermedades por inmunodeficiencias, trastornos metabólicos congénitos, o enfermedades por deficiencias nutricionales. Algunos de los síntomas de tales trastornos se pueden tratar mediante el uso de la presente invención.

55 El prurito es una sensación que el paciente intenta aliviar mediante rascado. Véase, p. ej., Fleischer y Fleischer (1998) *The Clinical Management of Itching: Therapeutic Protocols for Pruritus* Parthenon. Muchos trastornos parasitarios o infecciosos pueden dar como resultado estos síntomas, y dichos trastornos se pueden hacer remitir mediante la reactivación o inhibición correcta de las funciones inmunitarias de la piel. De forma similar para diversas reacciones alérgicas u otras reacciones inmunitarias a la exposición a diversos antígenos alérgicos o inflamatorios.

65 Vic y CTACK se unen y señalizan a través del receptor común GPR-2, como se demuestra por su capacidad para inducir la quimiotaxis en células transfectadas con cADN de GPR-2, pero no en células sin transfectar o en células transfectadas con GPR-2 truncado (carente de los 8 aminoácidos terminales). Estas quimiocinas comparten un receptor en las células T CLA⁺, como se demostró mediante el hallazgo de que son capaces de desensibilizar mutuamente la respuesta quimiotáctica.

Tanto Vic como CTACK atraen químicamente de forma selectiva a las células T memoria CLA+ de migración a la piel y no a otros subgrupos de células T memoria, que incluyen las células T $\beta 7+$ de migración al intestino. Ni CTACK ni Vic atraen células T vírgenes, células B o monocitos.

5 II. Quimiocinas purificadas; receptores

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias derivadas de aminoácidos de un receptor de quimiocinas designado GPR2 se muestran en las ID SEC N°s: 1 y 2 (humano) y en las ID SEC N°s: 3 y 4 (ratón). La expresión abarcará otros homólogos de primate y de roedor. Se pueden usar secuencias complementarias de ácidos nucleicos para muchos fines, p. ej., en un par de cebadores de PCR o como un cebador de mutagénesis. Se pueden usar fragmentos de la secuencia nucleotídica como sondas de hibridación o como cebadores de PCR, o para codificar péptidos antigénicos. Los fragmentos del polipéptido serán útiles como péptidos antigénicos. De forma similar para las otras secuencias génicas. Los genes codifican proteínas nuevas que exhiben estructuras y motivos característicos de un receptor de quimiocina. Véase Marchese, *et al.* (1994) *Genomics* 23:609-618. El ARNm de GPR-2 se expresa en las células T CLA+ pero no en otros subgrupos de células T memoria o en células T vírgenes; así, ya que se sabe que las células T CLA+ desempeñan un papel clave en la inflamación cutánea, cualquier método para bloquear la interacción de GPR2 con CTACK o Vic es un agente terapéutico potencialmente importante.

La presente invención ha relacionado el receptor de quimiocinas GPR2 con las quimiocinas Vic y CTACK.

Ciertas descripciones generales de las propiedades físicas de los polipéptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos, cuando se dirigen a una realización, claramente son aplicables normalmente a otras quimiocinas o receptores descritos aquí.

Estas secuencias de aminoácidos, proporcionadas de amino a carboxilo, son importantes para proporcionar información de secuencia sobre el ligando o receptor de quimiocina, por lo que permiten distinguir la proteína de otras proteínas, en particular las versiones que se dan de forma natural. Además, las secuencias permiten la preparación de péptidos para generar anticuerpos para reconocer y distinguir tales segmentos, y permiten la preparación de sondas oligonucleotídicas, y ambas son estrategias para el aislamiento, p. ej. clonado, de los genes que codifican tales secuencias, o secuencias relacionadas, p. ej., variantes polimórficas naturales o de otro tipo, que incluyen las proteínas de fusión. Las similitudes de las quimiocinas se han observado con otras quimiocinas. Véase, p. ej., Bosenberg, *et al.* (1992) *Cell* 71:1157-1165; Huang, *et al.* (1992) *Molecular Biology of the Cell* 3:349-362; y Pandiella, *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267:24028-24033. De forma similar para los receptores GPC.

Como se usa aquí, el término “GPR2” abarcará, cuando se use en el contexto de proteínas, una proteína que tiene una secuencia madura de aminoácidos como se muestra en las ID SEC N°s 1-4. La invención también abarca polipéptidos selectivos, p. ej., que comprenden un fragmento específico de tal proteína. La invención también abarca un polipéptido que es un homólogo de una especie primate, p. ej., que exhibe una secuencia similar, y es más homólogo en la secuencia codificante natural que otros genes de una especie primate. Típicamente, tal receptor de quimiocina interactuará también con sus componentes de unión específicos, p. ej., el ligando, o los anticuerpos que se unen a él. Estos componentes de unión, p. ej. anticuerpos, se unen típicamente al receptor de quimiocina con una afinidad elevada, p. ej., al menos alrededor de 100 nM, normalmente mejor que alrededor de 30 nM, preferiblemente mejor que alrededor de 10 nM, y más preferiblemente mejor que alrededor de 3 nM. Se aplican términos similares a los ligandos de quimiocina.

El término “polipéptido”, como se usa aquí, incluye un fragmento o segmento significativo, y abarca un tramo de residuos de aminoácidos de al menos alrededor de 8 aminoácidos, generalmente al menos 10 aminoácidos, más generalmente al menos 12 aminoácidos, a menudo al menos 14 aminoácidos, más a menudo al menos 16 aminoácidos, típicamente al menos 18 aminoácidos, más típicamente al menos 20 aminoácidos, normalmente al menos 22 aminoácidos, más normalmente al menos 24 aminoácidos, preferiblemente al menos 26 aminoácidos, más preferiblemente al menos 28 aminoácidos, y, en las realizaciones particularmente preferidas, al menos alrededor de 30 o más aminoácidos, p. ej., alrededor de 35, 40, 45, 50, 60, 75, 80, 100, 120, etc. Las proteínas similares comprenderán probablemente una pluralidad de tales segmentos. Tales fragmentos pueden tener extremos que comienzan y/o terminan virtualmente en todas las posiciones, p. ej., que comienzan en los residuos 1, 2, 3, etc., y que terminan en, p. ej., 69, 68, 67, 66, etc., en todos los pares combinatorios del segmento codificante. Los péptidos particularmente interesantes tienen extremos que corresponden a los límites de los dominios estructurales, p. ej., bucles intracelulares o extracelulares de las realizaciones del receptor. Tales péptidos serán típicamente péptidos inmunógenos, o se pueden concatenar para generar polipéptidos mayores. Los péptidos cortos se pueden unir o acoplar a un portador mayor.

La expresión “composición de unión” se refiere a moléculas que se unen con especificidad a la quimiocina o al receptor respectivo, p. ej., de una forma ligando-receptor o en una interacción anticuerpo-antígeno. Estas composiciones pueden ser compuestos, p. ej. proteínas, que se asocian de forma específica a la quimiocina o al receptor, que incluyen interacciones proteína-proteína naturales fisiológicamente relevantes, covalentes o no covalentes. La composición de unión puede ser un polímero u otro reactivo químico. No existe necesariamente ninguna implicación en cuanto a si la quimiocina presenta una forma cóncava o convexa en su interacción ligando-receptor, aparte de que la interacción exhiba una especificidad similar, p. ej., afinidad específica. Un análogo funcional puede ser un ligando con modificaciones estructurales, o puede ser una molécula completamente no relacionada, p. ej., que tiene una forma molecular que interacciona con los determinantes de unión apropiados del ligando. Los ligandos pueden servir como agonistas o

antagonistas de un receptor fisiológico o natural, véase, p. ej., Goodman, *et al.* (eds. 1990) *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics* (8ª ed.), Pergamon Press. La expresión incluye expresamente los anticuerpos, policlonales o monoclonales, que se unen de forma específica al antígeno respectivo.

5 Sustancialmente puro significa que la proteína está exenta de otras proteínas, ácidos nucleicos y/o otros productos biológicos contaminantes derivados típicamente del organismo de origen. La pureza se puede determinar mediante métodos estándar, y será habitualmente al menos alrededor del 40% de pureza, más habitualmente al menos alrededor del 50% de pureza, generalmente al menos alrededor del 60% de pureza, más generalmente al menos alrededor del 70% de pureza, a menudo al menos alrededor del 75% de pureza, más a menudo al menos alrededor del 80% de pureza, típicamente al menos alrededor del 85% de pureza, más típicamente al menos alrededor del 90% de pureza, preferiblemente al menos alrededor del 95% de pureza, más preferiblemente al menos alrededor del 98% de pureza, y en las realizaciones más preferidas, al menos el 99% de pureza. Los análisis serán típicamente en peso, pero pueden estar en cantidades molares.

15 La solubilidad de un polipéptido o de un fragmento depende del medio y del polipéptido. Muchos parámetros afectan a la solubilidad del polipéptido, e incluyen la temperatura, el medio de electrolitos, el tamaño y las características moleculares del polipéptido, y la naturaleza del disolvente. Típicamente, la temperatura a la que se usa el polipéptido oscila de alrededor de 4°C a alrededor de 65°C. Normalmente, la temperatura de uso es mayor de alrededor de 18°C, y más normalmente mayor de alrededor de 22°C. Para fines de diagnóstico, la temperatura será normalmente aproximadamente la temperatura ambiente o más elevada, pero inferior que la temperatura de desnaturalización de los componentes del ensayo. Para fines terapéuticos, la temperatura será normalmente la temperatura corporal, típicamente alrededor de 37°C para humanos, aunque en ciertas situaciones la temperatura se puede elevar o disminuir *in situ* o *in vitro*.

25 Los electrolitos se aproximarán normalmente a las condiciones fisiológicas *in situ*, pero se pueden modificar a fuerzas iónicas superiores o inferiores cuando sea ventajoso. Se pueden modificar los iones precisos, p. ej., para ajustarse a los tampones estándar usados en los contextos fisiológicos o analíticos.

30 El tamaño y la estructura del polipéptido deberían estar en general en un estado sustancialmente estable, y normalmente no en un estado desnaturalizado, aunque en ciertas circunstancias la proteína desnaturalizada será importante. El polipéptido puede estar asociado con otros polipéptidos en una estructura cuaternaria, p. ej. para conferir solubilidad, o puede estar asociado con lípidos o detergentes de una manera que se aproxima a las interacciones en la bicapa lipídica natural.

35 El disolvente será normalmente un tampón biológicamente compatible, de un tipo usado para la conservación de las actividades biológicas, y se aproximará normalmente a un disolvente fisiológico. Normalmente, el disolvente tendrá un pH neutro, típicamente de al menos alrededor de 5, preferiblemente al menos 6, y típicamente menor de 10, preferiblemente menor de 9, y más preferiblemente alrededor de 7,5. En algunas ocasiones se añadirá un detergente, típicamente uno suave no desnaturalizante, p. ej., CHS (hemisuccinato de colesterol) o CHAPS (sulfonato de 3-([3-colamidopropil]dimetilamonio)-1-propano), o una concentración lo suficientemente baja como para evitar la alteración significativa de las propiedades estructurales o fisiológicas de la proteína.

45 La solubilidad se refleja mediante la sedimentación medida en unidades Svedberg, que es una medida de la velocidad de sedimentación de una molécula en condiciones particulares. La determinación de la velocidad de sedimentación se realizaba de forma clásica en una ultracentrífuga analítica, pero actualmente se realiza típicamente en una ultracentrífuga estándar. Véase Freifelder (1982) *Physical Biochemistry* (2ª ed.), W.H. Freeman; y Cantor y Schimmel (1980) *Biophysical Chemistry*, partes 1-3, W.H. Freeman & Co., San Francisco. Como determinación rudimentaria, se centrifuga una muestra que contiene un polipéptido supuestamente soluble en una ultracentrífuga de tamaño completo estándar a alrededor de 50.000 rpm durante alrededor de 10 minutos, y las moléculas solubles permanecerán en el sobrenadante. Una partícula o polipéptido soluble será típicamente menor de alrededor de 30S, más típicamente menor de alrededor de 15S, normalmente menor de alrededor de 10S, más normalmente menor de alrededor de 6S, y, en realizaciones particulares, preferiblemente menor de alrededor de 4S, y más preferiblemente menor de alrededor de 3S.

III. Variantes físicas

55 También se describen proteínas o péptidos que tienen una homología de secuencia de aminoácidos sustancial con la secuencia de aminoácidos de cada receptor respectivo. Las variantes incluyen variantes de especie o polimórficas.

60 La homología de la secuencia de aminoácidos, o la identidad de la secuencia, se determina mediante la optimización de las correspondencias de residuos, si es necesario introduciendo huecos según se requiera. Esto cambia cuando se consideran las sustituciones conservativas como correspondencias. Las sustituciones conservativas incluyen típicamente las sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicocola, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Las secuencias homólogas de aminoácidos pretenden incluir típicamente las variaciones naturales alélicas o interespecies en cada secuencia proteica respectiva. Las proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán una homología desde el 25-100% (si se pueden introducir huecos), a una homología del 50-100% (si se incluyen las sustituciones conservativas) con la secuencia de aminoácidos de la quimiocina o el receptor apropiado. Las medidas de homología serán al menos alrededor del 35%, generalmente al menos del 40%, más generalmente al menos del 45%, a menudo al menos del 50%, más a menudo al

menos del 55%, típicamente al menos del 60%, más típicamente al menos del 65%, normalmente al menos del 70%, más normalmente al menos del 75%, preferiblemente al menos del 80%, y más preferiblemente al menos del 80%, y en las realizaciones particularmente preferidas, al menos del 85% o más. Véase también Needleham, *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; Sankoff, *et al.* (1983) capítulo uno de *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison* Addison-Wesley, Reading, MA; y los paquetes informáticos de IntelliGenetics, Mountain View, CA; y del University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI.

Cada uno de los ADN's de la quimiocina o del receptor GPC aislados se pueden modificar fácilmente mediante sustituciones de nucleótidos, deleciones de nucleótidos, inserciones de nucleótidos, e inversiones de tramos de nucleótidos. Estas modificaciones pueden dar como resultado secuencias de ADN nuevas que codifican estos antígenos, sus derivados o proteínas que tienen una actividad fisiológica, inmunógena o antigénica similar. Estas secuencias modificadas se pueden usar para producir antígenos mutantes o para incrementar la expresión, o para introducir sitios de reconocimiento enzimático convenientes en la secuencia nucleotídica sin afectar significativamente a la secuencia de la proteína codificada. La expresión incrementada puede implicar la amplificación génica, la transcripción incrementada, la traducción incrementada, y otros mecanismos. Tales derivados mutantes de los receptores incluyen mutaciones predeterminadas o específicas de sitio de la proteína respectiva o de sus fragmentos. "Quimiocina mutante" abarca un polipéptido que se ajusta, por otra parte, a la definición de homología de la quimiocina como se expuso anteriormente, pero que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de la quimiocina tal como se encuentra en la naturaleza, ya sea por medio de deleción, sustitución o inserción. De forma similar para los GPCRs. Estos incluyen niveles de sustitución de residuos de aminoácidos de ninguno, uno, dos, tres, cinco, siete, diez, doce, quince, etc. En particular, "mutante específico de sitio" incluye generalmente las proteínas que tienen una homología significativa con una proteína que tiene las secuencias de las ID SEC N^os. 1-14, y que comparten diversas actividades biológicas, p. ej., antigénicas o inmunógenas, con aquellas secuencias, y en las realizaciones preferidas contienen la mayoría de las secuencias descritas, en particular aquellas halladas en diversos grupos de animales. Como se indicó anteriormente, se enfatiza que las descripciones en general pretenden abarcar las diversas proteínas de quimiocina o de receptor de otros miembros de los grupos relacionados, sin limitarse a las realizaciones de ratón o de humano específicamente discutidas.

Aunque los sitios de las mutaciones específicas de sitio están habitualmente predeterminados, no es necesario que los mutantes sean específicos de sitio. La mutagénesis de la quimiocina o del receptor se puede llevar a cabo haciendo inserciones o deleciones de aminoácidos. Se pueden generar sustituciones, deleciones, inserciones o combinaciones para llegar a una construcción final. Las inserciones incluyen fusiones amino- o carboxi-terminales. Se puede llevar a cabo mutagénesis aleatoria en un codon de interés, y los mutantes expresados se pueden cribar en función de la actividad deseada. Los métodos para realizar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en un ADN que tiene una secuencia conocida se conocen en la técnica, p. ej. mediante técnicas de mutagénesis con el cebador M13 o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase también Sambrook, *et al.* (1989) y Ausubel, *et al.* (1987 y suplementos). Se conocen muchas características estructurales de las quimiocinas y GPCRs que permiten la determinación de si hay insertados residuos específicos en el núcleo de las estructuras secundarias o terciarias, o si los residuos tendrán un efecto relativamente pequeño sobre el plegamiento de la proteína. Las posiciones preferidas para la mutagénesis son aquellas que no impiden el plegamiento funcional de la proteína resultante.

Las mutaciones en el ADN no deberían colocar normalmente secuencias codificantes fuera de los marcos de lectura, y preferiblemente no crearán regiones complementarias que podrían hibridar para producir una estructura de ARNm secundario tal como bucles u horquillas. Pero existen ciertas situaciones en las que tales problemas están compensados. Véase, p. ej., Gesteland y Atkins (1996) *Ann. Rev. Biochem.* 65:741-768.

También se describen proteínas recombinantes, p. ej., proteínas de fusión heterólogas mediante el uso de segmentos de estas proteínas, o anticuerpos. Una proteína de fusión heteróloga es una fusión de proteínas o segmentos que no están fusionados normalmente de forma natural de la misma manera. Así, el producto de fusión de una inmunoglobulina con un polipéptido receptor es una molécula proteica continua que tiene secuencias fusionadas en una unión peptídica típica, típicamente producida en forma de un único producto de traducción, y que exhibe propiedades derivadas de cada péptido originario. Se aplica un concepto quimérico similar a las secuencias heterólogas de ácidos nucleicos.

Además, se pueden producir nuevas construcciones a partir de la combinación de dominios funcionales o estructurales similares de otras proteínas. Por ejemplo, se pueden "intercambiar" segmentos de unión de ligandos u otros segmentos entre diferentes polipéptidos o fragmentos de fusión nuevos. Véase, p. ej., Cunningham, *et al.* (1989) *Science* 243:1330-1336; y O'Dowd, *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992. Así, los polipéptidos quiméricos nuevos que exhiben combinaciones nuevas de especificidades resultarán de la unión funcional de especificidades de unión de ligandos y otros dominios funcionales. Estos pueden ser moléculas quiméricas con mezcla o unión de los diversos segmentos estructurales, p. ej., los dominios estructurales de lámina β o hélice α para la quimiocina, o los segmentos del receptor que corresponden a cada uno de los segmentos transmembrana (TM1-TM7), o los bucles intracelulares (citósolicos, C1-C4) o extracelulares (E1-E4) de los diversos tipos de receptores. El bucle C3 es particularmente importante.

El método de fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, producirá fragmentos de ADN sintéticos adecuados. Se obtendrá a menudo un fragmento bicatenario mediante la síntesis de la cadena complementaria y la hibridación de la cadena en condiciones apropiadas, o mediante la adición de la cadena complementaria mediante el uso de la ADN polimerasa con una secuencia cebadora apropiada, p. ej., técnicas de PCR.

IV. Variantes funcionales

Se describieron las quimiocinas CTACK de mamífero previamente en el documento de EE.UU. de nº de serie 08/978.964, que describe diversos ensayos de migración. Se pueden producir diversos agonistas y antagonistas de los ligandos naturales. Los ensayos de migración pueden aprovechar el movimiento de las células a través de los poros de las membranas. La quimiotaxis se puede medir así. De forma alternativa, se pueden desarrollar ensayos quimiocinéticos, que miden la inducción del movimiento cinético, no necesariamente respecto de un gradiente, *per se*.

Los agonistas de CTACK o Vic exhibirán algunas o todas las funciones de señalización de la quimiocina respectiva, p. ej., unión y quimioatracción de las células apropiadas. Se pueden estudiar diversas secuencias de CTACK o Vic de mamíferos para determinar qué residuos están conservados entre las especies, lo que sugiere qué residuos se pueden cambiar sin efectos drásticos sobre la actividad biológica. De forma alternativa, las sustituciones conservativas mantienen probablemente la actividad biológica, y conducen así a variantes de la quimiocina que mantendrán la actividad agonista. Los métodos estándar para cribar polipéptidos de CTACK o Vic mutantes o variantes determinarán qué secuencias serán agonistas terapéuticos útiles.

Además, se pueden aplicar ciertos métodos de expresión de ácidos nucleicos. Por ejemplo, en el contexto de injertos cutáneos, puede ser útil transfectar los injertos con ácidos nucleicos que se expresarán, según sea apropiado. Se pueden unir de forma operable diversos promotores al gen, por lo que se permite la expresión regulada.

De forma alternativa, se puede ensayar la actividad antagonista. Los ensayos de la capacidad para antagonizar la actividad quimioatrayente se pueden desarrollar como se describe más adelante. Se pueden crear diversos homólogos de ligando que mantienen la capacidad de unión al receptor, pero que carecen de la capacidad de señalización. También se pueden cribar pequeñas moléculas en función de su capacidad para antagonizar la función de CTACK, p. ej. la quimioatracción, la unión al receptor, el flujo de Ca^{++} , y otros efectos mediados por CTACK. Véase en general Gilman, *et al.* (eds. 1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8ª Ed., Pergamon Press; *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn, los cuales se incorporan aquí como referencia.

El bloqueo de la respuesta fisiológica para diversas realizaciones de estas quimiocinas o GPCRs puede ser el resultado de la inhibición de la unión del ligando a su receptor, probablemente por medio de inhibición competitiva. Así, los ensayos *in vitro* de la presente invención usarán a menudo proteína aislada, membranas de células que expresan un receptor recombinante asociado a membrana, p. ej., los segmentos de unión del ligando, o fragmentos unidos a sustratos en fase sólida. Estos ensayos permitirán también la determinación diagnóstica de los efectos de las mutaciones y modificaciones del segmento de unión, o las mutaciones y modificaciones del ligando, p. ej., en los análogos de ligando.

Esta invención también contempla el uso de ensayos de cribado de fármacos competitivos, p. ej., en los que las composiciones de unión neutralizantes, p. ej. anticuerpos, hacia antígenos o fragmentos de receptor compiten con un compuesto de ensayo para la unión a la proteína. De esta manera, los anticuerpos se pueden usar para detectar la presencia de polipéptidos que comparten uno o más sitios de unión antigénica del ligando, y se pueden usar también para ocupar sitios de unión en la proteína que podrían interaccionar de otra forma con un receptor.

Además, los anticuerpos neutralizantes contra una realización de quimiocina específica y los fragmentos solubles de la quimiocina que contienen un sitio de unión al receptor de elevada afinidad, se pueden usar para inhibir la actividad de la quimiocina en los tejidos, p. ej., tejidos que experimentan una fisiología anormal.

Los ensayos de cribado para determinar la unión y la actividad de los mAc y las composiciones de unión abarcan una diversidad de métodos. La unión se puede ensayar marcando de forma detectable el anticuerpo o la composición de unión descrita anteriormente. Las células que responden a CTACK o Vic se pueden usar para ensayar la composición de anticuerpo o de unión.

Para determinar la capacidad de quimioatracción o quimiocinética de CTACK o Vic, se usan preferiblemente animales experimentales, p. ej. ratones. Se hacen recuentos de células cutáneas, p. ej. de Langerhans, antes y en diversos momentos después de la administración de una inyección rápida del agonista o antagonista candidato. Las concentraciones se analizan en diversas muestras, p. ej. sangre, suero, lavados nasales o pulmonares, o tinción de biopsia de tejido. Una composición eficaz de disminución de mAc o de unión disminuirá de forma significativa el nivel de células CLA+. Esto puede ser al menos alrededor del 10%, preferiblemente al menos alrededor del 20%, 30%, 50%, 70% o más.

La determinación de los anticuerpos se puede realizar en otros animales, p. ej. humanos, mediante el uso de diversos métodos. Por ejemplo, las muestras de sangre se extraen de pacientes que padecen una enfermedad o trastorno relacionado con la piel antes y después del tratamiento con un mAc candidato.

La perfecta migración selectiva de tejido de los linfocitos se ha considerado durante mucho tiempo fundamental para el control de las respuestas inmunitarias sistémicas. Los avances recientes en este campo apoyan un modelo en el que la migración de los leucocitos se consigue mediante la expresión secuencial de moléculas de adhesión vasculares y de leucocitos expresadas de forma diferencial y reguladas independientemente, y receptores de señalización y sus

ligandos. Butcher y Picker (1996) *Science* 272:60-66. La observación de que las quimiocinas, una superfamilia de pequeñas proteínas secretadas con receptores acoplados a proteína G (Baggiolini (1998) *Nature* 392:565-568), pueden atraer leucocitos llevó a la hipótesis de que las quimiocinas proporcionan señales clave que dirigen el reclutamiento de subgrupos de linfocitos T hacia sitios efectores inmunitarios linfoides y extralinfoides. La expresión específica de piel de CTACK y/o Vic unida a su quimioatracción selectiva para células T memoria CLA⁺ de migración a la piel proporciona datos que apoyan la hipótesis de que existen quimiocinas específicas de tejido que atraen de forma selectiva subgrupos funcionalmente únicos de linfocitos memoria.

Como tal, la presente invención proporciona medios para purificar células deseadas, p. ej., CLA⁺. Los efectos quimioatrayentes o quimiocinéticos sobre esas células pueden ser la base de los métodos de purificación. Existen métodos para la migración y la recuperación selectiva de células hacia o desde la quimiocina, p. ej., a través de una membrana porosa, o hacia diversas localizaciones en un cultivo. Existen otros métodos para separar selectivamente células de formas particulares de otras. De forma alternativa, se pueden usar moléculas marcadoras para separar mediante FACS células que se unen específicamente a la quimiocina. Las poblaciones de células de Langerhans o derivadas de piel sustancialmente homogéneas tendrán una utilidad importante en los medios de investigación o terapéuticos.

Mientras CTACK y Vic exhiben efectos sobre las células CLA⁺, otras células que pueden responder también incluyen fibroblastos y queratinocitos. Los efectos sobre los diversos tipos de células pueden ser indirectos, y también directos. Un cambio estadísticamente significativo en el número de células será típicamente al menos alrededor del 10%, preferiblemente 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, o más. A menudo se desearán efectos mayores del 100%, p. ej., 130%, 150%, 2X, 3X, 5X, etc. Los efectos pueden ser específicos para provocar la quimiotaxis hacia puntos específicos, o pueden ser quimiocinéticos en la inducción de movimiento en general de las células, pero no necesariamente en una dirección específica.

CTACK puede inducir la adhesión mediada por integrina para los ligandos vasculares ICAM-1 y VCAM-1. ICAM-1 o VCAM-1 son moléculas de adhesión vascular (moléculas de adhesión expresadas por las células endoteliales que tapizan los vasos) y se sabe que se incrementan en las células endoteliales en respuesta a la estimulación proinflamatoria *in vitro* e *in vivo*. Estas moléculas de adhesión mantienen la adhesión de los leucocitos por medio de la interacción con las moléculas de integrina (ICAM-1 se une a las integrinas $\beta 2$ LFA-1 y MAC-1) y VCAM-1 se une a las integrinas $\alpha 4 \beta 1$ y $\alpha 4 \beta 7$. El tratamiento de las células con ciertas quimiocinas (pero no todas las quimiocinas) puede provocar la modulación de las integrinas, lo que da como resultado una unión mucho mejor de las células a estos ligandos vasculares. CTACK puede provocar esta modulación: el tratamiento de células T o de una línea de células T que expresa GPR2 provoca un incremento rápido (2 minutos) en la capacidad de unión. Esto indica que CTACK podría ser responsable de la adhesión de las células T CLA⁺ a las células endoteliales de la piel.

CTACK también puede intervenir en la migración transendotelial de las células T CLA⁺ a través de las monocapas endoteliales estimuladas. En estos experimentos, las células endoteliales se cultivan en cámaras Transwell, estimuladas con, por ejemplo, factor de necrosis tumoral α (TNF α). CTACK se coloca en el pocillo inferior y las células T memoria se colocan en la cámara superior. CTACK provoca que las células T CLA⁺ (pero no otras células T memoria, que incluyen las células T $\beta 7$) migren a través de la monocapa hacia la cámara inferior. Esto indica que CTACK puede intervenir en el reclutamiento de células T hacia sitios cutáneos inflamatorios induciendo la migración de las células T CLA⁺ a través de las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos.

Esto sugiere la utilidad de estas quimiocinas o antagonistas en el tratamiento de trastornos o enfermedades médicas asociadas a trastornos inmunológicos de la piel. Véase, p. ej., Bos (ed. 1990) *Skin Immune System* CRC Press, Boca Raton, FLA; Fitzpatrick, *et al.* (eds. 1993) *Dermatology in General Medicine* (4^a ed.) McGraw-Hill, NY; Rook, *et al.* (eds. 1998) *Textbook of Dermatology* Blackwell; Habifor y Habie (1995) *Clinical Dermatology: A Color Guide to Diagnosis and Therapy* Mosby; Grob (ed. 1997) *Epidemiology, Causes and Prevention of Skin Diseases* Blackwell; Frank, *et al.* (eds. 1995) *Samter's Immunologic Diseases*, 5^a ed., vols. I-II, Little, Brown and Co., Boston, MA; Coffman, *et al.* (1989) *Science* 245:308-310; y Frick, *et al.* (1988) *J. Allergy Clin. Immunol.* 82:199-225. Los agonistas o antagonistas descritos se pueden combinar con otros tratamientos de los trastornos médicos descritos aquí, p. ej., un antibiótico, agente terapéutico inmunosupresor, agente inmunoadyuvante, analgésico, fármaco antiinflamatorio, factor de crecimiento, citocina, vasodilatador o vasoconstrictor.

Los "derivados" de los antígenos de quimiocina incluyen mutantes de la secuencia de aminoácidos, variantes de glicosilación, y conjugados covalentes o agregados con otros restos químicos. Los derivados covalentes se pueden preparar mediante unión de funciones a grupos que se hallan en las cadenas laterales de los aminoácidos de la quimiocina o en los extremos N- o C-terminales, mediante medios que se conocen en la técnica. Estos derivados pueden incluir, sin limitación, ésteres o amidas alifáticas del extremo carboxilo, o de los residuos que contienen cadenas laterales de carboxilo, derivados O-acilo de los residuos que contienen grupos hidroxilo, y derivados N-acilo del aminoácido aminoterminal o de los residuos que contienen grupos amino, p. ej. lisina o arginina. Los grupos acilo se seleccionan del grupo de restos alquilo que incluyen alquilo normal C3 a C18, por lo que forman especies alcanoil-aroilo. La unión covalente a proteínas portadoras puede ser importante cuando los restos inmunógenos son haptenos.

En particular, están incluidas las alteraciones de la glicosilación, p. ej., realizadas modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento, o en etapas de procesamiento adicionales. Los medios particularmente preferidos para realizar esto son mediante exposición del polipéptido a enzimas de glicosilación derivadas de células que normalmente proporcionan tal procesamiento, p. ej., enzimas de glicosilación de

mamífero. También se contemplan las enzimas de desglicosilación. También están incluidas las versiones de la misma secuencia primaria de aminoácidos que tienen otras modificaciones menores, que incluyen residuos de aminoácidos fosforilados, p. ej., fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina, o derivados de nucleósidos o nucleótidos, p. ej., guanilo derivado.

Un grupo importante de derivados son los conjugados covalentes de la respectiva quimiocina o receptor o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos. Estos derivados se pueden sintetizar en cultivo recombinante como fusiones N- o C-terminales o mediante el uso de agentes conocidos en la técnica por su utilidad para entrecruzar proteínas a través de grupos laterales reactivos. Los sitios de derivatización de quimiocinas preferidos con agentes de entrecruzamiento están en los grupos amino libres, restos de carbohidratos y residuos de cisteína.

También se proporcionan polipéptidos de fusión entre estas quimiocinas o receptores y otras proteínas homólogas o heterólogas, p. ej. otras quimiocinas o receptores. Muchos factores de crecimiento y citocinas son entidades homodiméricas, y una construcción repetitiva puede tener diversas ventajas, que incluyen susceptibilidad disminuida a la escisión proteolítica. Además, muchos receptores de citocina requieren la dimerización para transducir una señal, y pueden ser deseables diversos ligandos diméricos o repeticiones de dominios. Los polipéptidos homólogos pueden ser fusiones entre diferentes marcadores de superficie, lo que da como resultado, p. ej., una proteína híbrida que exhibe especificidad de unión al receptor. De forma similar, se pueden construir fusiones heterólogas que exhibirían una combinación de propiedades o actividades de las proteínas de las que derivan. Los ejemplos típicos son fusiones de un polipéptido indicador, p. ej., luciferasa, con un segmento o dominio de un ligando, p. ej., un segmento de unión a receptor, de forma que la presencia o localización del ligando fusionado, o una composición de unión, se puede determinar fácilmente. Véase, p. ej., Dull, *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.859.609. Otras moléculas de fusión génica incluyen β -galactosidasa bacteriana, trpE, proteína A, β -lactamasa, α -amilasa, alcohol deshidrogenasa, una proteína de fusión FLAG, y factor de apareamiento α de levaduras. Véase, p. ej., Godowski, *et al.* (1988) *Science* 241:812-816.

El método de fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, producirá fragmentos de ADN sintéticos adecuados. Un fragmento bicatenario se obtendrá a menudo sintetizando la cadena complementaria y fusionando las cadenas en condiciones apropiadas, o añadiendo la cadena complementaria mediante el uso de la ADN polimerasa con una secuencia cebadora adecuada.

Tales polipéptidos pueden tener también residuos de aminoácidos que se han modificado químicamente mediante fosforilación, guanilación, sulfonación, biotinización o la adición o eliminación de otros restos, en particular aquellos que tienen formas moleculares similares a los grupos fosfato o guanilo. En algunas realizaciones, las modificaciones serán reactivos marcadores útiles, o servirán como objetivos de purificación, p. ej., indicadores de afinidad como FLAG.

Las proteínas de fusión se producirán típicamente mediante métodos de ácidos nucleicos recombinantes o mediante métodos de polipéptidos sintéticos. Las técnicas para la manipulación y expresión de ácidos nucleicos se describen en general, por ejemplo, en Sambrook, *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory. Las técnicas para la síntesis de polipéptidos se describen, por ejemplo, en Merrifield (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2156; Merrifield (1986) *Science* 232:341-347; y Atherton, *et al.* (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; y ligadura química, p. ej., Dawson, *et al.* (1994) *Science* 266:776-779, un método de unión de péptidos sintéticos largos mediante un enlace peptídico.

Esta invención también contempla el uso de derivados de estas quimiocinas o receptores, distintos de las variaciones en la secuencia de aminoácidos o en la glicosilación. Tales derivados pueden implicar la asociación covalente o agregativa con restos químicos. Estos derivados incluyen en general: (1) sales, (2) modificaciones covalentes de la cadena lateral y del residuo terminal, y (3) complejos de adsorción, por ejemplo con membranas celulares. Tales derivados covalentes o de agregación son útiles como inmunógenos, como reactivos en inmunoensayos, o en métodos de purificación tales como la purificación mediante afinidad de ligandos o de otros ligandos de unión. Por ejemplo, un antígeno de quimiocina se puede inmovilizar mediante enlace covalente a un soporte sólido tal como sefarsa activada con bromuro de cianógeno, mediante métodos que se conocen en la técnica, o se puede adsorber en superficies de poliolefina, con o sin entrecruzamiento con glutaraldehído, para el uso en el análisis o en la purificación de anticuerpos anti-quimiocina o de su receptor. Estas quimiocinas se pueden marcar además con un grupo detectable, por ejemplo se pueden radioyodar mediante el procedimiento de cloramina T, unir covalentemente a quelatos de tierras raras, o conjugar a un resto fluorescente para el uso en ensayos diagnósticos. La purificación de la quimiocina, el receptor o las composiciones de unión se puede efectuar mediante anticuerpos o receptores inmovilizados.

Se pueden introducir otras modificaciones con el objetivo de modificar la farmacocinética o la farmacodinámica terapéutica de una quimiocina de interés. Por ejemplo, ciertos medios para minimizar el tamaño de la entidad pueden mejorar su farmacoaccesibilidad; otros medios para maximizar el tamaño pueden afectar a la farmacodinámica. De forma similar, se pueden modificar los cambios en la cinética o el equilibrio de unión del ligando de un receptor.

Se puede usar una quimiocina o receptor solubilizado o un fragmento apropiado de esta invención como inmunógeno para la producción de antisueros o anticuerpos específicos para el ligando, receptor o sus fragmentos. Las proteínas purificadas se pueden usar para cribar anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión de quimiocina preparados mediante inmunización con diversas formas de preparaciones impuras que contienen la proteína. En particular, los equivalentes de anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos naturales, p. ej., Fv, Fab, o F(ab)₂.

También se pueden usar quimiocinas purificadas como reactivo para detectar anticuerpos generados en respuesta a la presencia de concentraciones elevadas de la proteína o de fragmentos celulares que contienen la proteína, y ambos pueden ser diagnósticos de un estado fisiológico anormal o específico, o enfermedad. Además, los fragmentos de proteína quimiocina, o sus concatenaciones, pueden servir también como inmunógenos para producir composiciones de unión, p. ej., los anticuerpos de la presente invención, como se describe inmediatamente a continuación. Por ejemplo, esta invención contempla anticuerpos generados contra ciertas secuencias de aminoácidos, p. ej., las ID SEC N°s: 1-14, o las proteínas que las contienen. En particular, esta invención contempla anticuerpos que tienen afinidad de unión a, o que se generan contra, fragmentos específicos, p. ej., aquellos que se predice que se encuentran en las superficies exteriores de la estructura terciaria de la proteína. Se aplican conceptos similares a los anticuerpos específicos para los receptores de la invención.

La presente invención contempla el aislamiento de variantes de especie estrechamente relacionadas adicionales. Los análisis de transferencia de Southern y Northern deberían establecer que existen entidades genéticas similares en otros mamíferos relacionados, y establecer la rigurosidad de las condiciones de hibridación para aislarlos. Es probable que estas quimiocinas y los receptores estén muy extendidos en las variantes de especie, p. ej., entre los roedores y los primates.

La invención también proporciona medios para aislar un grupo de quimiocinas o receptores relacionados que exhiben tanto peculiaridades como similitudes en la estructura, expresión y función. La elucidación de muchos de los efectos fisiológicos de las proteínas se acelerará enormemente mediante el aislamiento y la caracterización de las distintas variantes de especie de los ligandos. Los genes relacionados hallados, p. ej., en diversas bases de datos informáticas también serán útiles, en muchos casos, para fines similares con proteínas relacionadas estructuralmente. En particular, la presente invención proporciona sondas útiles o características de búsqueda para identificar entidades genéticas homólogas adicionales en diferentes especies.

Los genes aislados permitirán la transformación de células que carecen de la expresión de una quimiocina o receptor correspondiente, p. ej., tipos o células de especies que carecen de los antígenos correspondientes y que exhiben una actividad de fondo negativa. La expresión de los genes transformados permitirá el aislamiento de líneas celulares antigénicamente puras, con variantes de especie definidas o únicas. Esta aproximación permitirá la detección y discriminación más sensible de los efectos fisiológicos de las proteínas de quimiocina o de receptor. Se pueden aislar y usar fragmentos subcelulares, p. ej., citoplastos o fragmentos de membrana.

La disección de los elementos estructurales críticos que efectúan las diversas funciones de diferenciación proporcionadas por los ligandos es posible mediante el uso de técnicas estándar de la biología molecular moderna, en particular al comparar los miembros de la clase relacionada. Véase, p. ej., la técnica de mutagénesis de exploración de homólogos descrita en Cunningham, *et al.* (1989) *Science* 243:1339-1336; y las aproximaciones usadas en O'Dowd, *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992; y Lechleiter *et al.* (1990) *EMBO J.* 9:4381-4390.

Además, se pueden sustituir diversos segmentos entre variantes de especie para determinar qué características estructurales son importantes tanto en la afinidad como en la especificidad de unión al receptor, así como en la transducción de la señal. Se usará cualquier colección de diferentes variantes de quimiocina o de receptor para cribar las variantes que exhiben propiedades combinadas de interacción con diferentes variantes de especie.

Las funciones intracelulares implicarían probablemente segmentos del receptor que son accesibles normalmente al citosol. Sin embargo, se puede producir en ciertas circunstancias la interiorización del ligando, y se puede producir la interacción entre los componentes intracelulares y los segmentos "extracelulares". Los segmentos específicos de interacción de una quimiocina particular con otros componentes intracelulares se puede identificar mediante mutagénesis o medios bioquímicos directos, p. ej., métodos de entrecruzamiento o afinidad. El análisis estructural mediante métodos físicos cristalográficos o de otro tipo también será aplicable. La investigación adicional del mecanismo de transducción de la señal incluirá el estudio de los componentes asociados que pueden ser aislables mediante métodos de afinidad o mediante medios genéticos, p. ej. análisis de complementación de mutantes.

Se aplicará un estudio adicional de la expresión y el control de las diversas quimiocinas o receptores. Los elementos de control asociados a las proteínas pueden exhibir patrones de expresión diferenciales de desarrollo, específicos de tejido, o de otro tipo. Son de interés las regiones genéticas en dirección 5' o 3', p. ej. los elementos de control. El corte y empalme diferencial del mensaje puede conducir a formas asociadas a membrana, formas solubles y versiones modificadas del ligando.

Los estudios estructurales de las proteínas llevarán al diseño de ligandos o receptores nuevos, en particular análogos que exhiben propiedades agonistas o antagonistas sobre el receptor. Esto se puede combinar con los métodos de cribado previamente descritos para aislar los ligandos que exhiben los espectros deseados de actividades.

La expresión en otros tipos celulares a menudo dará como resultado diferencias de glicosilación en una quimiocina o receptor particular. Las diversas variantes de especie pueden exhibir funciones distintas basadas en diferencias estructurales distintas de la secuencia de aminoácidos. Las modificaciones diferenciales pueden ser responsables de la función diferencial, y la elucidación de los efectos se hace ahora posible.

Así, la presente invención proporciona reactivos importantes relacionados con una interacción fisiológica ligando-receptor. Aunque la descripción anterior se ha centrado principalmente en las realizaciones de ratón y humano de las quimiocinas o receptores específicamente descritas, los expertos en la técnica reconocerán inmediatamente que la invención proporciona otros homólogos, p. ej., de especies relacionadas, roedores o primates.

V. Anticuerpos

Se pueden generar anticuerpos para estas quimiocinas o receptores, que incluyen las variantes de especie o polimórficas, y sus fragmentos, tanto en sus formas naturales como en sus formas recombinantes. Además, se pueden generar anticuerpos para quimiocinas o receptores en sus formas activas o inactivas, o en sus formas nativas o desnaturalizadas. También se contemplan los anticuerpos anti-idiotipo.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales son conocidos para los expertos en la técnica. Típicamente, se mezcla un inmunógeno, preferiblemente una proteína purificada, con un adyuvante, y los animales se inmunizan con la mezcla. La respuesta inmunitaria de los animales a la preparación de inmunógeno se monitoriza tomando muestras de sangre y determinando el título de la reactividad hacia la proteína CTACK o hacia el péptido de interés. Por ejemplo, cuando se obtienen títulos elevados apropiados de anticuerpo para el inmunógeno, normalmente después de inmunizaciones repetidas, se recoge la sangre del animal y se preparan los antisueros. Se puede realizar el fraccionamiento adicional de los antisueros para enriquecer los anticuerpos reactivos contra la proteína, si se desea. Véase, p. ej., Harlow y Lane *Antibodies, A Laboratory Manual*; o Coligan (ed.) *Current Protocols in Immunology*. La inmunización se puede llevar a cabo también a través de otros métodos, p. ej., inmunización con vector de ADN. Véase, p. ej., Wang, *et al.* (1997) *Virology* 228:278-284.

Se pueden obtener anticuerpos monoclonales mediante diversas técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Típicamente, se immortalizan células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, normalmente mediante fusión con una célula de mieloma. Véase Kohler y Milstein (1976) *Eur. J. Immunol.* 6:511-519. Los métodos alternativos de immortalización incluyen la transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Doyle, *et al.* (eds. 1994 y suplementos periódicos) *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley and Sons, Nueva York, NY. Las colonias que se generan de células únicas immortalizadas se criban en función de la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas por el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por tales células se puede aumentar mediante diversas técnicas, que incluyen la inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado. De forma alternativa, se pueden aislar secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión suyo cribando una biblioteca de ADN de células B humanas según, p. ej., el protocolo general resumido por Huse, *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281.

Se pueden generar anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión y versiones de cadena simple, contra fragmentos predeterminados de los ligandos mediante inmunización de animales con concatémoros o conjugados de los fragmentos con proteínas inmunógenas. Los anticuerpos monoclonales se preparan de células que secretan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos se pueden cribar en función de la unión a quimiocinas o receptores normales o incompletos, o se pueden cribar en función de la actividad agonista o antagonista. Estos anticuerpos monoclonales se unirán normalmente con al menos una K_D de alrededor de 1 mM, más normalmente al menos alrededor de 300 μ M, típicamente al menos alrededor de 10 μ M, más típicamente al menos alrededor de 30 μ M, preferiblemente al menos alrededor de 10 μ M, y más preferiblemente al menos alrededor de 3 μ M o mejor.

Los anticuerpos de esta invención, que incluyen fragmentos de unión a antígeno, pueden tener un valor preparativo, diagnóstico o terapéutico significativo. Pueden ser útiles para purificar o marcar el antígeno deseado en una muestra, o pueden ser antagonistas potentes que se unen al ligando e inhiben la unión al receptor o inhiben la capacidad de un ligando de provocar una respuesta biológica. También pueden ser útiles como anticuerpos no neutralizantes y se pueden unir a, o como proteínas de fusión con, toxinas o radionucleidos de forma que cuando el anticuerpo se une al antígeno, la célula que lo expresa, p. ej. en su superficie por medio del receptor, se destruye. Además, estos anticuerpos se pueden conjugar con fármacos u otros agentes terapéuticos, directa o indirectamente por medio de una molécula espaciadora, y pueden realizar el guiado del fármaco. Los anticuerpos para los receptores se pueden usar más fácilmente para bloquear la unión del ligando y/o la transducción de la señal.

Los anticuerpos de esta invención también pueden ser útiles en aplicaciones diagnósticas o de purificación de reactivos. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, se pueden cribar en función de la capacidad de unirse a las quimiocinas o receptores sin inhibir la unión ligando-receptor. Como anticuerpos neutralizantes, pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. También serán útiles en la detección o cuantificación de quimiocinas o receptores, p. ej. en inmunoanálisis. Se pueden usar como reactivos de purificación en columnas de inmuoafinidad o como reactivos de inmunohistoquímica.

Los fragmentos de ligando o receptor se pueden concatenar o unir a otros materiales, en particular polipéptidos, como polipéptidos fusionados o unidos covalentemente, para usarlos como inmunógenos. Los péptidos cortos se producirán preferiblemente como estructuras repetitivas para incrementar el tamaño. Un ligando y sus fragmentos se pueden fusionar o unir covalentemente a una diversidad de inmunógenos, tales como hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, toxoide tetánico, etc. Véase *Microbiology*, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Landsteiner (1962) *Specificity of Serological Reactions*, Dover Publications, Nueva York, y Williams, *et al.*

(1967) *Methods in Immunology and Immunochemistry*, vol. 1, Academic Press, Nueva York, para las descripciones de los métodos de preparación de antisueros policlonales. Un método típico implica la hiperinmunización de un animal con un antígeno. La sangre del animal se recoge poco después de las inmunizaciones repetidas y se aísla la fracción de γ -globulinas.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de diversos hospedadores mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, humanos, etc. La descripción de las técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales se puede encontrar, p. ej., en Stites, *et al.* (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias citadas ahí; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press, Nueva York; y particularmente en Kohler y Milstein (1975) en *Nature* 256:495-497, que discute un método para generar anticuerpos monoclonales. Brevemente resumido, este método implica inyectar un inmunógeno a un animal. El animal se sacrifica después y se toman las células, p. ej., de su bazo, que después se fusionan con células de mieloma. El resultado es una célula híbrida o "hibridoma" que es capaz de reproducirse *in vitro*. La población de hibridomas se criba después para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una especie única de anticuerpo para el inmunógeno. De esta manera, las especies individuales de anticuerpos obtenidos son los productos de las células B únicas inmortalizadas y clonadas procedentes del animal inmunizado, generadas en respuesta a un sitio específico reconocido en la sustancia inmunógena. Se pueden derivar grandes cantidades de anticuerpo del líquido ascítico de un animal.

Otras técnicas adecuadas implican la exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o, de forma alternativa, la selección de bibliotecas de anticuerpos en fagos o vectores similares. Véase Huse, *et al.* (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", *Science* 246:1275-1281; y Ward, *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546. Los polipéptidos y los anticuerpos de la presente invención se pueden usar con o sin modificación, e incluyen los anticuerpos quiméricos o humanizados. Con frecuencia, los polipéptidos y los anticuerpos se marcarán uniéndose, de forma covalente o no covalente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una gran variedad de marcadores y técnicas de conjugación, y se informan exhaustivamente tanto en la bibliografía científica como en la de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen las patentes de EE.UU. n.ºs 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Además, se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes, véase Cabilly, patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y Queen *et al.* (1989) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 86:10029-10033; o se pueden producir en ratones transgénicos, véase Méndez, *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156.

Los anticuerpos de esta invención se pueden usar también para cromatografía de afinidad en el aislamiento de la proteína. Se pueden preparar columnas en las que los anticuerpos están unidos a un soporte sólido, p. ej. partículas, tales como agarosa, Sephadex, o similares, en las que se puede hacer pasar un lisado celular a través de la columna, la columna se lava, seguido de concentraciones crecientes de un desnaturalizante suave, por lo que se liberará la proteína de quimiocina purificada.

Los anticuerpos se pueden usar también para cribar bibliotecas de expresión en función de productos de expresión particulares. Normalmente los anticuerpos usados en tal procedimiento estarán marcados con un resto que permite la detección sencilla de la presencia del antígeno mediante unión al anticuerpo.

Los anticuerpos generados contra estas quimiocinas o receptores serán también útiles para generar anticuerpos anti-idiotipo. Estos serán útiles en la detección o el diagnóstico de diversos trastornos inmunológicos relacionados con la expresión de los antígenos respectivos.

Los anticuerpos son simplemente una forma de composiciones de unión específica. Otras composiciones de unión, que a menudo tendrán usos similares, incluyen moléculas que se unen con especificidad al receptor de CTACK o Vic, p. ej., de una manera molécula de unión-molécula de unión, una interacción anticuerpo-antígeno, o en una interacción natural proteína-proteína fisiológicamente relevante, covalente o no covalente, p. ej. proteínas que se asocian específicamente con la proteína receptora de CTACK o Vic. La molécula puede ser un polímero o reactivo químico. Un análogo funcional puede ser una proteína con modificaciones estructurales, o puede ser una molécula estructuralmente no relacionada, p. ej. que tiene una forma molecular que interacciona con los determinantes de unión apropiados. Así, la identificación de GPR2 como el receptor de CTACK y Vic proporciona medios para producir tal composición de unión.

Se puede realizar el cribado de fármacos mediante el uso de anticuerpos, CTACK, Vic o sus fragmentos para identificar compuestos que tienen afinidad de unión a CTACK, Vic o GPR2, o que pueden bloquear o estimular la interacción natural con el ligando. Se pueden utilizar ensayos biológicos posteriores para determinar si el compuesto tiene actividad intrínseca de bloqueo y es por tanto un antagonista. De forma similar, un compuesto que tiene actividad estimuladora intrínseca puede actuar como señal para las células, p. ej. por medio de la ruta de CTACK, y así es un agonista, ya que estimula la actividad de un ligando. Se pueden desarrollar antagonistas de muteína que mantienen la unión al receptor pero que carecen de la capacidad de señalización.

Los estudios estructurales de los ligandos conducirán al diseño de nuevas variantes, en particular análogos que exhiben propiedades agonistas o antagonistas sobre el receptor. Esto se puede combinar con los métodos de cribado descritos previamente para aislar muteínas que exhiben los espectros deseados de actividades.

De la misma forma que se describen moléculas de unión específicas de receptor, también se describen moléculas pequeñas identificadas mediante procedimientos de cribado. En particular, se conoce en la técnica cómo cribar moléculas pequeñas que interfieren, p. ej., con la unión del ligando al receptor, a menudo mediante unión específica al receptor y bloqueo de la unión del ligando natural. Véase, p. ej., las sesiones sobre Cribado de Elevado Rendimiento, International Business Communications, Southborough, MA 01772-1749. Tales moléculas pueden competir con los ligandos naturales, y unirse de forma selectiva a CTACK, Vic o GPR2.

VI. Ácidos nucleicos

Las secuencias peptídicas descritas y los reactivos relacionados son útiles en el aislamiento de un clon de ADN que codifica estas quimiocinas o receptores, p. ej., de una fuente natural. Típicamente, serán útiles en el aislamiento de un gen de otro individuo, y se aplicarán procedimientos similares para aislar genes de especies relacionadas, p. ej., roedores o primates. La hibridación cruzada permitirá el aislamiento del ligando de otra especie estrechamente relacionada. Debería haber disponibles varias aproximaciones diferentes para aislar con éxito un clon de ácido nucleico adecuado. Se aplican conceptos similares para las realizaciones del receptor.

La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos mediante métodos estándar, como se describió anteriormente. Los péptidos sintéticos o la proteína purificada se pueden presentar a un sistema inmunitario para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, p. ej., Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press. De forma alternativa, se puede usar una quimiocina o receptor como reactivo de unión específica, y se puede aprovechar la ventaja de su especificidad de unión, de forma muy similar a como se usaría un anticuerpo. Los receptores de quimiocina son típicamente proteínas transmembrana 7, que podrían ser sensibles a la interacción apropiada con lípidos o con membranas. La transducción de la señal está mediada típicamente a través de una proteína G, a través de la interacción con un receptor acoplado a proteína G.

Por ejemplo, la composición de unión específica se podría usar para el cribado de una biblioteca de expresión producida a partir de una línea celular que expresa una quimiocina particular. El cribado puede ser la tinción estándar del ligando expresado en la superficie, o mediante fijación. El cribado de la expresión intracelular también se puede realizar mediante diversos procedimientos de tinción o de inmunofluorescencia. Las composiciones de unión se podrían usar para purificar mediante afinidad o separar las células que expresan el ligando.

Los segmentos peptídicos también se pueden usar para predecir los oligonucleótidos apropiados para cribar una biblioteca, p. ej., para aislar variantes de especie. El código genético se puede usar para seleccionar los oligonucleótidos apropiados útiles como sondas para el cribado. Véase, p. ej., las ID SEC N°s. 1-14. En combinación con las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los oligonucleótidos sintéticos serán útiles en la selección de los clones correctos de una biblioteca. Se usarán también secuencias complementarias como sondas o cebadores. Pueden ser útiles las técnicas de vectores anclados o PCR complementaria de poli-A o ADN complementario de otros péptidos.

Esta invención contempla el uso de ADN aislado o fragmentos para codificar un polipéptido de quimiocina correspondiente biológicamente activo. Además, esta invención cubre el ADN aislado o recombinante que codifica una proteína o polipéptido biológicamente activo que es capaz de hibridar en condiciones apropiadas con las secuencias de ADN descritas aquí. Dicha proteína o polipéptido biológicamente activo puede ser un ligando, receptor o fragmento intacto, y tiene una secuencia de aminoácidos como se describe en las ID SEC N°s: 1-14. Además, esta invención cubre el uso de ADN aislado o recombinante, o de sus fragmentos, que codifican proteínas que son homólogas para una quimiocina o receptor o que se aisló mediante el uso de un cADN que codifica una quimiocina o receptor como sonda. El ADN aislado puede tener las secuencias reguladoras respectivas en los lados 5' y 3', p. ej., promotores, potenciadores, señales de adición de poli-A, y otros.

Un ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, p. ej. un ARN, ADN, o un polímero mixto, que está separado sustancialmente de otros componentes que acompañan de forma natural a la secuencia nativa, p. ej., ribosomas, polimerasas, y secuencias genómicas flanqueantes de la especie originaria. El término abarca una secuencia de ácido nucleico que se ha extraído de su medio natural, e incluye aislamientos de ADN recombinante o clonado y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye las formas aisladas de la molécula.

Un ácido nucleico aislado será en general una composición homogénea de moléculas, pero contendrá, en algunas realizaciones, una heterogeneidad menor. Esta heterogeneidad se halla típicamente en los extremos o porciones del polímero que no son críticas para la función o actividad biológica deseada.

Un ácido nucleico "recombinante" está definido por su método de producción o por su estructura. En referencia a su método de producción, p. ej., un producto hecho mediante un procedimiento, el procedimiento es el uso de técnicas de ácidos nucleicos recombinantes, p. ej. que implican la intervención humana en la secuencia de nucleótidos, típicamente la selección o producción. De forma alternativa, puede ser un ácido nucleico producido generando una secuencia que comprende la fusión de dos fragmentos que no son contiguos de forma natural entre sí, pero pretende excluir los productos de la naturaleza, p. ej., las formas purificadas naturales. Así, por ejemplo, se incluyen los productos hechos transformando células con cualquier vector que no se da de forma natural, como son los ácidos nucleicos que

comprenden una secuencia derivada mediante el uso de un procedimiento sintético de oligonucleótidos. Ello se realiza a menudo para sustituir un codon con un codon redundante que codifica el mismo aminoácido o uno conservativo, mientras típicamente se introduce o elimina un sitio de reconocimiento de secuencia. De forma alternativa, se realiza para unir segmentos de ácidos nucleicos de funciones deseadas para generar una entidad genética única que comprende una combinación deseada de funciones que no se hallan en las formas naturales normalmente disponibles. Los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción son a menudo el objetivo de tales manipulaciones artificiales, pero se pueden incorporar a propósito otros objetivos específicos, p. ej., promotores, sitios de replicación del ADN, secuencias de regulación, secuencias de control, u otras características útiles. Se aplica un concepto similar para un polipéptido recombinante, p. ej., de fusión. Se incluyen específicamente los ácidos nucleicos sintéticos que, mediante redundancia del código genético, codifican polipéptidos similares a los fragmentos de estos antígenos, y fusiones de secuencias de diferentes variantes de especie.

Un "fragmento" significativo en el contexto de un ácido nucleico es un segmento contiguo de al menos alrededor de 17 nucleótidos, generalmente al menos alrededor de 20 nucleótidos, más generalmente al menos alrededor de 23 nucleótidos, comúnmente al menos alrededor de 26 nucleótidos, más comúnmente al menos alrededor de 29 nucleótidos, a menudo al menos alrededor de 32 nucleótidos, más a menudo al menos alrededor de 35 nucleótidos, típicamente al menos alrededor de 38 nucleótidos, más típicamente al menos alrededor de 41 nucleótidos, normalmente al menos alrededor de 44 nucleótidos, más normalmente al menos alrededor de 47 nucleótidos, preferiblemente al menos alrededor de 50 nucleótidos, más preferiblemente al menos alrededor de 53 nucleótidos, y en las realizaciones particularmente preferidas será de al menos alrededor de 56 o más nucleótidos, p. ej., 60, 65, 75, 85, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 400, etc. Tales fragmentos pueden tener extremos que comienzan y/o terminan en virtualmente todas las posiciones, p. ej., que comienzan en los nucleótidos 1, 2, 3, etc., y que terminan, p. ej., en 300, 299, 298, 287, etc., en pares combinatorios. Los polinucleótidos particularmente interesantes tienen extremos que corresponden a los límites de los dominios estructurales.

Un ADN que codifica una proteína de quimiocina o receptor particular será muy útil para identificar genes, ARNm, y especies de cADN que codifican ligandos o receptores relacionados u homólogos, así como ADNs que codifican proteínas homólogas de diferentes especies. Existen probablemente homólogos en especies estrechamente relacionadas, p. ej. roedores o primates. Las diversas proteínas de quimiocina deberían ser homólogas y se incluyen aquí, como debería ser para los receptores. Sin embargo, las proteínas se pueden aislar fácilmente en condiciones apropiadas mediante el uso de estas secuencias si son suficientemente homólogas. Típicamente, son de interés particular las quimiocinas o receptores de primate.

También se describen moléculas y fragmentos de ADN recombinantes que tienen una secuencia de ADN idéntica o sumamente homóloga a la de los ADNs aislados expuestos aquí. En particular, las secuencias estarán unidas de forma operable a segmentos de ADN que controlan la transcripción, traducción y replicación del ADN. De forma alternativa, serán útiles los clones recombinantes derivados de secuencias genómicas, p. ej., que contienen intrones, para los estudios transgénicos, que incluyen, p. ej., células y organismos transgénicos, y para terapia génica. Véase, p. ej., Goodnow (1992) "Transgenic Animals" en Roitt (ed.) *Encyclopedia of Immunology* Academic Press, San Diego, págs 1502-1504; Travis (1992) *Science* 256:1392-1394; Kuhn, et al. (1991) *Science* 254:707-710; Capecchi (1989) *Science* 244:1288; Robertson (1987) (ed.) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* IRL Press, Oxford; y Rosenberg (1992) *J. Clinical Oncology* 10:180-199.

Las secuencias homólogas de ácidos nucleicos, cuando se comparan, exhiben similitud significativa, o identidad. Los patrones de homología en ácidos nucleicos son medidas de homología usadas en general en la técnica mediante la comparación de secuencias o basadas en las condiciones de hibridación. Las condiciones de hibridación se describen con más detalle más adelante.

La homología sustancial en el contexto de la comparación de secuencias de ácidos nucleicos significa que al comparar los segmentos, o sus cadenas complementarias, son idénticos cuando se alinean de forma óptima, con inserciones o deleciones apropiadas de nucleótidos, en al menos alrededor del 50% de los nucleótidos, generalmente al menos alrededor del 56%, más generalmente al menos alrededor del 59%, habitualmente al menos alrededor del 62%, más habitualmente al menos alrededor del 65%, a menudo al menos alrededor del 68%, más a menudo al menos alrededor del 71%, típicamente al menos alrededor del 74%, más típicamente al menos alrededor del 77%, normalmente al menos alrededor del 80%, más normalmente al menos alrededor del 85%, preferiblemente al menos alrededor del 90%, más preferiblemente al menos alrededor del 95 al 98% o más, y en las realizaciones particulares, hasta alrededor del 99% o más de los nucleótidos. De forma alternativa, existe homología sustancial cuando los segmentos hibriden en condiciones de hibridación selectivas con una cadena, o su complemento, típicamente usando una secuencia derivada de las ID SEC N°s: 1-14. Típicamente, la hibridación selectiva ocurrirá cuando hay al menos alrededor del 55% de homología a lo largo de un tramo de al menos alrededor de 30 nucleótidos, preferiblemente al menos alrededor del 65% a lo largo de un tramo de al menos alrededor de 25 nucleótidos, más preferiblemente al menos alrededor del 75%, y lo más preferiblemente al menos alrededor del 90% a lo largo de alrededor de 20 nucleótidos. Véase, Kanehisa (1984) *Nuc. Acids Res.* 12:203-213. La longitud de la comparación de la homología, como se describe, puede ser a lo largo de tramos más largos, y en ciertas realizaciones será a lo largo de un tramo de al menos alrededor de 17 nucleótidos, habitualmente al menos alrededor de 20 nucleótidos, más habitualmente al menos alrededor de 24 nucleótidos, típicamente al menos alrededor de 28 nucleótidos, más típicamente al menos alrededor de 40 nucleótidos, preferiblemente al menos alrededor de 50 nucleótidos, y más preferiblemente al menos alrededor de 75 a 100 o más nucleótidos. Los cebadores de PCR tendrán en general niveles elevados de coincidencia a lo largo de longitudes potencialmente más cortas.

Las condiciones restrictivas, en lo que se refiere a la homología en el contexto de la hibridación, serán condiciones combinadas restrictivas de salinidad, temperatura, disolventes orgánicos y otros parámetros, típicamente aquellos controlados en las reacciones de hibridación. Las condiciones restrictivas de temperatura incluirán habitualmente temperaturas superiores a alrededor de 30°C, más habitualmente superiores a alrededor de 37°C, típicamente superiores a
 5 alrededor de 45°C, más típicamente superiores a alrededor de 55°C, preferiblemente superiores a alrededor de 65°C, y más preferiblemente superiores a alrededor de 70°C. Las condiciones restrictivas de salinidad serán habitualmente menores de alrededor de 1000 mM, normalmente menores de alrededor de 500 mM, más normalmente menores de
 10 alrededor de 400 mM, típicamente menores de alrededor de 300 mM, preferiblemente menores de alrededor de 200 mM, y más preferiblemente menores de alrededor de 150 mM, p. ej., 20-50 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medida de cualquier parámetro independiente. Véase, p. ej., Wetmur y Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31:349-370.

Las quimiocinas o receptores correspondientes de otra especie estrechamente relacionada se pueden clonar y aislar mediante hibridación interespecie. De forma alternativa, se puede reconocer que las secuencias de una base de datos
 15 de secuencias poseen similitud. La homología puede ser muy baja entre especies lejanamente relacionadas, y así es conveniente la hibridación de especies estrechamente relacionadas. De forma alternativa, puede ser útil la preparación de una preparación de anticuerpo que exhibe menos especificidad de especie en las aproximaciones de clonado de expresión. También se usarán las aproximaciones de PCR mediante el uso de segmentos de secuencias conservadas.

20 VII. Producción de quimiocinas o receptores; moléculas miméticas

El ADN que codifica la quimiocina, el receptor o sus fragmentos respectivos se puede obtener mediante síntesis química, cribado de bibliotecas de cADN, o cribando bibliotecas genómicas preparadas a partir de una amplia
 25 diversidad de líneas celulares o muestras de tejido.

Este ADN se puede expresar en una amplia diversidad de células hospedadoras para la síntesis de un ligando de longitud completa o de fragmentos que se pueden usar a su vez, por ejemplo, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales; para estudios de unión; para la construcción y expresión de moléculas modificadas; para el clonado de
 30 expresión o purificación; y para estudios de estructura/función. Cada antígeno o sus fragmentos se pueden expresar en células hospedadoras que se transforman o se transfectan con vectores de expresión apropiados. Estas moléculas se pueden purificar sustancialmente para que estén exentas de contaminantes proteicos o celulares, distintos de los derivados del hospedador recombinante, y por lo tanto son particularmente útiles en las composiciones farmacéuticas cuando se combinan con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los antígenos o anticuerpos, o sus porciones, se pueden expresar como fusiones con otras proteínas.

Los vectores de expresión son típicamente construcciones de ADN o ARN de replicación autónoma que contienen el gen del antígeno deseado o sus fragmentos, habitualmente unido de forma operable a elementos de control genético adecuados que son reconocidos en una célula hospedadora adecuada. Estos elementos de control son capaces de efectuar la expresión dentro de un hospedador adecuado. El tipo específico de elementos de control necesarios para efectuar
 40 la expresión dependerá de la célula hospedadora utilizada. En general, los elementos de control genético pueden incluir un sistema promotor procariota o un sistema de control de la expresión de promotor eucariota, e incluye típicamente un promotor transcripcional, un operador opcional para controlar el inicio de la transcripción, potenciadores de la transcripción para elevar el nivel de expresión del ARNm, una secuencia que codifica un sitio adecuado de unión al ribosoma, y secuencias que terminan la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión también contienen habitualmente un origen de replicación que permite que el vector se replique independientemente de la célula hospedadora.

Los vectores de esta invención contienen ADN que codifica realizaciones de una quimiocina, receptor, o un fragmento suyo, que codifican típicamente un polipéptido biológicamente activo. El ADN puede estar bajo control de un promotor viral y puede codificar un marcador de selección. Esta invención contempla además el uso de los vectores
 50 de expresión que son capaces de expresar cADN eucariota que codifica cada quimiocina o receptor en un hospedador procariota o eucariota, en el que el vector es compatible con el hospedador y en el que el cADN eucariota que codifica la proteína se inserta en el vector de forma que el cultivo del hospedador que contiene el vector expresa el cADN en cuestión. Normalmente, los vectores de expresión se diseñan para la replicación estable en sus células hospedadoras o para la amplificación para incrementar enormemente el número total de copias del gen deseado por célula. No siempre es necesario que un vector de expresión se replique en una célula hospedadora, p. ej., es posible efectuar la expresión transitoria del ligando o de sus fragmentos en diversos hospedadores mediante el uso de vectores que no contienen un origen de replicación que es reconocido por la célula hospedadora. También es posible usar vectores que provocan la integración de un gen de quimiocina o de receptor o de sus fragmentos en el ADN hospedador mediante recombinación, o integrar un promotor que controla la expresión de un gen endógeno.

Los vectores, como se usan aquí, comprenden plásmidos, virus, bacteriófagos, fragmentos de ADN integrables y otros vehículos, que incluyen aquellos que permiten la integración de los fragmentos de ADN en el genoma del hospedador. Los vectores de expresión son vectores especializados que contienen elementos de control genético que efectúan la expresión de los genes unidos de forma operable. Los plásmidos son la forma de vector más habitualmente
 65 usada, pero son adecuadas para el uso aquí muchas otras formas de vectores que proporcionan una función equivalente y que son, o pasan a ser, conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Pouwels, *et al.* (1985 y suplementos) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., y Rodríguez, *et al.* (1988) (eds.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworth, Boston, MA.

Las células transformadas incluyen células, preferiblemente de mamíferos, que se han transformado o transfectado con un vector que contiene un gen de quimiocina o de receptor construido mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Las células hospedadoras transformadas habitualmente expresan el ligando, receptor o sus fragmentos, pero para los fines de clonado, amplificación y manipulación de su ADN, no necesitan expresar la proteína. Esta invención contempla además cultivar las células transformadas en un medio nutriente, por lo que se permite que la proteína se acumule en el cultivo. La proteína se puede recuperar del cultivo o del medio de cultivo, o de las membranas celulares.

Para el propósito de esta invención, las secuencias de ADN se unen de forma operable cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o señal de secreción se une de forma operable a un polipéptido si se expresa como una preproteína o participa en dirigir al polipéptido a la membrana celular o en la secreción del polipéptido. Un promotor se une de forma operable a una secuencia codificante si controla la transcripción del polipéptido; un sitio de unión al ribosoma se une de forma operable a una secuencia codificante si se posiciona para permitir la traducción. Normalmente, unido de forma operable significa contiguo y en el marco de lectura, sin embargo, ciertos elementos genéticos tales como los genes represores no se unen de forma contigua, pero aún así se unen a las secuencias operadoras que a su vez controlan la expresión.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen procariotas, eucariotas inferiores y eucariotas superiores. Los procariotas incluyen tanto organismos gram negativos como organismos gram positivos, p. ej. *E. coli* y *B. subtilis*. Los eucariotas inferiores incluyen levaduras, p. ej., *S. cerevisiae* y *Pichia*, y especies del género *Dictyostelium*. Los eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de cultivo de tejidos de células animales, tanto de origen no mamífero, p. ej. células de insecto y pájaros, como de origen mamífero, p. ej. humanos, primates y roedores.

Los sistemas hospedador procariota-vector incluyen una amplia diversidad de vectores para muchas especies diferentes. Como se usa aquí, *E. coli* y sus vectores se usarán de forma genérica para incluir vectores equivalentes usados en otros procariotas. Un vector representativo para amplificar ADN es pBR322 o muchos de sus derivados. Los vectores que se pueden usar para expresar estas quimiocinas o sus fragmentos incluyen, pero no se limitan a, vectores tales como los que contienen el promotor lac (serie pUC); promotor trp (pBR322-trp); promotor lpp (la serie pIN); promotores λ -pP o pR (pOTS); o promotores híbridos tales como ptac (pDR540). Véase Brosius, *et al.* (1988) "Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac-, and lpp-derived Promoters", en Rodríguez y Denhardt (eds.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworth, Boston, capítulo 10, págs. 205-236.

Los eucariotas inferiores, p. ej., levaduras y *Dictyostelium*, se pueden transformar con ácidos nucleicos que contienen una secuencia de quimiocina o de receptor. Para el propósito de esta invención, el hospedador eucariota inferior más habitual es la levadura de cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*. Se usará para representar de forma genérica los eucariotas inferiores, aunque también hay disponibles otras cepas y especies. Los vectores de levadura consisten típicamente en un origen de replicación (a menos que sean del tipo de integración), un gen de selección, un promotor, el ADN que codifica la proteína deseada o sus fragmentos, y secuencias para la terminación de la traducción, la poliadenilación, y la terminación de la transcripción. Los vectores de expresión adecuados para levadura incluyen promotores constitutivos tales como los promotores génicos de la 3-fosfoglicerato quinasa y otras diversas enzimas glicolíticas o promotores inducibles tales como el promotor de alcohol deshidrogenasa 2 o el promotor de metalotionina. Los vectores adecuados incluyen los derivados de los siguientes tipos: replicación autónoma de bajo número de copias (tal como la serie YRp), replicación autónoma de elevado número de copias (tal como la serie YE_p); tipos de integración (tal como la serie YIp), o minicromosomas (tal como la serie YCp).

Las células de cultivo tisular de eucariotas superiores son las células hospedadoras preferidas para la expresión de las proteínas de quimiocina o de receptor funcionalmente activas. En principio, la mayoría de las líneas celulares de cultivo tisular de eucariotas superiores son factibles, p. ej., sistemas de expresión con baculovirus de insectos, ya sean de origen invertebrado o vertebrado. Sin embargo, se prefieren las células mamíferas, ya que el procesamiento, tanto de forma cotraduccional como de forma postraduccional, será típicamente más parecido al natural. La transformación o la transfección y la propagación de tales células se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas celulares útiles incluyen células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares de riñón de rata recién nacida (BRK), líneas celulares de insecto, líneas celulares aviares, y líneas celulares de mono (COS). Los vectores de expresión para tales líneas celulares incluyen normalmente un origen de replicación, un promotor, un sitio de iniciación de la traducción, sitios de corte y empalme del ARN (si se usa ADN genómico), un sitio de poliadenilación, y un sitio de terminación de la transcripción. Estos vectores también contienen normalmente un gen de selección o un gen de amplificación. Los vectores de expresión adecuados pueden ser plásmidos, virus o retrovirus que portan promotores derivados, p. ej., de orígenes tales como adenovirus, SV40, parvovirus, virus vaccinia, o citomegalovirus. Los ejemplos representativos de los vectores de expresión adecuados incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, *et al.* (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:1136-1142; pMC1neo Poly-A, véase Thomas, *et al.* (1987) *Cell* 51:503-512; y un vector de baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610.

A menudo se deseará expresar un polipéptido de quimiocina o de receptor en un sistema que proporciona un patrón de glicosilación específico o definido. En este caso, el patrón habitual será el proporcionado de forma natural por el sistema de expresión. Sin embargo, el patrón será modificable exponiendo al polipéptido, p. ej., una forma sin glicosilar, a proteínas apropiadas de glicosilación introducidas en un sistema de expresión heterólogo. Por ejemplo, un gen de quimiocina o de receptor se puede cotransformar con uno o más genes que codifican enzimas de glicosilación de mamífero o de otro origen. Mediante el uso de esta aproximación, se podrán conseguir o será posible aproximarse a ciertos patrones de glicosilación de mamíferos en células procariotas o de otro origen.

Una quimiocina, receptor, o un fragmento suyo se puede modificar para estar unido mediante fosfatidil inositol (PI) a una membrana celular, pero se puede separar de las membranas mediante tratamiento con una enzima que escinde fosfatidil inositol, p. ej., fosfatidil inositol fosfolipasa-C. Esta libera el antígeno en una forma biológicamente activa, y permite la purificación mediante procedimientos estándar de química de proteínas. Véase, p. ej., Low (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 988:427-454; Tse, *et al.* (1985) *Science* 230:1003-1008; y Brunner, *et al.* (1991) *J. Cell Biol.* 114:1275-1283.

Una vez que se han caracterizado estas quimiocinas y receptores, se pueden preparar fragmentos o derivados suyos mediante procedimientos convencionales de síntesis de péptidos. Estos incluyen procedimientos tales como los descritos en Stewart y Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky y Bodanszky (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Nueva York; y Bodanszky (1984) *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Nueva York. Por ejemplo, se puede usar un procedimiento con azida, un procedimiento con ácido clorhídrico, un procedimiento con anhídrido de ácido, un procedimiento con anhídrido mixto, un procedimiento con éster activo (por ejemplo, éster de p-nitrofenilo, éster de N-hidroxisuccinimida, o éster de cianometilo), un procedimiento con carbodiimidazol, un procedimiento de oxidación-reducción, o un procedimiento aditivo con dicitclohexilcarbodiimida (DCCD). Las síntesis en fase sólida y en fase de disolución son aplicables a los procedimientos anteriormente mencionados.

Estas quimiocinas, receptores, fragmentos o derivados se preparan de forma adecuada de acuerdo con los procedimientos anteriores tal como se emplean típicamente en la síntesis de péptidos, en general mediante un procedimiento por etapas que comprende condensar un aminoácido al aminoácido terminal, en orden uno por uno, o mediante la unión de fragmentos peptídicos al aminoácido terminal. Los grupos amino que no se van a usar en la reacción de unión típicamente se protegen para evitar la unión en una localización incorrecta.

Si se adopta una síntesis en fase sólida, el aminoácido C-terminal se une típicamente a un portador o soporte insoluble a través de su grupo carboxilo. El portador insoluble no está limitado particularmente, mientras tenga capacidad de unión a un grupo carboxilo reactivo. Los ejemplos de tales portadores insolubles incluyen resinas de halometilo, tales como resina de clorometilo o resina de bromometilo, resinas de hidroximetilo, resinas de fenol, resinas de tert-alquiloxycarbonilo modificadas con hidrazida, y similares.

Se une un aminoácido con el grupo amino protegido en orden por medio de condensación de su grupo carboxilo activado y del grupo amino reactivo del péptido o cadena previamente formada para sintetizar el péptido por etapas. Después de sintetizar la secuencia completa, el péptido se separa del portador insoluble para producir el péptido. Esta aproximación en fase sólida fue descrita en términos generales, p. ej., por Merrifield, *et al.* (1963) en *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156.

El ligando preparado y sus fragmentos se pueden aislar y purificar de la mezcla de reacción por medio de separación de péptidos, p. ej., mediante extracción, precipitación, electroforesis y diversas formas de cromatografía y similares. Las diversas quimiocinas o receptores de esta invención se pueden obtener en grados variables de pureza dependiendo de su uso deseado. La purificación se puede realizar mediante el uso de las técnicas de purificación de proteínas descritas aquí o mediante el uso de los anticuerpos descritos aquí, p. ej., en cromatografía de afinidad por inmunoabsorción. Esta cromatografía de afinidad por inmunoabsorción se lleva a cabo típicamente, p. ej., uniando primero los anticuerpos a un soporte sólido, y después poniendo en contacto los anticuerpos unidos con lisados solubilizados de las células originarias apropiadas, lisados de otras células que expresan el ligando o receptor, o lisados o sobrenadantes de células que producen las proteínas deseadas como resultado de las técnicas de ADN, véase más adelante.

VIII. Usos

También se describen reactivos que tendrán utilidad en las aplicaciones diagnósticas como se describe en otra parte aquí, p. ej., en la descripción general de anomalías del desarrollo, o más adelante en la descripción de los equipos de diagnóstico. En particular, parece que GPR2 se expresa de forma selectiva en el subgrupo de células T Th2. Esto sugiere que los reactivos descritos aquí pueden tener valor en la caracterización de enfermedades relacionadas con Th2 o Th1, o en el tratamiento de los tipos de enfermedad respectivos actuando sobre los subgrupos selectivos de células T. Véase, p. ej., Romagnani (1997) *Current Op. Immunology* 9:773-775; Romagnani (1997) *The Th1/Th2 Paradigm in Disease* Springer-Verlag and Landes, Austin, TX.

Debido a que Vic es una quimiocina proinflamatoria, los antagonistas deberían bloquear tal respuesta. Tanto Vic como CTACK se encuentran en la piel, de forma que los antagonistas pueden ser útiles para bloquear la inflamación cutánea. Las quimiocinas pueden ser útiles para atraer células GPR2+, y pueden ser útiles como adyuvantes tumorales o inmunitarios.

Así, la reducción de los subgrupos Th2 en una enfermedad mediada por Th2 puede prevenir o mejorar los síntomas. A la inversa, el enriquecimiento de los subgrupos Th2 en una enfermedad mediada por Th1 puede ser eficaz, p. ej., inhibiendo el subgrupo Th1. En particular, las reacciones asmáticas o alérgicas se pueden regular mediante el uso de los métodos de la presente invención.

Esta invención también se refiere a reactivos con potencial terapéutico significativo. Estas quimiocinas y receptores (naturales o recombinantes), sus fragmentos, y las composiciones de unión, p. ej., anticuerpos hacia ellos, junto con los compuestos que se identifica que tienen afinidad de unión hacia ellos, deberían ser útiles en el tratamiento de trastornos asociados a la fisiología o el desarrollo anormal, que incluyen enfermedades inflamatorias, p. ej. asma. En particular, la modulación del tráfico de leucocitos es una actividad biológica probable, pero una distribución tisular más amplia podría sugerir una actividad biológica más extensa, que incluye, p. ej., efectos antivirales. La proliferación anormal, regeneración, degeneración y atrofia se pueden modular mediante el tratamiento terapéutico apropiado que usa las composiciones proporcionadas aquí. Por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado a la expresión anormal o a la señalización anormal por una quimiocina o ligando para un receptor debería ser un objetivo probable para un agonista o antagonista del ligando.

Se conocen diversas enfermedades asociadas a fisiología o desarrollo anormal en tipos celulares que se ha demostrado que poseen los ARNm de quimiocina o de receptor mediante análisis de transferencia de Northern. Véase Berkow (ed.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Merck & Co., Rahway, N.J.; y Thorn, *et al. Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, N.Y. Las anomalías del desarrollo o funcionales, p. ej., del sistema inmunitario, provocan anomalías y enfermedades médicas significativas que pueden ser susceptibles de prevención o tratamiento mediante el uso de las composiciones proporcionadas aquí. La presente invención enseña que diversas enfermedades relacionadas con la piel son trastornos susceptibles de análisis o diagnóstico determinando CTACK, Vic o GPR2. Por ejemplo, la probabilidad de rechazo cutáneo en una situación de injerto se debería determinar mediante la cantidad de CTACK y/o Vic presente. La disminución profiláctica puede ser útil para prevenir el reclutamiento de células T o NK dérmicas. La respuesta a diversos tumores cutáneos se puede determinar mediante la presencia o ausencia de CTACK y/o Vic.

Los anticuerpos hacia las quimiocinas o receptores, que incluyen las formas recombinantes, se pueden purificar y después usar de forma diagnóstica o terapéutica, solos o en combinación con otras quimiocinas, citocinas o sus antagonistas. Estos reactivos se pueden combinar para uso terapéutico con ingredientes activos o inertes adicionales, p. ej., en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales, p. ej., agentes inmunoadyuvantes, junto con estabilizantes y excipientes fisiológicamente inocuos. Estas combinaciones se pueden filtrar de forma estéril y colocar en formas farmacéuticas, tal como mediante liofilización en viales o almacenamiento en preparaciones acuosas estabilizadas. Esta invención también contempla el uso de anticuerpos o de sus fragmentos de unión, que incluyen formas que no se unen al complemento. Además, se pueden adoptar modificaciones para las moléculas de anticuerpo o sus fragmentos de unión al antígeno, que afectan a la farmacocinética o a la farmacodinámica de la entidad terapéutica.

Se puede realizar el cribado de fármacos mediante el uso de anticuerpos o receptores o sus fragmentos para identificar compuestos que tienen afinidad de unión para cada quimiocina o receptor, lo que incluye el aislamiento de los componentes asociados. Después se pueden utilizar ensayos biológicos posteriores para determinar si el compuesto tiene actividad de estimulación intrínseca y es, por lo tanto, un bloqueante o antagonista ya que bloquea la actividad del ligando. De forma similar, un compuesto que tiene actividad estimulante intrínseca puede activar el receptor, y así es un agonista ya que estimula la actividad de un ligando. Esta invención contempla además el uso terapéutico de anticuerpos hacia estas quimiocinas como antagonistas, o hacia los receptores como antagonistas o agonistas. Esta aproximación debería ser particularmente útil con otras variantes de especie de las quimiocinas o receptores.

Las cantidades de reactivos necesarias para la terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, que incluyen los medios de administración, el lugar de destino, el estado fisiológico del paciente, y los otros medicamentos administrados. Así, se deberían determinar las dosis de tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia de las diversas poblaciones, que incluyen subgrupos raciales, de edad, género, etc. Típicamente, las dosis usadas *in vitro* pueden proporcionar una orientación útil sobre las cantidades útiles para la administración *in situ* de estos reactivos. La experimentación con animales de las dosis eficaces para el tratamiento de trastornos particulares proporcionará una indicación predictiva adicional de la dosis humana. Se describen diversas consideraciones, p. ej., en Gilman, *et al.* (eds. 1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8ª ed., Pergamon Press; y Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. Los métodos de administración se discuten ahí y más adelante, p. ej., para administración oral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, difusión transdérmica, y otros. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen típicamente agua, solución salina, tampones, y otros compuestos descritos, p. ej., en el *Merck Index*, Merck & Co., Rahway, Nueva Jersey. Sería esperable habitualmente que los intervalos de dosis estuvieran en concentraciones menores de 1 mM, típicamente concentraciones menores de alrededor de 10 μ M, normalmente menores de alrededor de 100 nM, preferiblemente menores de alrededor de 10 pM (picomolar), y lo más preferiblemente menores de alrededor de 1 fM (femtomolar), con un vehículo apropiado. Se utilizarán a menudo formulaciones de liberación lenta, o un aparato de liberación lenta para la administración continua.

La selección de un régimen de administración para un agonista o antagonista terapéutico depende de diversos factores, que incluyen la velocidad de recambio sérico o tisular del agente terapéutico, la inmunogenicidad del agente terapéutico, o la accesibilidad de las células de interés. Preferiblemente, un régimen de administración maximiza la cantidad del agente terapéutico administrado al paciente de forma coherente con un nivel aceptable de efectos secundarios. Por lo tanto, la cantidad de agente terapéutico administrado depende en parte del agonista o antagonista particular y de la gravedad de la enfermedad que se está tratando. La orientación sobre la selección de las dosis apropiadas de anticuerpos se halla en la bibliografía sobre usos terapéuticos, p. ej., Bach *et al.*, capítulo 22, en Ferrone,

et al. (eds. 1985), *Handbook of Monoclonal Antibodies* Noges Publications, Park Ridge, NJ; y Russell, págs. 303-357, y Smith *et al.*, págs. 365-389, en Haber, *et al.* (eds. 1977) *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy* Raven Press, Nueva York, NY.

La determinación de la dosis apropiada la realiza el clínico, p. ej., mediante el uso de parámetros o factores que se sabe en la técnica que afectan al tratamiento o que se predice que afectan al tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo inferior que la dosis óptima, y se incrementa después mediante pequeños incrementos hasta que se consigue el efecto deseado u óptimo respecto de cualquier efecto secundario negativo. Los niveles de células CLA+ podrían ser indicadores importantes de cuándo se ha alcanzado una dosis eficaz. Preferiblemente, el anticuerpo o su composición de unión que se usará deriva de la misma especie que el animal al que se dirige el tratamiento, por lo que se minimiza la respuesta humoral hacia el reactivo.

Los intervalos de dosis semanales totales para los anticuerpos o sus fragmentos, que se unen específicamente a CTACK, oscilan generalmente alrededor de 1 ng, más generalmente alrededor de 10 ng, típicamente alrededor de 100 ng; más típicamente alrededor de 1 μ g, más típicamente alrededor de 10 μ g, preferiblemente alrededor de 100 μ g, y más preferiblemente alrededor de 1 mg por kilogramo de peso corporal. Aunque las cantidades superiores pueden ser más eficaces, las dosis menores tendrán típicamente menos efectos adversos. En general, el intervalo será menor de 100 mg, preferiblemente menor de alrededor de 50 mg, y más preferiblemente menor de alrededor de 25 mg por kilogramo de peso corporal.

Los intervalos de dosis semanales para los antagonistas, p. ej., anticuerpos, fragmentos de unión, oscilan alrededor de 10 μ g, preferiblemente al menos alrededor de 50 μ g, y más preferiblemente al menos alrededor de 100 μ g por kilogramo de peso corporal. En general, el intervalo será menor de alrededor de 1000 μ g, preferiblemente menor de alrededor de 500 μ g, y más preferiblemente menor de alrededor de 100 μ g por kilogramo de peso corporal. Las dosis se administran en un calendario que efectúa el tratamiento deseado y pueden ser periódicas durante periodos más cortos o más largos. En general, los intervalos serán de al menos alrededor de 10 μ g a alrededor de 50 mg, preferiblemente alrededor de 100 μ g a alrededor de 10 mg por kilogramo de peso corporal.

También se describen otros antagonistas de los ligandos, p. ej., muteínas. Los intervalos de dosis horarias para las muteínas oscilan al menos alrededor de 10 μ g, generalmente al menos alrededor de 50 μ g, típicamente al menos alrededor de 100 μ g, y preferiblemente al menos 500 μ g por hora. En general, la dosis será menor de alrededor de 100 mg, típicamente menor de alrededor de 30 mg, preferiblemente menor de alrededor de 10 mg, y más preferiblemente menor de alrededor de 6 mg por hora. Los intervalos generales serán de al menos alrededor de 1 μ g a alrededor de 1000 μ g, preferiblemente alrededor de 10 μ g a alrededor de 500 μ g por hora.

Los contextos particulares, p. ej. trasplantes o injertos de piel, pueden implicar la administración de los agentes terapéuticos en diferentes formas. Por ejemplo, en un injerto de piel, el tejido se puede sumergir en un medio estéril que contiene el agente terapéutico, lo que da como resultado un efecto profiláctico sobre la migración celular poco después de aplicar el injerto.

Se puede administrar una quimiocina, sus fragmentos, o anticuerpos hacia ella o sus fragmentos, antagonistas y agonistas, directamente al hospedador a ser tratado o, dependiendo del tamaño de los compuestos, puede ser deseable conjugarlos a proteínas portadoras tales como ovalbúmina o albúmina de suero antes de su administración. Las formulaciones terapéuticas se pueden administrar en muchas formulaciones farmacéuticas convencionales. Aunque es posible administrar solo el ingrediente activo, a menudo es preferible presentarlo en forma de una formulación farmacéutica. Las formulaciones comprenden típicamente al menos un ingrediente activo, como se definió anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables. Cada vehículo debería ser aceptable tanto farmacéuticamente como fisiológicamente en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes y no ser dañino para el paciente. Los vehículos pueden mejorar la duración de almacenamiento, la estabilidad, etc. Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (que incluye la subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones se pueden presentar de forma conveniente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia. Véase, p. ej., Gilman, *et al.* (eds. 1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8ª ed., Pergamon Press; y Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis, *et al.* (eds. 1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Dekker, Nueva York; Lieberman, *et al.* (eds. 1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Dekker, Nueva York; y Lieberman, *et al.* (eds. 1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Dekker, Nueva York. La terapia de esta invención se puede combinar, o usar en asociación, con otros agentes terapéuticos. Se aplicarán consideraciones similares a menudo a los reactivos basados en receptores.

La presente invención también proporciona la administración de anticuerpos o composiciones de unión de CTACK, Vic o GPR2 en combinación con las terapias conocidas, p. ej., esteroides, particularmente glucocorticoides, que alivian los síntomas asociados a las respuestas inflamatorias excesivas. Las dosis diarias de glucocorticoides oscilarán al menos alrededor de 1 mg, generalmente al menos alrededor de 2 mg, y preferiblemente al menos alrededor de 5 mg por día. En general, la dosis será menor de alrededor de 100 mg, típicamente menor de alrededor de 50 mg, preferiblemente menor de alrededor de 20 mg, y más preferiblemente al menos alrededor de 10 mg por día. En general, los intervalos serán de al menos alrededor de 1 mg a alrededor de 100 mg, preferiblemente alrededor de 2 mg a 50 mg por día.

La frase "cantidad eficaz" significa una cantidad suficiente para efectuar una respuesta deseada, o para mejorar un síntoma o un signo del trastorno cutáneo. Los hospedadores mamíferos típicos incluirán ratones, ratas, gatos, perros y primates, que incluyen humanos. Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como el trastorno a tratar, el estado de salud general del paciente, el método, la vía, y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Preferiblemente, el efecto dará como resultado un cambio en la cuantificación de al menos alrededor del 10%, preferiblemente al menos el 20%, 30%, 50%, 70%, o incluso 90% o más. Cuando están en combinación, una cantidad eficaz está en proporción respecto de una combinación de componentes, y el efecto no se limita a los componentes individuales solamente.

Una cantidad eficaz de agente terapéutico modulará los síntomas típicamente en al menos alrededor del 10%; habitualmente al menos alrededor del 20%; preferiblemente al menos alrededor del 30%; o más preferiblemente al menos alrededor del 50%. De forma alternativa, la modulación del movimiento significará que el movimiento o el tráfico de diversos tipos celulares se ve afectado. Ello dará como resultado, p. ej., cambios estadísticamente significativos y cuantificables en el número de células que se ven afectadas. Esto puede ser un incremento o disminución en el número de células de interés que son atraídas en un periodo de tiempo o en un área de interés.

La presente invención proporciona reactivos que tendrán utilidad en aplicaciones terapéuticas como se describió aquí, p. ej., en la descripción general para tratar trastornos asociados a enfermedades cutáneas. Véase, p. ej., Berkow (ed.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, NY; Gilman, et al. (eds. 1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8ª Ed., Pergamon Press; *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn; Langer (1990) *Science* 249:1527-1533; y *Merck Index*, Merck & Co., Rahway, Nueva Jersey.

Tanto las formas naturales como las recombinantes de las quimiocinas o de los receptores de esta invención son particularmente útiles en equipos y métodos de ensayo que son capaces de cribar compuestos en función de la actividad de unión a las proteínas. En los últimos años se han desarrollado varios métodos para automatizar los ensayos para permitir el cribado de decenas de miles de compuestos en un periodo corto. Véase, p. ej., Fodor, et al. (1991) *Science* 251:767-773, que describe los medios para ensayar la afinidad de unión mediante una diversidad de polímeros definidos sintetizados en un sustrato sólido. El desarrollo de ensayos adecuados se puede facilitar enormemente mediante la disponibilidad de grandes cantidades de quimiocina purificada soluble, como se proporciona mediante esta invención.

Por ejemplo, una vez que se ha definido estructuralmente un ligando normalmente se pueden descubrir los antagonistas. El ensayo de los análogos potenciales del ligando es ahora posible con el desarrollo de métodos de análisis sumamente automatizados que usan células que responden fisiológicamente. En particular, se descubrirán nuevos agonistas y antagonistas mediante el uso de las técnicas de cribado descritas aquí.

Se podrían usar también células viables para cribar en función de los efectos de los fármacos sobre la quimiocina respectiva o sobre las funciones mediadas por el receptor acoplado a proteína G, p. ej., las concentraciones de segundo mensajero, es decir, Ca^{++} ; cambios en la reserva de fosfato de inositol (véase, p. ej., Berridge (1993) *Nature* 361:315-325 o Billah y Anthes (1990) *Biochem. J.* 269:281-291); respuestas de modificación de la morfología celular; recambio de lípidos de fosfatidilinositol; una respuesta antiviral, y otros. Algunos métodos de detección permiten la eliminación de una etapa de separación, p. ej., un sistema de detección sensible a la proximidad. Las tinciones sensibles a calcio serán útiles para detectar las concentraciones de Ca^{++} , con un fluorímetro o con un aparato de separación de células activada por fluorescencia.

El diseño racional de fármacos se puede basar también en estudios estructurales de las formas moleculares de las quimiocinas, de otros efectores o análogos, o de los receptores. Los efectores pueden ser otras proteínas que intervienen en otras funciones en respuesta a la unión del ligando, u otras proteínas que interaccionan normalmente con el receptor. Un medio para determinar qué sitios interaccionan con otras proteínas específicas es una determinación física de la estructura, p. ej., cristalografía de rayos X o técnicas de RMN bidimensional. Estas proporcionarán orientación relativa a qué residuos de aminoácidos forman regiones de contacto molecular. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteínas, véase, p. ej., Blundell y Johnson (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, Nueva York.

Las quimiocinas o receptores purificados se pueden revestir directamente en placas para el uso en las técnicas de cribado de fármacos anteriormente mencionadas, y se pueden asociar con detergentes o lípidos. Sin embargo, los anticuerpos no neutralizantes, p. ej. hacia las quimiocinas o receptores, se pueden usar como anticuerpos de captura para inmovilizar la proteína respectiva en la fase sólida.

También son aplicables conceptos similares a las realizaciones de receptores de quimiocina de la invención.

IX. Equipos

También se describe el uso de proteínas de quimiocina o receptor, sus fragmentos, péptidos, composiciones de unión y sus productos de fusión en una diversidad de equipos y métodos diagnósticos para detectar la presencia del ligando, anticuerpos o receptores. Típicamente, el equipo tendrá un compartimento que contiene un péptido de quimiocina o receptor definido o un segmento génico o un reactivo que reconoce uno u otro, p. ej., reactivos de unión.

Un equipo para determinar la afinidad de unión de un compuesto de ensayo a una quimiocina o receptor comprendería típicamente un compuesto de ensayo; un compuesto marcado, por ejemplo un anticuerpo que tiene una afinidad de unión conocida por la proteína; una fuente de quimiocina o receptor (natural o recombinante); y un medio para separar el compuesto marcado unido del libre, tal como una fase sólida para inmovilizar el ligando o el receptor. Una vez que se criban los compuestos, aquellos que tienen una afinidad de unión adecuada por el ligando o el receptor se pueden analizar en ensayos biológicos adecuados, como se conoce en la técnica, para determinar si actúan como agonistas o antagonistas para el receptor. La disponibilidad de los polipéptidos recombinantes de quimiocina o receptor también proporciona patrones definidos para calibrar tales ensayos, o como muestras de control positivo.

Un equipo preferido para determinar la concentración de, por ejemplo, una quimiocina o un receptor en una muestra comprendería típicamente un compuesto marcado, p. ej., anticuerpo, que tiene una afinidad de unión conocida por el objetivo, una fuente de ligando o de receptor (natural o recombinante) y un medio para separar el compuesto marcado unido del libre, por ejemplo, una fase sólida para inmovilizar la quimiocina o el receptor. Se proporcionarán normalmente compartimentos que contienen los reactivos, e instrucciones para el uso o para la eliminación de los desechos.

Los anticuerpos, que incluyen los fragmentos de unión al antígeno, específicos para la quimiocina o el receptor, o sus fragmentos, son útiles en aplicaciones diagnósticas para detectar la presencia de concentraciones elevadas de quimiocina, receptor, y/o sus fragmentos. Tales ensayos diagnósticos pueden emplear lisados, células vivas, células fijadas, inmunofluorescencia, cultivos celulares, líquidos corporales, y además pueden implicar la detección de antígenos relacionados con el ligando o el receptor en suero, o similares. Los ensayos diagnósticos pueden ser homogéneos (sin una etapa de separación entre el reactivo libre y el complejo de antígeno) o heterogéneos (con una etapa de separación). Existen diversos ensayos comerciales, tales como radioinmunoanálisis (RIA), análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), enzimoimmunoanálisis (EIA), técnica de inmunoanálisis multiplicado enzimáticamente (EMIT), inmunoanálisis fluorescente con sustrato marcado (SLFIA), y similares. Por ejemplo, se pueden emplear anticuerpos sin marcar usando un segundo anticuerpo que está marcado y que reconoce el anticuerpo primario hacia una quimiocina o receptor o hacia un fragmento particular suyo. Se han discutido exhaustivamente ensayos similares en la bibliografía. Véase, p. ej., Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH.

Los anticuerpos anti-idiotipo pueden tener usos similares para diagnosticar la presencia de anticuerpos contra una quimiocina o un receptor, y ello puede ser diagnóstico de diversos estados anormales. Por ejemplo, la sobreproducción de una quimiocina o de un receptor puede dar como resultado la producción de diversas reacciones inmunológicas que pueden ser diagnósticas de estados fisiológicos anormales, en particular en diversas enfermedades inflamatorias o asmáticas.

Frecuentemente, los reactivos para los ensayos diagnósticos se proporcionan en equipos para optimizar la sensibilidad del ensayo. Para la presente invención, dependiendo de la naturaleza del ensayo, el protocolo, y la molécula marcadora, se proporciona un anticuerpo marcado o sin marcar o una quimiocina o receptor marcado. Esto es así normalmente junto con otros aditivos, tales como tampones, estabilizantes, materiales necesarios para la producción de la señal tales como sustratos para enzimas, y similares. Preferiblemente, el equipo también contendrá instrucciones para el uso correcto y la eliminación de los contenidos después del uso. Típicamente, el equipo tiene compartimentos o recipientes para cada reactivo útil. De forma deseable, los reactivos se proporcionan en forma de un polvo liofilizado seco en el que los reactivos se pueden reconstituir en un medio acuoso, con lo que se proporcionan las concentraciones apropiadas de reactivos para realizar el ensayo.

Los constituyentes anteriormente mencionados del cribado de fármacos y de los ensayos diagnósticos se pueden usar sin modificación, o se pueden modificar en una diversidad de formas. Por ejemplo, el marcado se puede conseguir mediante la unión covalente o no covalente de un resto que proporciona directa o indirectamente una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos, el ligando, el compuesto de ensayo, la quimiocina, el receptor, o los anticuerpos hacia ellos se pueden marcar de forma directa o indirecta. Las posibilidades para el marcado directo incluyen grupos de marcadores: radiomarcadores tales como ^{125}I , enzimas (patente de EE.UU. n° 3.645.090) tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y marcadores fluorescentes (patente de EE.UU. n° 3.940.475) capaces de monitorizar el cambio en la intensidad de fluorescencia, el desplazamiento de la longitud de onda, o la polarización de fluorescencia. Las posibilidades para el marcado indirecto incluyen la biotinylation de un constituyente, seguido por la unión de avidina acoplada a uno de los grupos marcadores anteriores.

También hay numerosos métodos para separar el ligando unido del libre, o alternativamente el compuesto de ensayo unido del libre. La quimiocina o el receptor se pueden inmovilizar en diversas matrices, quizás con detergentes o lípidos asociados, seguido de lavado. Las matrices adecuadas incluyen plástico, tal como una placa de ELISA, filtros y esferas. Los métodos de inmovilización de la quimiocina o del receptor a una matriz incluyen, sin limitación, la adhesión directa al plástico, el uso de un anticuerpo de captura, la unión química y biotina-avidina. La última etapa en esta aproximación puede implicar la precipitación del complejo antígeno/anticuerpo mediante cualquiera de varios métodos, que incluyen aquellos que utilizan, p. ej., un disolvente orgánico tal como polietilenglicol o una sal tal como sulfato amónico. Otras técnicas de separación adecuadas incluyen, sin limitación, el método de partículas magnetizables con anticuerpos de fluoresceína descrito en Rattle, *et al.* (1984) *Clin. Chem.* 30:1457-1461, y la separación con partículas magnéticas con anticuerpos dobles como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.659.678.

Los métodos para unir proteínas o sus fragmentos a los diversos marcadores se han informado exhaustivamente en la bibliografía y no es necesaria una discusión detallada aquí. Muchas de las técnicas implican el uso de grupos carboxilo activados a través del uso de carbodiimida o de ésteres activos para formar enlaces peptídicos, la formación de tioéteres mediante reacción de un grupo mercapto con un halógeno activado tal como cloroacetilo, o una olefina activada tal como maleimida, para la unión, o similares. Las proteínas de fusión también tendrán utilidad en estas aplicaciones.

Otro aspecto diagnóstico descrito aquí implica el uso de secuencias oligonucleotídicas o polinucleotídicas tomadas de la secuencia de la quimiocina o el receptor. Estas secuencias se pueden usar como sondas para detectar los niveles del mensaje del ligando en las muestras de los pacientes que se sospecha que tienen un trastorno anormal, p. ej., un problema inflamatorio, fisiológico o del desarrollo. La preparación de secuencias nucleotídicas de ARN y ADN, el marcado de las secuencias, y el tamaño preferido de las secuencias ha recibido una amplia descripción y discusión en la bibliografía. Normalmente, una sonda oligonucleotídica debería tener al menos alrededor de 14 nucleótidos, normalmente al menos alrededor de 18 nucleótidos, y las sondas polinucleotídicas pueden ser hasta de varias kilobases. Se pueden emplear diversos marcadores, de forma más común radionucleidos, en particular ^{32}P . Sin embargo, se pueden emplear también otras técnicas, tales como usar nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido. La biotina sirve después como sitio para la unión a avidina o anticuerpos, que pueden estar marcados con una amplia diversidad de marcadores, tales como radionucleidos, moléculas fluorescentes, enzimas, o similares. De forma alternativa, se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer moléculas dobles específicas, que incluyen moléculas dobles de ADN, moléculas dobles de ARN, moléculas dobles híbridadas ADN-ARN, o moléculas dobles ADN-proteína. Los anticuerpos, a su vez, se pueden marcar y se puede llevar a cabo el ensayo en el que la molécula doble se une a una superficie, de forma que tras la formación de la molécula doble en la superficie, se puede detectar la presencia del anticuerpo unido a la molécula doble. El uso de sondas para el ARN antisentido nuevo se puede llevar a cabo en técnicas convencionales tales como hibridación de ácidos nucleicos, cribado más/menos, uso de sondas recombinantes, traducción permitida por hibridación (HRT), y traducción detenida por hibridación (HART). Esto también incluye las técnicas de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

También se contemplan equipos diagnósticos que también analizan la presencia cualitativa o cuantitativa de otros marcadores. La diagnosis o la prognosis puede depender de la combinación de múltiples indicaciones usadas como marcadores. Así, los equipos pueden analizar combinaciones de marcadores. Véase, p. ej., Viallet, *et al.* (1989) *Progress in Growth Factor Res.* 1:89-97.

X. Receptor; ligandos para receptores

Al haber identificado una molécula de unión de ligando de una interacción específica, existen métodos para aislar la molécula contraria. Véase Gearing, *et al.* *EMBO J.* 8:3667-4676 o McMahon, *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:2821-2832. Por ejemplo, se pueden determinar los medios para marcar una quimiocina sin interferir en la unión a su receptor. Por ejemplo, se puede fusionar un marcador de afinidad al extremo amino o carboxilo del ligando. Se puede cribar una biblioteca de expresión en función de la unión específica de la quimiocina, p. ej. mediante separación de células, u otro cribado para detectar subpoblaciones que expresan el componente de unión. Véase, p. ej., Ho, *et al.* (1993) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 90:11267-11271. De forma alternativa, se puede usar un método de fijación. Véase, p. ej., Seed y Aruffo (1987) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 84:3365-3369.

Con un receptor, existen medios para identificar el ligando. Se pueden usar métodos para utilizar el receptor, p. ej. en una membrana celular, para cribar el ligando mediante, p. ej., el análisis de una señal asociada a la proteína G común, tal como el flujo de Ca^{++} . Véase Lerner (1994) *Trends in Neurosciences* 17:142-146. Es probable que los ligandos para estos receptores sean quimiocinas.

Se pueden aplicar técnicas de entrecruzamiento de proteínas con marcadores para aislar moléculas de unión de una quimiocina. Esto permitiría la identificación de una proteína que interacciona específicamente con una quimiocina, p. ej., de una manera similar a ligando-receptor.

El amplio alcance de esta invención se entiende mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar la invención a realizaciones específicas.

Ejemplos

I. Métodos generales

Algunos de los métodos estándar están descritos o se hace referencia a ellos, p. ej., en Maniatis, *et al.* (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook, *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2ª ed.), vols. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel, *et al.*, *Biology*, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; o Ausubel, *et al.* (1987 y suplementos) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene/Wiley, Nueva York; Innis, *et al.* (eds.) (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Academic Press, N.Y. Los métodos para la purificación de proteínas incluyen métodos tales como precipitación con sulfato amónico, cromatografía en columna, electroforesis, centrifugación, cristalización y otros. Véase, p. ej., Ausubel, *et al.* (1987 y suplementos periódicos); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification" en *Methods in Enzymology*,

vol. 182, y otros volúmenes en esta serie; la bibliografía del fabricante sobre el uso de productos de purificación de proteínas, p. ej., Pharmacia, Piscataway, N.J., o Bio-Rad, Richmond, CA; y Coligan, *et al.* (eds.) (1995 y suplementos periódicos) *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY. La combinación con técnicas recombinantes permiten la fusión con segmentos apropiados, p. ej., a una secuencia FLAG o un equivalente que se puede fusionar por medio de una secuencia eliminable mediante proteasas. Véase, p. ej., Hochuli (1989) *Chemische Industrie* 12:69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" en Setlow (ed.) *Genetic Engineering, Principle and Methods* 12:87-98, Plenum Press, N.Y.; y Crowe, *et al.* (1992) *QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System* QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA.

- 10 Se describen técnicas inmunológicas estándar, p. ej., en Hertenberg, *et al.* (eds. 1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology* vols. 1-4, Blackwell Science; Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; y *Methods in Enzymology* volúmenes 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162 y 163.

- 15 Se describen análisis de FACS en Melamed, *et al.* (1990) *Flow Cytometry and Sorting* Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY; Shapiro (1988) *Practical Flow Cytometry* Liss, Nueva York, NY; y Robinson, *et al.* (1993) *Handbook of Flow Cytometry Methods* Wiley-Liss, Nueva York, NY.

II. Cultivo celular y muestras de tejido

- 20 Se obtuvieron células primarias de humano adulto que incluían queratinocitos, melanocitos y fibroblastos dérmicos de Clonetics, y se cultivaron según las instrucciones del proveedor. La línea de células T $\gamma\delta$, 7-17, fue proporcionada amablemente por Richard Boismenu (The Scripps Institute, La Jolla, California). Para el tratamiento con citocina, las células se cultivaron con 10 ng/ml de hTNF- α más 3 ng/ml de hIL-1 β (R&D Systems) en medio de cultivo durante los tiempos indicados. Se separó la piel de la oreja de ratones BALB/c en epidermis y dermis tras incubación con un 2,5% de tripsina en PBS durante 30 minutos a 37°C. Se obtuvieron PBMC humanas de donantes sanos mediante sedimentación de eritrocitos seguida de sedimentación con Ficoll-Histopaque-1077 (Sigma Chem. Co.). Las células T humanas se purificaron de las PBMCs mediante el uso de una columna de enriquecimiento de células T (R&D Systems) según las instrucciones del fabricante.

30 III. Aislamiento de las secuencias que codifican CTACK, Vic o GPR2

La secuencia de CTACK de humano o de ratón está disponible fácilmente. ID SEC N°s: 11-14. Se pueden seleccionar cebadores de PCR o sondas de hibridación apropiadas. De forma similar para Vic y GPR2, ID SEC N°s: 1-10.

- 35 Análisis de secuencias. Las búsquedas mediante TBLASTN en la base de datos dbEST de Genbank y en una patentada, con las secuencias de las quimiocinas CC conocidas, identificó las ESTs para CTACK humano y murino, respectivamente. El cADN de CTACK murino, clon del consorcio IMAGE n° 316475, se obtuvo de Genome Systems como un inserto de EcoRI-NotI en el vector pT7T3-PacD. CTACK humano se obtuvo como un inserto de SalI-NotI en el vector pSPORT 3.0. La secuencia de nucleótidos de ambos clones se confirmó mediante secuenciación automatizada. Los sitios de escisión del péptido señal se predijeron mediante el uso del servidor SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/signalp/cbssignalp.html>). Las secuencias se alinearon mediante el uso de CLUSTAL W.

- 45 El GPR2 se aisló a partir de una biblioteca de cADN producida a partir de una biblioteca de cADN humano. Una secuencia parcial fue informada por Marchese, *et al.* (1994) *Genomics* 23:609-618. Se secuencian los clones de cADN individuales mediante el uso de métodos estándar, p. ej., el equipo Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA), y la secuencia se caracteriza adicionalmente.

- 50 Se han aislado y descrito otros homólogos de roedor. Una transferencia de Southern puede indicar el grado de homología entre especies, y se puede cribar una biblioteca de cADN o de ARNm para identificar una fuente apropiada de células. También se puede estudiar el estado fisiológico de muchos tipos diferentes de células para la expresión incrementada del gen.

- 55 Los análisis informáticos sugieren que los genes más relacionados son diversos receptores acoplados a proteína G. Estos incluyen los receptores de quimiocina y los receptores de proteasas, p. ej. trombina. Los motivos estructurales sugieren que el receptor puede contener motivos característicos de la familia de receptores de quimiocinas, y de la familia de receptores de proteasas. Los gráficos de hidrofobicidad y las comparaciones con otros GPCRs deberían permitir la predicción de los segmentos transmembrana. Véase, p. ej., Loetscher, *et al.* (1996) *J. Expt'l Med.* 184:963-969. Un análisis informático de las secuencias de GPCR indicará los residuos característicos de los miembros de la familia.

- 65 Otros homólogos de primate deberían ser aislables mediante el uso de la porción codificante completa de este clon humano como sonda de hibridación. La transferencia de Southern puede indicar el grado de homología entre especies, y se puede cribar una biblioteca de cADN o de ARNm para identificar una fuente celular apropiada. También se puede estudiar el estado fisiológico de muchos tipos diferentes de células para la expresión incrementada del gen.

Los receptores de quimiocina se consideran en general objetivos útiles para el descubrimiento de fármacos nuevos, en los que los agentes terapéuticos actuarían como agonistas o antagonistas en la unión de el/los ligando(s) natural(es)

del receptor. Estas interacciones receptor-ligando pueden dar como resultado procesos de inflamación, de reclutamiento celular, y/o de activación celular. El GPR2 está aumentado en la tiroiditis de Hashimoto y en la psoriasis.

Algunos de estos receptores son la puerta de entrada de agentes infecciosos, p. ej., virus. Por lo tanto, los agentes terapéuticos dirigidos contra el receptor de quimiocina pueden tener aplicación en estas enfermedades. Además, los receptores pueden ser importantes para determinar la estructura fundamental o las respuestas fisiológicas.

Otros homólogos de especie deberían ser aislables mediante el uso de la porción codificante completa de estos clones como sonda de hibridación. Una transferencia de Southern puede indicar el grado de homología entre especies, y se puede cribar una biblioteca de cADN o de ARNm para identificar una fuente de células apropiadas. También se puede estudiar el estado fisiológico de muchos tipos diferentes de células para la expresión incrementada del gen.

IV. Cartografía cromosómica

El cADN se marca, p. ej., mediante traslación de mella con biotina-14 dATP y se hibrida *in situ* a una concentración final de 5 ng/ μ l a metafases de dos machos normales. El método de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) se puede modificar a partir del descrito por Callen, *et al.* (1990) *Ann. Genet.* 33:219-221, ya que los cromosomas se tiñen antes del análisis tanto con yoduro de propidio (como tinción de contraste) como con DAPI (para la identificación de los cromosomas). Las imágenes de las preparaciones de metafases se capturan mediante una cámara CCD y se mejoran informáticamente. Se determina la identificación de los cromosomas marcados apropiados.

CTACK se colocó en el cromosoma 4 de ratón mediante análisis de retrocruzamiento interespecífico esencialmente como se describe en Kelner, *et al.* (1994) *Science* 266:1395-1399, excepto que en este caso se usó un fragmento de EcoRI/NotI de 400 pb de cDNA de CTACK de ratón para la transferencia de Southern. Se detectaron fragmentos de 14,5 y 8,9 kb en el ADN C57BL/6J digerido con BglI y se detectaron fragmentos de 8,9 y 4,4 kb en ADN de *M. spretus* digerido con BglI. La presencia o ausencia del fragmento específico de BglI de 4,4 kb se siguió en ratones retrocruzados. Se calcularon las distancias de recombinación mediante el uso de Map Manager, versión 2.6.5.

mCTACK se cartografía en la región proximal del cromosoma 4 de ratón. CTACK se colocó en el cromosoma 4 de ratón mediante análisis de retrocruzamiento interespecífico. Se tipificaron más de 98 animales. Una búsqueda de Genbank con la secuencia de hCTACK reveló que el gen para hCTACK se solapa con el extremo 3' terminal (después de la señal de poli A) del gen de la cadena α del receptor de IL-11, pero en la cadena opuesta. La cadena α de IL-11R está localizada en el cromosoma 9p13, una región sinténica con el brazo proximal del cromosoma 4 de ratón.

Se pueden usar métodos similares para cartografiar Vic y GPR2.

V. Análisis de distribución

Para la transferencia de Southern, se digirieron 5 μ g de cada biblioteca de cADN con las enzimas de restricción apropiadas para liberar el inserto, se sometieron a electroforesis en gel, y se transfirieron a una membrana Hybond-N⁺. Para la transferencia de Northern se aislaron todos los ARNs mediante el uso de RNazol B (TEL-TEST, Inc.) y se analizaron mediante electroforesis en un gel de 1% de formaldehído-agarosa y se transfirieron a una membrana Hybond-N⁺. Las transferencias de Northern y de Southern se hibridaron durante 16 h a 65 °C con sondas marcadas con ³²P obtenidas mediante cebado aleatorio (Prime-it; Stratagene) de toda la longitud de los insertos de clones de CTACK de ratón y humano. Tras la hibridación, las transferencias se lavaron en condiciones restrictivas y se expusieron con una película.

El análisis de transferencia de Southern de la expresión de CTACK en bibliotecas de cADN generadas a partir de muestras humanas incluyó: riñón fetal, pulmón e hígado, células mononucleares de sangre periférica (PBMC y PBMC-act) en reposo o activadas (act) con anti-CD3 y PMA, y células T (MOT72 y MOT72-act) en reposo o activadas con anti-CD28 y anti-CD3, GM-CSF más células dendríticas generadas con IL-4, monocitos levigados activados con LPS, IFN γ y anti-IL-10 o IL-10, células A549 (epiteliales) tratadas con IL-1 β , órganos y tejidos de adultos, enfermos y normales.

El análisis mediante transferencia de Northern de la expresión de CTACK en tejidos y órganos de ratón incluyó: epidermis y dermis derivada de piel de oreja, hígado, bazo, timo, ganglios linfáticos periféricos (GLP), y ganglios linfáticos de drenaje de la oreja (GL auriculares). El análisis de transferencia de Northern de la expresión de CTACK se realizó en queratinocitos primarios, melanocitos primarios, células 7-17 (línea de células T $\gamma\delta$) y fibroblastos dérmicos primarios sin tratar o tratados con TNF- α e IL-1 β . Esto, junto con los resultados de RT-PCR, sugiere que el ARN de CTACK se expresa en queratinocitos humanos y aumenta por las citocinas proinflamatorias.

De forma alternativa, los ARNs se trataron con DNaseI y se transcribieron inversamente, y los cADNs resultantes se usaron como moldes para la RT-PCR competitiva como se describe. Gilliland, *et al.* (1990) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:2725-2729; y Platzer, *et al.* (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:1179-1184. El fragmento de ADN competidor para CTACK se generó según Celi, *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:1047. Se usaron los siguientes cebadores para obtener un fragmento competidor de CTACK humano (155 pb): cebador de la hebra codificante 5'-CTGTACT CAGCTCTACCGAAAGCC-3' (véase la posición 99-122 de la ID SEC N°: 1); cebador de la hebra no codificante 5'-GCCCATTTTCCTTAGCATCCCATGCAGATGCTGCGTTGAGC-3' (véase la posición 336-316 + la posición

233-214 de la ID SEC N°: 1). El fragmento competidor para β -actina humana fue proporcionado amablemente por el Dr. J. Krüssel (Dep. de Ginecología y Obstetricia, Universidad Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemania; Krüssel, *et al.* (1997) *J. Reprod. Immunol.* 34:103-120). Los pares de cebadores usados para la PCR competitiva fueron los siguientes: cebador de la hebra codificante de CTACK humano (244 pb) 5'-CTGTA CTACGCTCTACCGAAA GCC-3' (véase la posición 99-122 de la ID SEC N°: 11); cebador de la hebra no codificante 5'-GCCCCATTTTCCT TAGCATCCC-3' (véase la posición 336-316 de la ID SEC N°: 11); cebador de la hebra codificante de β -actina humana 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3' (véase la ID SEC N°: 15); cebador de la hebra no codificante 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3' (véase la ID SEC N°: 16). Los productos de RT-PCR competitiva se cuantificaron en geles de agarosa digitalizados mediante el uso del paquete informático de análisis de imágenes Eagle Eye II (Stratagene).

Las muestras de ARN se transcribieron inversamente y se usaron como molde para amplificar CTACK y β -actina. La β -actina se usó para la normalización de los resultados, que se comparan con los niveles de expresión de ARNm de β -actina.

Estos estudios de expresión revelaron que CTACK es extremadamente específico de tejido. Se ensayaron más de 70 bibliotecas de cADN humano mediante transferencia de Southern, que incluyen 46 bibliotecas de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas y 25 bibliotecas de tejido normal y tejido enfermo. Básicamente, CTACK hibrida exclusivamente con las bibliotecas derivadas de piel normal o psoriásica. La transferencia de Southern con CTACK murino no revela una hibridación significativa con más de 45 bibliotecas de ratón derivadas de una diversidad de células y tejidos; sin embargo, este panel no incluyó una biblioteca derivada de piel.

Para determinar si CTACK murino se expresa también en la piel se realizó un análisis de transferencia de Northern mediante el uso de ARN generado tanto de la epidermis como de la dermis de piel de oreja de ratón o de otros órganos preferidos. Se detecta fácilmente una especie de ARN de 0,8 kb en la epidermis, solamente de forma débil en la dermis y no se detecta en absoluto en los otros órganos ensayados. La señal débil de la dermis se puede atribuir a la separación imperfecta de la epidermis y la dermis. Estos resultados indican que la expresión de CTACK no solamente es sumamente específica de tejido, sino que su expresión selectiva en la piel está restringida a la epidermis. Esto contrasta con otras quimiocinas tales como IP-10 e IL-8 que se expresan en la piel (Schroder (1995) *J. Invest. Dermatol.* 105:20S-24S; y Larsen, *et al.* (1989) *Immunology* 68:31-36), pero que también se expresan ampliamente fuera de este tejido (Rollins (1997) *Blood* 90:909-928).

Para determinar el origen celular de CTACK, se buscó ARNm en células derivadas de piel cultivadas que se dejaron sin tratar o se trataron con TNF- α más IL-1 β durante 6 h o 18 h. Estas citocinas proinflamatorias son importantes reguladores primarios de las respuestas inmunitarias en la piel y pueden inducir la expresión de otros mediadores inflamatorios, que incluyen quimiocinas. Schroder (1995) *J. Invest. Dermatol.* 105:20S-24S; Larsen, *et al.* (1989) *Immunology* 68:31-36; y Goebeler, *et al.* (1997) *J Invest Dermatol* 108:445-451. El mensaje de CTACK se detecta en queratinocitos humanos, el tipo celular predominante en la epidermis, y aumenta después de 6 h o 18 h de tratamiento con citocina. El análisis de RT-PCR competitiva confirma este resultado y demuestra una inducción de hasta 30 veces del mensaje de CTACK. Por contraste, otros tipos celulares derivados de piel tales como melanocitos, células T $\gamma\delta$ y fibroblastos dérmicos no expresan CTACK en ninguna de las condiciones ensayadas. Estos experimentos demuestran que el mensaje de CTACK se expresa de forma constitutiva, pero también se puede incrementar por señales inflamatorias.

La expresión regulada, específica de piel de CTACK hacen de él un candidato excelente para el reclutamiento selectivo de células T memoria de migración a la piel. Se estudió la capacidad de CTACK para quimioatraer diferentes subgrupos de células T.

Se han aplicado métodos exhaustivos de PCR cuantitativa, y la expresión de GPR2 humano es particularmente elevada en muestras mezcladas de pulmón de fumadores empedernidos, y células dendríticas procedentes de monocitos activados mediante IL-4 y LPS. Se detectaron cantidades muy elevadas en muestras de pulmón humano normal, células dendríticas activadas, línea de células MOT72 activadas, línea de células B JY activadas o en reposo, ovario fetal, tejido adiposo fetal, vesícula biliar fetal, eosinófilos, PBMC en reposo, y otros.

La expresión del homólogo de ratón parece ser paralela a la del homólogo de humano.

VI. Quimiotaxis

Se produjo CTACK de ratón recombinante en *E. coli* y se purificó mediante R&D Systems como se describió previamente para otras quimiocinas. Hedrick, *et al.* (1998) *Blood* 91:4242-4247. Se añadieron células T humanas totales en DMEM, pH 6,9, 1% de albúmina de suero bovino, a la cámara superior de la placa de cultivo Transwell de policarbonato de 3 μ m de poro (Costar) y se incubó con las concentraciones indicadas de quimiocina purificada en la cámara inferior durante 3 h. El número de células que migraron de cada subtipo se determinó mediante citometría de flujo de parámetros múltiples mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorocromo contra CLA (HECA-452), CD4, CD8, y CD45RO (Pharmingen). Se añadió un número conocido de microesferas de 15 μ m (Bangs Laboratories, Fishers, IN) a cada muestra antes del análisis para determinar el número absoluto de células que migran. Como ejemplo, una media de 6272 células CLA⁺ migraron en respuesta a la concentración óptima de CTACK comparado con 666 células con medio solo.

Los ensayos de quimiotaxis se realizaron con células T purificadas de sangre periférica humana, y las células T de migración a la piel se identificaron por su expresión de CLA. El CTACK murino recombinante quimioatrae células T CD4⁺ y CD8⁺ que coexpresan CLA. Por contraste, las células T CLA⁻, de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺, no responden de forma significativa a CTACK. Las células CLA⁺ migran solamente en presencia de un gradiente de CTACK, lo que indica que la respuesta es quimiotáctica y no inespecíficamente quimiocinética. En comparación, 6Ckine, un quimioatrayente conocido de células T (Nagira, *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:19518-19524; Hromas, *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:2554-2558; Hedrick y Zlotnik (1997) *J. Immunol.* 159:1589-1593), no solamente es un atrayente menos potente para células T CLA⁺, sino que también carece de especificidad por células CLA⁺, ya que atrae de forma preferente células CLA⁻. CTACK no atrae de forma eficaz células B o neutrófilos humanos. La carencia de un anticuerpo anti-CLA de ratón impide un análisis similar en el ratón.

El subgrupo de células T memoria CLA⁺ constituye una población asociada a la piel de células memoria que se extravasan preferentemente en sitios cutáneos normales (Bos, *et al.* (1993) *Arch. Dermatol. Res.* 285:179-183) e inflamados de forma crónica (Picker, *et al.* (1990) *Am. J. Pathol.* 136:1053-1068). Se ha demostrado que esta subpoblación está implicada en la inmunidad local y en las reacciones cutáneas inflamatorias. Santamaria Babi, *et al.* (1995) *Immunol. Res.* 14:317-324. Se ha propuesto que CLA dirige a las células T memoria a localizaciones cutáneas por medio de la interacción con su ligando vascular E-selectina. Picker, *et al.* (1991) *Nature* 349:796-799; y Berg, *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 174:1461-1466. Sin embargo, los neutrófilos expresan CLA (De Boer, *et al.* (1994) 174:1461-1466, De Boer, *et al.* (1994) *Immunology* 81:359-365) aunque no migran preferentemente a la piel. Además, la E-selectina se induce en el endotelio inflamado de localizaciones cutáneas y no cutáneas. Por lo tanto, la unión CLA/E-selectina no puede explicar completamente la migración específica hacia la piel de las células T memoria CLA⁺. Se expresan varias quimiocinas en la piel (Schroder (1995) *J. Invest. Dermatol.* 105:20S-24S) y pueden desempeñar un papel en la inflamación de este tejido (Larsen, *et al.* (1995) *J. Immunol.* 155:2151-2157; Santamaria Babi, *et al.* (1996) *Eur. J. Immunol.* 26:2056-2061; Sarris, *et al.* (1995) (véanse los comentarios) *Blood* 86:651-658); sin embargo, estas quimiocinas se expresan ampliamente (Rollins (1997) *Blood* 90:909-928). Aquí se describe una quimiocina nueva, CTACK, que se expresa de forma específica en la piel y quimioatrae selectivamente células T de migración específica hacia la piel CLA⁺. En conjunto, estos datos sugieren que CTACK puede proporcionar el reclutamiento dirigido por una señal específica de la piel de las células T memoria CLA⁺ hacia localizaciones cutáneas, y proporciona un objetivo potencial para regular de forma específica el tráfico de células T hacia la piel.

Se pueden realizar ensayos similares con Vic de primate o de roedor.

VII. Producción de anticuerpos

Se inmunizan mamíferos apropiados con cantidades apropiadas de CTACK, Vic, GPR2, o células transfectadas con los genes, p. ej., de forma intraperitoneal cada 2 semanas durante 8 semanas. Típicamente, se usan roedores, aunque otras especies deberían permitir la producción de anticuerpos selectivos y específicos. La inmunización final se administra de forma intravenosa (IV) a través de la vena de la cola.

Se pueden recoger anticuerpos policlonales genéricos. De forma alternativa, se pueden producir anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, cuatro días después de la inyección IV, se extrae el bazo y se fusiona con células SP2/0 y NS1. Se seleccionan los hibridomas resistentes a HAT, p. ej. mediante el uso de un protocolo diseñado por Stem Cell Technologies (Vancouver, BC). Después de 10 días de selección con HAT, los focos resistentes se transfieren a placas de 96 pocillos y se cultivan durante 3 días. Se analiza la unión a transfectantes NIH3T3/CTACK de superficie en los sobrenadantes que contienen anticuerpos, p. ej. mediante FACS. Se producen típicamente muchos mAbs de CTACK diferentes. Los anticuerpos se pueden aislar y modificar, p. ej., mediante marcado o mediante otros métodos como es habitual en la técnica. Véase, p. ej., Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY. Los métodos para conjugar reactivos magnéticos, entidades tóxicas, marcadores, unir los anticuerpos a sustratos sólidos, para filtrar de forma estéril, etc., se conocen en la técnica.

VIII. Purificación de células

Las células que responden a CTACK o Vic se pueden identificar mediante el uso de los reactivos descritos aquí. Por ejemplo, las células que son quimioatraídas hacia CTACK o Vic se pueden purificar de otras células recogiendo aquellas células que migran hacia CTACK o Vic. Tal quimiotaxis puede ser hacia una fuente de quimiocina, o puede ser a través de una membrana porosa o de otro sustrato. Véase anteriormente, en el ensayo de microquimiotaxis.

El análisis de las muestras humanas se puede estudiar de una manera similar. Se obtiene una muestra biológica, p. ej. sangre, muestra de biopsia tisular, lavado pulmonar o nasal, biopsia cutánea en sacabocados, de un individuo que padece un trastorno relacionado con la piel. Se realiza el análisis de las células que responden a CTACK o Vic, p. ej., mediante análisis de FACS, o medios similares.

IX. Antagonistas

Se pueden conseguir diversos antagonistas de CTACK o Vic. Por ejemplo, los anticuerpos contra la propia quimiocina pueden bloquear la unión del ligando a su receptor, por lo que sirve como un antagonista directo del receptor. Otros antagonistas pueden funcionar bloqueando la unión del ligando al receptor, p. ej., uniéndose al ligando de forma

que impiden la posibilidad de unión al receptor. Otros antagonistas, p. ej., antagonistas de muteína, se pueden unir al receptor sin provocar la señalización, por lo que bloquean la unión de un agonista verdadero. Muchos de éstos pueden servir para bloquear la señal transmitida a las células de interés, específicamente las células que responden a CTACK o Vic. Estas pueden ser células cutáneas, que incluyen células de Langerhans, fibroblastos o queratinocitos. En particular, la unión al receptor indica que ciertos anticuerpos contra epítomos que interaccionan con el ligando del receptor GPR2 deberían bloquear la unión del ligando.

La información sobre la importancia de residuos particulares se determina mediante el uso de procedimientos y análisis estándar. Se realiza un análisis de mutagénesis estándar, p. ej., generando muchas variantes diferentes en posiciones determinadas, p. ej., en las posiciones identificadas anteriormente, y estudiando las actividades biológicas de las variantes. Esto se puede realizar hasta el grado de determinar las posiciones que modifican la actividad, o para centrarse en las posiciones específicas para determinar los residuos que se pueden sustituir para mantener, bloquear o modular la actividad biológica.

De forma alternativa, los análisis de las variantes naturales pueden indicar qué posiciones toleran las mutaciones naturales. Esto puede ser el resultado del análisis poblacional de las variaciones entre individuos, o entre cepas o especies. Se analizan muestras de individuos seleccionados, p. ej., mediante análisis de PCR y secuenciación. Esto permite el estudio de los polimorfismos de la población.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un anticuerpo antagonista de quimiocina atrayente de células T cutáneas para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar la inflamación cutánea en un mamífero.
2. El uso de un anticuerpo antagonista del contractor intestinal vasoactivo para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar la inflamación cutánea en un mamífero.
- 10 3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha composición es para administración local, tópica, subcutánea, intradérmica o transdérmica.
4. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho antagonista se selecciona de:
- 15 i) un anticuerpo que neutraliza la quimiocina atrayente de células T cutáneas o el contractor intestinal vasoactivo; o
- ii) un anticuerpo que bloquea la unión del ligando de GPR2.
- 20 5. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho mamífero es objeto de un trasplante o injerto de piel.
6. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho antagonista se administra en combinación con un antibiótico, analgésico, agente terapéutico inmunosupresor, fármaco antiinflamatorio, factor de crecimiento o agente inmunoadyuvante.
- 25 7. Un método *in vitro* para producir un complejo ligando:receptor, que comprende poner en contacto:
- a) una quimiocina atrayente de células T cutáneas de mamífero con un receptor GPR2; o
- 30 b) un contractor intestinal vasoactivo de mamífero con un receptor GPR2; en el que al menos uno de dicho ligando o receptor es recombinante o purificado, por lo que permite que se forme dicho complejo.
8. El método de la reivindicación 7, en el que:
- 35 a) dicho complejo da como resultado un flujo de Ca^{++} ;
- b) dicho receptor GPR2 está en una célula;
- c) dicha formación del complejo da como resultado un cambio fisiológico en la célula que expresa dicho receptor GPR2;
- 40 d) dicha puesta en contacto se da en combinación con IL-2 y/o interferón- α ; o
- e) dicha puesta en contacto permite la detección cuantitativa de dicho ligando.
- 45 9. Un método para analizar en un compuesto la capacidad de afectar a la interacción receptor GPR2-ligando, y dicho método comprende comparar la interacción de GPR2 con el contractor intestinal vasoactivo o la quimiocina atrayente de células T cutáneas en presencia y ausencia de dicho compuesto.
- 50 10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es un anticuerpo contra GPR2, el contractor intestinal vasoactivo o la quimiocina atrayente de células T cutáneas.
- 55 11. Un método para identificar una célula que expresa un receptor para quimiocina atrayente de células T cutáneas o contractor intestinal vasoactivo, que comprende permitir que una célula migre hacia la quimiocina atrayente de células T cutáneas o hacia el contractor intestinal vasoactivo, en el que se identifica que dicha célula expresa el receptor si ésta migra.

ES 2 281 205 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- ID SEC Nº: 1 es la secuencia de nucleótidos de GPR2 de primate.
 ID SEC Nº: 2 es la secuencia de aminoácidos de GPR2 de primate.
 5 ID SEC Nº: 3 es la secuencia de nucleótidos de GPR2 de roedor.
 ID SEC Nº: 4 es la secuencia de aminoácidos de GPR2 de roedor.
 ID SEC Nº: 5 es la secuencia de nucleótidos de Vic de primate.
 10 ID SEC Nº: 6 es la secuencia de aminoácidos de Vic de primate.
 ID SEC Nº: 7 es la secuencia de nucleótidos alternativa de Vic de primate.
 ID SEC Nº: 8 es la secuencia de aminoácidos alternativa de Vic de primate.
 ID SEC Nº: 9 es la secuencia de nucleótidos de Vic de roedor.
 15 ID SEC Nº: 10 es la secuencia de aminoácidos de Vic de roedor.
 ID SEC Nº: 11 es la secuencia de nucleótidos de CTACK de primate.
 ID SEC Nº: 12 es la secuencia de aminoácidos de CTACK de primate.
 ID SEC Nº: 13 es la secuencia de nucleótidos de CTACK de roedor.
 20 ID SEC Nº: 14 es la secuencia de aminoácidos de CTACK de roedor.
 ID SEC Nº: 15 proporciona una secuencia cebadora de PCR de actina de primate.
 ID SEC Nº: 16 proporciona una secuencia cebadora de PCR de actina de primate.

25 <110> Schering Corporation

<120> Usos de Quimiocina y Receptor; Composiciones; Métodos

30 <130> DX0882X

<140>

<141>

35

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

40

<210> 1

<211> 1089

<212> ADN

45

<213> primate

<220>

<221> CDS

50

<222> (1)..(1086)

<400> 1

55

atg ggg acg gag gtt tta gag cag gtt tcc tgg ggc cat tac tct ggg 48
 Met Gly Thr Glu Val Leu Glu Gln Val Ser Trp Gly His Tyr Ser Gly
 1 5 10 15

gat gaa gag gac gca tac tcg gct gag cca ctg ccg gag ctt tgc tac 96
 Asp Glu Glu Asp Ala Tyr Ser Ala Glu Pro Leu Pro Glu Leu Cys Tyr
 20 25 30

60

aag gcc gat gtc cag gcc ttc agc cgg gcc ttc caa ccc agt gtc tcc 144
 Lys Ala Asp Val Gln Ala Phe Ser Arg Ala Phe Gln Pro Ser Val Ser
 35 40 45

65

ctg acg ctg gct gcg ctg ggt ctg gcc ggc aat ggc ctg gtc ctg gcc 192
 Leu Thr Leu Ala Ala Leu Gly Leu Ala Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala
 50 55 60

acc cac ctg gca gcc cga cgc gca gcg cgc tcg ccc acc tct gcc cac 240
 Thr His Leu Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ser Pro Thr Ser Ala His

ES 2 281 205 T3

	65	70	75	80	
5	ctg ctc cag ctg gcc Leu Leu Gln Leu Ala	ctg gcc gac ctc Leu Ala Asp Leu Leu	ttg ctg gcc ctg act Leu Ala Leu Thr Leu	ccc Pro	288
	85	90	95		
10	ttc gcg gca gca ggg gct ctt cag ggc tgg agt ctg gga agt gcc acc Phe Ala Ala Ala Gly Ala Leu Gln Gly Trp Ser Leu Gly Ser Ala Thr	100	105	110	336
15	tgc cgc acc atc tct ggc ctc tac tcg gcr tcc ttc cac gcc ggc ttc Cys Arg Thr Ile Ser Gly Leu Tyr Ser Ala Ser Phe His Ala Gly Phe	115	120	125	384
20	ctc ttc ctg gcc tgt atc agc gcc gac cgc tac gtg gcc atc gcg cga Leu Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Val Ala Ile Ala Arg	130	135	140	432
25	gcg ctc cca gcc ggg ccg cgg ccc tcc act ccc ggc cgc gca cac ttg Ala Leu Pro Ala Gly Pro Arg Pro Ser Thr Pro Gly Arg Ala His Leu	145	150	155	480
30	gtc tcc gtc atc gtg tgg ctg ctg tca ctg ctc ctg gcg ctg cct gcg Val Ser Val Ile Val Trp Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ala Leu Pro Ala	165	170	175	528
35	ctg ctc ttc agc cag gat ggg cag cgg gaa ggc caa cga cgc tgt cgc Leu Leu Phe Ser Gln Asp Gly Gln Arg Glu Gly Gln Arg Arg Cys Arg	180	185	190	576
40	ctc atc ttc ccc gag ggc ctc acg cag acg gtg aag ggg gcg agc gcc Leu Ile Phe Pro Glu Gly Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala	195	200	205	624
45	gtg gcg cag gtg gcc ctg ggc ttc gcg ctg ccg ctg ggc gtc atg gta Val Ala Gln Val Ala Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Val	210	215	220	672
50	gcc tgc tac gcg ctt ctg ggc cgc acg ctg ctg gcc gcc agg ggg ccc Ala Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro	225	230	235	720
55	gag cgc cgg cgt gcg ctg cgc gtc gtg gtg gct ctg gtg gcg gcc ttc Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Val Ala Leu Val Ala Ala Phe	245	250	255	768
60	gtg gtg ctg cag ctg ccc tac agc ctc gcc ctg ctg ctg gat act gcc Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ala	260	265	270	816
65	gat cta ctg gct gcg cgc gag cgg agc tgc cct gcc agc aaa cgc aag Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Pro Ala Ser Lys Arg Lys	275	280	285	864
	gat gtc gca ctg ctg gtg acc agc ggc ttg gcc ctc gcc cgc tgt ggc Asp Val Ala Leu Leu Val Thr Ser Gly Leu Ala Leu Ala Arg Cys Gly	290	295	300	912
	ctc aat ccc gtt ctc tac gcc ttc ctg ggc ctg cgc ttc cgc cag gac Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu Arg Phe Arg Gln Asp	305	310	315	960

ES 2 281 205 T3

```

ctg cgg agg ctg cta cgg ggt ggg agc tcg ccc tca ggg cct caa ccc 1008
Leu Arg Arg Leu Leu Arg Gly Gly Ser Ser Pro Ser Gly Pro Gln Pro
                    325                    330                    335

cgc cgc ggc tgc ccc cgc cgg ccc cgc ctt tct tcc tgc tca gct ccc 1056
Arg Arg Gly Cys Pro Arg Arg Pro Arg Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro
                    340                    345                    350

acg gag acc cac agt ctc tcc tgg gac aac tag 1089
Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp Asp Asn
                    355                    360

<210> 2
<211> 362
<212> PRT
<213> primate

Met Gly Thr Glu Val Leu Glu Gln Val Ser Trp Gly His Tyr Ser Gly
 1                    5                    10                    15

Asp Glu Glu Asp Ala Tyr Ser Ala Glu Pro Leu Pro Glu Leu Cys Tyr
                20                    25                    30

Lys Ala Asp Val Gln Ala Phe Ser Arg Ala Phe Gln Pro Ser Val Ser
                35                    40                    45

Leu Thr Leu Ala Ala Leu Gly Leu Ala Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala
 50                    55                    60

Thr His Leu Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ser Pro Thr Ser Ala His
 65                    70                    75                    80

Leu Leu Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro
                85                    90                    95

Phe Ala Ala Ala Gly Ala Leu Gln Gly Trp Ser Leu Gly Ser Ala Thr
                100                    105                    110

Cys Arg Thr Ile Ser Gly Leu Tyr Ser Ala Ser Phe His Ala Gly Phe
                115                    120                    125

Leu Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Val Ala Ile Ala Arg
                130                    135                    140

Ala Leu Pro Ala Gly Pro Arg Pro Ser Thr Pro Gly Arg Ala His Leu
                145                    150                    155                    160

Val Ser Val Ile Val Trp Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ala Leu Pro Ala
                165                    170                    175

Leu Leu Phe Ser Gln Asp Gly Gln Arg Glu Gly Gln Arg Arg Cys Arg
                180                    185                    190

Leu Ile Phe Pro Glu Gly Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala
                195                    200                    205

Val Ala Gln Val Ala Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Val
                210                    215                    220

```

ES 2 281 205 T3

Ala Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro
 225 230 235 240
 5 Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Val Ala Leu Val Ala Ala Phe
 245 250 255
 Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ala
 260 265 270
 10 Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Pro Ala Ser Lys Arg Lys
 275 280 285
 Asp Val Ala Leu Leu Val Thr Ser Gly Leu Ala Leu Ala Arg Cys Gly
 290 295 300
 15 Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu Arg Phe Arg Gln Asp
 305 310 315 320
 Leu Arg Arg Leu Leu Arg Gly Gly Ser Ser Pro Ser Gly Pro Gln Pro
 325 330 335
 20 Arg Arg Gly Cys Pro Arg Arg Pro Arg Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro
 340 345 350
 25 Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp Asp Asn
 355 360
 <210> 3
 <211> 1089
 30 <212> ADN
 <213> roedor
 <220>
 35 <221> CDS
 <222> (1)..(1086)
 40 <400> 3
 atg ggg acc aag ccc aca gag cag gtc tcc tgg gga ctt tac tcc ggg 48
 Met Gly Thr Lys Pro Thr Glu Gln Val Ser Trp Gly Leu Tyr Ser Gly
 1 5 10 15
 45 tac gat gag gag gcc tat tcg gtt ggg ccg ctg cca gag ctc tgt tac 96
 Tyr Asp Glu Glu Ala Tyr Ser Val Gly Pro Leu Pro Glu Leu Cys Tyr
 20 25 30
 aag gct gat gtc cag gct ttc agt cgg gcc ttc caa ccc agt gtc tcc 144
 Lys Ala Asp Val Gln Ala Phe Ser Arg Ala Phe Gln Pro Ser Val Ser
 35 40 45
 50 ctg atg gtg gct gta ctg ggt ctg gct ggc aat ggc cta gtc ttg gcc 192
 Leu Met Val Ala Val Leu Gly Leu Ala Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala
 50 55 60
 acc cat ctg gca gcc aga cga act acc cga tct ccc acc tcc gtt cac 240
 Thr His Leu Ala Ala Arg Arg Thr Thr Arg Ser Pro Thr Ser Val His
 65 70 75 80
 60 ctg ctc cag ttg gcc ctg gct gac ctt tta ttg gcc ctg act ttg cct 288
 Leu Leu Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro
 65

ES 2 281 205 T3

	85	90	95	
5	ttt gct gca gca ggg gct ctt cag ggc tgg aat cta gga agt acc acc Phe Ala Ala Ala Gly Ala Leu Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Thr Thr 100 105 110	336		
10	tgc cgt gcc atc tca ggc ctc tac tcg gcc tct ttc cac gct ggc ttc Cys Arg Ala Ile Ser Gly Leu Tyr Ser Ala Ser Phe His Ala Gly Phe 115 120 125	384		
15	ctc ttc cta gcc tgt atc agc gcc gac cgc tat gtg gcc atc gca cga Leu Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Val Ala Ile Ala Arg 130 135 140	432		
20	gct ctc cca gcc ggg cag cgg ccc tca acg cct agc cga gcg cac ttg Ala Leu Pro Ala Gly Gln Arg Pro Ser Thr Pro Ser Arg Ala His Leu 145 150 155 160	480		
25	gtt tca gtc ttc gtg tgg ctg ttg gcg ctg ttt ctg gct cta cct gcg Val Ser Val Phe Val Trp Leu Leu Ala Leu Phe Leu Ala Leu Pro Ala 165 170 175	528		
30	ctc ctt ttc agc cgg gac ggg cca cgt gaa ggc caa cga cgc tgt cgg Leu Leu Phe Ser Arg Asp Gly Pro Arg Glu Gly Gln Arg Arg Cys Arg 180 185 190	576		
35	ctc att ttt ccc gaa agc ctc acg cag act gtg aaa ggg gca agc gca Leu Ile Phe Pro Glu Ser Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala 195 200 205	624		
40	gtg gcg cag gtg gtc ctc ggc ttc gcg ctc cct ctg ggc gtc atg gca Val Ala Gln Val Val Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Ala 210 215 220	672		
45	gcc tgt tat gcg ctc ctg ggc cgc acg ctt ctg gcc gcc agg ggg cca Ala Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro 225 230 235 240	720		
50	gag cgg cgg cgt gca ctg cgc gtc gtg gtg gct ttg gtg gtg gcc ttc Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Val Ala Leu Val Val Ala Phe 245 250 255	768		
55	gtg gtg ctg cag ttg ccc tac agc ctt gcc ctg ctg ctg gat aca gcc Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ala 260 265 270	816		
60	gat cta ctg gca gcc cgc gag cgg agc tgc tcc tcc agc aag cgc aag Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Ser Ser Ser Lys Arg Lys 275 280 285	864		
65	gat cta gct ttg ctg gtc acc ggc ggc ttg acc ctg gtc cgt tgc agc Asp Leu Ala Leu Leu Val Thr Gly Gly Leu Thr Leu Val Arg Cys Ser 290 295 300	912		
70	ctc aat ccg gtg ctt tat gcc ttt ttg ggc ctg cgt ttc cgc cgg gac Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu Arg Phe Arg Arg Asp 305 310 315 320	960		
75	ctg cgg agg ctg ctc cag ggc gga gga tgc agc ccg aag ccc aac cct Leu Arg Arg Leu Leu Gln Gly Gly Gly Cys Ser Pro Lys Pro Asn Pro 325 330 335	1008		

ES 2 281 205 T3

cgt ggc cgc tgc ecc cgt cga ctc cgc ctt tct tcc tgc tct gct cct 1056
 Arg Gly Arg Cys Pro Arg Arg Leu Arg Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro
 340 345 350

act gag acc cac agt ctc tct tgg gac aac tag 1089
 Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp Asp Asn
 355 360

<210> 4

<211> 362

<212> PRT

<213> roedor

<400> 4

Met Gly Thr Lys Pro Thr Glu Gln Val Ser Trp Gly Leu Tyr Ser Gly
 1 5 10 15
 Tyr Asp Glu Glu Ala Tyr Ser Val Gly Pro Leu Pro Glu Leu Cys Tyr
 20 25 30
 Lys Ala Asp Val Gln Ala Phe Ser Arg Ala Phe Gln Pro Ser Val Ser
 35 40 45
 Leu Met Val Ala Val Leu Gly Leu Ala Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala
 50 55 60
 Thr His Leu Ala Ala Arg Arg Thr Thr Arg Ser Pro Thr Ser Val His
 65 70 75 80
 Leu Leu Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro
 85 90 95
 Phe Ala Ala Ala Gly Ala Leu Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Thr Thr
 100 105 110
 Cys Arg Ala Ile Ser Gly Leu Tyr Ser Ala Ser Phe His Ala Gly Phe
 115 120 125
 Leu Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Val Ala Ile Ala Arg
 130 135 140
 Ala Leu Pro Ala Gly Gln Arg Pro Ser Thr Pro Ser Arg Ala His Leu
 145 150 155 160
 Val Ser Val Phe Val Trp Leu Leu Ala Leu Phe Leu Ala Leu Pro Ala
 165 170 175
 Leu Leu Phe Ser Arg Asp Gly Pro Arg Glu Gly Gln Arg Arg Cys Arg
 180 185 190
 Leu Ile Phe Pro Glu Ser Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala
 195 200 205
 Val Ala Gln Val Val Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Ala
 210 215 220
 Ala Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro
 225 230 235 240

ES 2 281 205 T3

Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Val Ala Leu Val Val Ala Phe
 245 250 255
 Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ala
 260 265 270
 Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Ser Ser Ser Lys Arg Lys
 275 280 285
 Asp Leu Ala Leu Leu Val Thr Gly Gly Leu Thr Leu Val Arg Cys Ser
 290 295 300
 Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu Arg Phe Arg Arg Asp
 305 310 315 320
 Leu Arg Arg Leu Leu Gln Gly Gly Gly Cys Ser Pro Lys Pro Asn Pro
 325 330 335
 Arg Gly Arg Cys Pro Arg Arg Leu Arg Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro
 340 345 350
 Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp Asp Asn
 355 360

<210> 5
 <211> 731
 <212> ADN
 <213> primate

<220>
 <221> CDS
 <222> (56)..(436)

<220>
 <221> péptido mat
 <222> (122)..(436)

<220>
 <221> característica misc
 <222> (529)

<223> V; puede ser A, C, o G
 <400> 5

ggctgacga acagcctcac ttgtgttgct gtcagtgcca gtagggcagg cagga atg 58
 Met
 cag cag aga gga ctc gcc atc gtg gcc ttg gct gtc tgt gcg gcc cta 106
 Gln Gln Arg Gly Leu Ala Ile Val Ala Leu Ala Val Cys Ala Ala Leu
 -20 -15 -10
 cat gcc tca gaa gcc ata ctt ccc att gcc tcc agc tgt tgc acg gag 154
 His Ala Ser Glu Ala Ile Leu Pro Ile Ala Ser Ser Cys Cys Thr Glu
 -5 -1 1 5 10
 gtt tca cat cat att tcc aga agg ctc ctg gaa aga gtg aat atg tgt 202
 Val Ser His His Ile Ser Arg Arg Leu Leu Glu Arg Val Asn Met Cys
 15 20 25
 cgc atc cag aga gct gat ggg gat tgt gac ttg gct gct gtc atc ctt 250
 Arg Ile Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile Leu

ES 2 281 205 T3

```

      30              35              40
5    cat gtc aag cgc aga aga atc tgt gtc agc ccg cac aac cat act gtt 298
    His Val Lys Arg Arg Arg Ile Cys Val Ser Pro His Asn His Thr Val
      45              50              55

10   aag cag tgg atg aaa gtg caa gct gcc aag aaa aat ggt aaa gga aat 346
    Lys Gln Trp Met Lys Val Gln Ala Ala Lys Lys Asn Gly Lys Gly Asn
      60              65              70              75

15   gtt tgc cac agg aag aaa cac cat ggc aag agg aac agt aac agg gca 394
    Val Cys His Arg Lys Lys His His Gly Lys Arg Asn Ser Asn Arg Ala
      80              85              90

20   cat cag ggg aaa cac gaa aca tac ggc cat aaa act cct tat 436
    His Gln Gly Lys His Glu Thr Tyr Gly His Lys Thr Pro Tyr
      95              100             105

25   tagagagtct acagataaat ctacagagac aattcctcaa gtggacttgg ccatgattgg 496
    ttgtcctgca tactgatgaa actactgatg tcvgttggtc tgaaaggacc taccagaagc 556
    taaatctcca agaatgccat ttccctatcc ctaatgattc aatctcctt accctgacca 616
    atcagtggcc caaattttcc agccccctgc ctcccagaac cccagcccag aactcttcag 676
    agatttaaga atctctctct acctctcgac tcagcccat gtaatcatta aactc 731

```

```

30  <210> 6
    <211> 127
    <212> PRT
    <213> primate
35  <400> 6

```

```

40   Met Gln Gln Arg Gly Leu Ala Ile Val Ala Leu Ala Val Cys Ala Ala
      -20              -15              -10

    Leu His Ala Ser Glu Ala Ile Leu Pro Ile Ala Ser Ser Cys Cys Thr
      -5              -1   1              5              10

45   Glu Val Ser His His Ile Ser Arg Arg Leu Leu Glu Arg Val Asn Met
      15              20              25

    Cys Arg Ile Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile
      30              35              40

50   Leu His Val Lys Arg Arg Arg Ile Cys Val Ser Pro His Asn His Thr
      45              50              55

    Val Lys Gln Trp Met Lys Val Gln Ala Ala Lys Lys Asn Gly Lys Gly
      60              65              70

55   Asn Val Cys His Arg Lys Lys His His Gly Lys Arg Asn Ser Asn Arg
      75              80              85              90

60   Ala His Gln Gly Lys His Glu Thr Tyr Gly His Lys Thr Pro Tyr
      95              100             105

```

```

65  <210> 7
    <211> 543
    <212> ADN
    <213> primate

```

ES 2 281 205 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(492)

5

<400> 7

```

10      atg tcg cga ttg agg aga tac gag gtg gcg ctg gaa gcg gag gag gag    48
      Met Ser Arg Leu Arg Arg Tyr Glu Val Ala Leu Glu Ala Glu Glu Glu
          1              5              10              15

15      atc tac tgg ggc tgc ttc tac ttt ttt cct tgg ctg cga atg tgg cgc    96
      Ile Tyr Trp Gly Cys Phe Tyr Phe Phe Pro Trp Leu Arg Met Trp Arg
                20              25              30

20      agg gag cgg agt ccg atg tct cca aca agc cag aga cta agt ctg gaa    144
      Arg Glu Arg Ser Pro Met Ser Pro Thr Ser Gln Arg Leu Ser Leu Glu
                35              40              45

25      gcc ccc agc ctc cca ctg aga agc tgg cat ccg tgg aac aag act aag    192
      Ala Pro Ser Leu Pro Leu Arg Ser Trp His Pro Trp Asn Lys Thr Lys
          50              55              60

30      cag aag caa gaa gcc ttg cct ctg ccc tcc agc act agc tgc tgt act    240
      Gln Lys Gln Glu Ala Leu Pro Leu Pro Ser Ser Thr Ser Cys Cys Thr
          65              70              75              80

35      cag ctc tat aga cag cca ctc cca agc agg ctg ctg agg agg att gtc    288
      Gln Leu Tyr Arg Gln Pro Leu Pro Ser Arg Leu Leu Arg Arg Ile Val
                85              90              95

40      cac atg gaa ctg cag gag gcc gat ggg gac tgt cac ctc cag gct gtc    336
      His Met Glu Leu Gln Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Val
          100              105              110

45      gtg ctt cac ctg gct cgg cgc agt gtc tgt gtt cat ccc cag aac cgc    384
      Val Leu His Leu Ala Arg Arg Ser Val Cys Val His Pro Gln Asn Arg
          115              120              125

50      agc ctg gct cgg tgg tta gaa cgc caa ggg aaa agg ctc caa ggg act    432
      Ser Leu Ala Arg Trp Leu Glu Arg Gln Gly Lys Arg Leu Gln Gly Thr
          130              135              140

55      gta ccc agt tta aat ctg gta cta caa aag aaa atg tac tca aac ccc    480
      Val Pro Ser Leu Asn Leu Val Leu Gln Lys Lys Met Tyr Ser Asn Pro
          145              150              155              160

60      caa cag caa aac taataaagca acattagacg acaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa    532
      Gln Gln Gln Asn

65      aaaaaaaaaa a                                                    543

```

<210> 8

55 <211> 164

<212> PRT

<213> primate

60

65

ES 2 281 205 T3

<400> 8

```

5      Met Ser Arg Leu Arg Arg Tyr Glu Val Ala Leu Glu Ala Glu Glu Glu
      1          5          10          15

      Ile Tyr Trp Gly Cys Phe Tyr Phe Phe Pro Trp Leu Arg Met Trp Arg
      20          25          30

10     Arg Glu Arg Ser Pro Met Ser Pro Thr Ser Gln Arg Leu Ser Leu Glu
      35          40          45

      Ala Pro Ser Leu Pro Leu Arg Ser Trp His Pro Trp Asn Lys Thr Lys
      50          55          60

15     Gln Lys Gln Glu Ala Leu Pro Leu Pro Ser Ser Thr Ser Cys Cys Thr
      65          70          75          80

      Gln Leu Tyr Arg Gln Pro Leu Pro Ser Arg Leu Leu Arg Arg Ile Val
      85          90          95

20     His Met Glu Leu Gln Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Val
      100         105         110

      Val Leu His Leu Ala Arg Arg Ser Val Cys Val His Pro Gln Asn Arg
      115         120         125

25     Ser Leu Ala Arg Trp Leu Glu Arg Gln Gly Lys Arg Leu Gln Gly Thr
      130         135         140

      Val Pro Ser Leu Asn Leu Val Leu Gln Lys Lys Met Tyr Ser Asn Pro
      145         150         155         160

      Gln Gln Gln Asn

```

<210> 9

35 <211> 393

<212> ADN

<213> roedor

40 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(390)

45 <220>

<221> péptido mat

<222> (67)..(390)

50 <400> 9

```

      atg cag caa gca ggg ctc aca ctc atg gct gtg gct gtg tgt gtg gct 48
55     Met Gln Gln Ala Gly Leu Thr Leu Met Ala Val Ala Val Cys Val Ala
      -20          -15          -10

      ttt caa acc tca gaa gcc ata ctt ccc atg gcc tcc agc tgt tgc act 96
      Phe Gln Thr Ser Glu Ala Ile Leu Pro Met Ala Ser Ser Cys Cys Thr
      -5          -1 1          5          10

60     gag gtg tct cat cat gtt tcc gga aga ctt ctg gaa aga gtg agt tca 144
      Glu Val Ser His His Val Ser Gly Arg Leu Leu Glu Arg Val Ser Ser
      15          20          25

65     tgc agc atc cag aga gct gac ggg gac tgc gac ctg gct gct gtc atc 192

```

ES 2 281 205 T3

```

Cys Ser Ile Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile
      30              35              40
5      ctt cat gtt aaa cgt aga aga atc tgc atc agc ccg cac aat cgt act 240
      Leu His Val Lys Arg Arg Arg Ile Cys Ile Ser Pro His Asn Arg Thr
          45              50              55

      ttg aag cag tgg atg aga gcc tca gag gta aag aag aat ggc aga gaa 288
      Leu Lys Gln Trp Met Arg Ala Ser Glu Val Lys Lys Asn Gly Arg Glu
          60              65              70

      aac gtc tgt tct ggg aaa aaa caa ccc agc agg aag gac aga aaa ggg 336
      Asn Val Cys Ser Gly Lys Lys Gln Pro Ser Arg Lys Asp Arg Lys Gly
          75              80              85              90
15      cac act acg aga aag cac aga aca cgt gga aca cac agg cac gaa gcc 384
      His Thr Thr Arg Lys His Arg Thr Arg Gly Thr His Arg His Glu Ala
          95              100              105

20      tct cgt tag 393
      Ser Arg

```

<210> 10
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> roedor

30 <400> 10

```

Met Gln Gln Ala Gly Leu Thr Leu Met Ala Val Ala Val Cys Val Ala
      -20              -15              -10
35      Phe Gln Thr Ser Glu Ala Ile Leu Pro Met Ala Ser Ser Cys Cys Thr
          -5              -1 1              5              10

      Glu Val Ser His His Val Ser Gly Arg Leu Leu Glu Arg Val Ser Ser
          15              20              25
40      Cys Ser Ile Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile
          30              35              40

      Leu His Val Lys Arg Arg Arg Ile Cys Ile Ser Pro His Asn Arg Thr
          45              50              55

      Leu Lys Gln Trp Met Arg Ala Ser Glu Val Lys Lys Asn Gly Arg Glu
          60              65              70
50      Asn Val Cys Ser Gly Lys Lys Gln Pro Ser Arg Lys Asp Arg Lys Gly
          75              80              85              90

      His Thr Thr Arg Lys His Arg Thr Arg Gly Thr His Arg His Glu Ala
          95              100              105
55      Ser Arg

```

<210> 11
 <211> 362
 <212> ADN
 <213> primate

65 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)

ES 2 281 205 T3

<220>

<221> péptido mat

<222> (73)..(336)

5

<400> 11

```

10      atg aag ggg ccc cca acc ttc tgc agc ctc ctg ctg ctg tca ttg ctc   48
      Met Lys Gly Pro Pro Thr Phe Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
              -20                      -15                      -10

15      ctg agc cca gac cct aca gca gca ttc cta ctg cca ccc agc act gcc   96
      Leu Ser Pro Asp Pro Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Pro Ser Thr Ala
              -5                      -1  1                      5

20      tgc tgt act cag ctc tac cga aag cca ctc tca gac aag cta ctg agg   144
      Cys Cys Thr Gln Leu Tyr Arg Lys Pro Leu Ser Asp Lys Leu Leu Arg
              10                      15                      20

25      aag gtc atc cag gtg gaa ctg cag gag gct gac ggg gac tgt cac ctc   192
      Lys Val Ile Gln Val Glu Leu Gln Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu
              25                      30                      35                      40

30      cag gct ttc gtg ctt cac ctg gct caa cgc agc atc tgc atc cac ccc   240
      Gln Ala Phe Val Leu His Leu Ala Gln Arg Ser Ile Cys Ile His Pro
              45                      50                      55

35      cag aac ccc agc ctg tca cag tgg ttt gag cac caa gag aga aag ctc   288
      Gln Asn Pro Ser Leu Ser Gln Trp Phe Glu His Gln Glu Arg Lys Leu
              60                      65                      70

40      cat ggg act ctg ccc aag ctg aat ttt ggg atg cta agg aaa atg ggc   336
      His Gly Thr Leu Pro Lys Leu Asn Phe Gly Met Leu Arg Lys Met Gly
              75                      80                      85

45      tgaagcccca atagccaaat aataaa   362

```

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> primate

45

<400> 12

```

50      Met Lys Gly Pro Pro Thr Phe Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
              -20                      -15                      -10

55      Leu Ser Pro Asp Pro Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Pro Ser Thr Ala
              -5                      -1  1                      5

60      Cys Cys Thr Gln Leu Tyr Arg Lys Pro Leu Ser Asp Lys Leu Leu Arg
              10                      15                      20

65      Lys Val Ile Gln Val Glu Leu Gln Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu
              25                      30                      35                      40

70      Gln Ala Phe Val Leu His Leu Ala Gln Arg Ser Ile Cys Ile His Pro
              45                      50                      55

75      Gln Asn Pro Ser Leu Ser Gln Trp Phe Glu His Gln Glu Arg Lys Leu
              60                      65                      70

80      His Gly Thr Leu Pro Lys Leu Asn Phe Gly Met Leu Arg Lys Met Gly
              75                      80                      85

```

ES 2 281 205 T3

<210> 13

<211> 433

<212> ADN

5 <213> roedor

<220>

<221> CDS

10 <222> (23)..(382)

<220>

<221> péptido mat

15 <222> (98)..(382)

<400> 13

```

20      gaaacctcta ggctgagtga gc atg atg gag ggg ctc tcc ccc gcc agc agc 52
          Met Met Glu Gly Leu Ser Pro Ala Ser Ser
          -25                    -20

25      ctc ccg ctg tta ctg ttg ctt ctg agc ccg gct cct gaa gca gcc ttg 100
          Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ser Pro Ala Pro Glu Ala Ala Leu
          -15                    -10                    -5                    -1    1

30      cct ctg ccc tcc agc act agc tgc tgt act cag ctc tat aga cag cca 148
          Pro Leu Pro Ser Ser Thr Ser Cys Cys Thr Gln Leu Tyr Arg Gln Pro
          5                    10                    15

35      ctc cca agc agg ctg ctg agg agg att gtc cac atg gaa ctg cag gag 196
          Leu Pro Ser Arg Leu Leu Arg Arg Ile Val His Met Glu Leu Gln Glu
          20                    25                    30

40      gcc gat ggg gac tgt cac ctc cag gct gtc gtg ctt cac ctg gct cgg 244
          Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Val Val Leu His Leu Ala Arg
          35                    40                    45

45      cgc agt gtc tgt gtt cat ccc cag aac cgc agc ctg gct cgg tgg tta 292
          Arg Ser Val Cys Val His Pro Gln Asn Arg Ser Leu Ala Arg Trp Leu
          50                    55                    60                    65

50      gaa cgc caa ggg aaa agg ctc caa ggg act gta ccc agt tta aat ctg 340
          Glu Arg Gln Gly Lys Arg Leu Gln Gly Thr Val Pro Ser Leu Asn Leu
          70                    75                    80

55      gta cta caa aag aaa atg tac tca aac ccc caa cag caa aac 382
          Val Leu Gln Lys Lys Met Tyr Ser Asn Pro Gln Gln Gln Asn
          85                    90                    95

60      taataaagca acattagacg acaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 433

```

<210> 14

55 <211> 120

<212> PRT

<213> roedor

60

65

ES 2 281 205 T3

<400> 14

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

<210> 15

<211> 32

<212> ADN

30 <213> primate

<400> 15

35 ATCTGGCACC ACACCTTCTA CAATGAGCTG CG

32

<210> 16

<211> 32

40 <212> ADN

<213> primate

<400> 16

45 CGTCATACTC CTGCTTGCTG ATCCACATCT GC

32

50

55

60

65

ES 2 281 205 T3

LISTADO DE SECUENCIAS COMO ANEXO

ID SEC Nº: 1 es la secuencia de nucleótidos de GPR2 de primate.
 ID SEC Nº: 2 es la secuencia de aminoácidos de GPR2 de primate.
 5 ID SEC Nº: 3 es la secuencia de nucleótidos de GPR2 de roedor.
 ID SEC Nº: 4 es la secuencia de aminoácidos de GPR2 de roedor.
 ID SEC Nº: 5 es la secuencia de nucleótidos de Vic de primate.
 10 ID SEC Nº: 6 es la secuencia de aminoácidos de Vic de primate.
 ID SEC Nº: 7 es la secuencia de nucleótidos alternativa de Vic de primate.
 ID SEC Nº: 8 es la secuencia de aminoácidos alternativa de Vic de primate.
 ID SEC Nº: 9 es la secuencia de nucleótidos de Vic de roedor.
 15 ID SEC Nº: 10 es la secuencia de aminoácidos de Vic de roedor.
 ID SEC Nº: 11 es la secuencia de nucleótidos de CTACK de primate.
 ID SEC Nº: 12 es la secuencia de aminoácidos de CTACK de primate.
 ID SEC Nº: 13 es la secuencia de nucleótidos de CTACK de roedor.
 20 ID SEC Nº: 14 es la secuencia de aminoácidos de CTACK de roedor.
 ID SEC Nº: 15 proporciona una secuencia cebadora de PCR de actina de primate.
 ID SEC Nº: 16 proporciona una secuencia cebadora de PCR de actina de primate.

25 <110> Schering Corporation

<120> Usos de Quimiocina y Receptor; Composiciones; Métodos

30 <130> DX0882X

<140>

<141>

35 <160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

40 <210> 1

<211> 1089

<212> ADN

45 <213> primate

<220>

<221> CDS

50 <222> (1).. (1086)

<400> 1

55	atg ggg acg gag gtt tta gag cag gtt tcc tgg ggc cat tac tct ggg	48
	Met Gly Thr Glu Val Leu Glu Gln Val Ser Trp Gly His Tyr Ser Gly	
	1 5 10 15	
	gat gaa gag gac gca tac tcg gct gag cca ctg ccg gag ctt tgc tac	96
	Asp Glu Glu Asp Ala Tyr Ser Ala Glu Pro Leu Pro Glu Leu Cys Tyr	
	20 25 30	
60	aag gcc gat gtc cag gcc ttc agc cgg gcc ttc caa ccc agt gtc tcc	144
	Lys Ala Asp Val Gln Ala Phe Ser Arg Ala Phe Gln Pro Ser Val Ser	
	35 40 45	
	ctg acg ctg gct gcg ctg ggt ctg gcc ggc aat ggc ctg gtc ctg gcc	192
	Leu Thr Leu Ala Ala Leu Gly Leu Ala Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala	
	50 55 60	
65	acc cac ctg gca gcc cga cgc gca gcg cgc tcg ccc acc tct gcc cac	240
	Thr His Leu Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ser Pro Thr Ser Ala His	

ES 2 281 205 T3

	65	70	75	80	
5	ctg ctc cag ctg gcc ctg gcc gac ctc ttg ctg gcc ctg act ctg ccc Leu Leu Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro	85	90	95	288
10	ttc gcg gca gca ggg gct ctt cag ggc tgg agt ctg gga agt gcc acc Phe Ala Ala Ala Gly Ala Leu Gln Gly Trp Ser Leu Gly Ser Ala Thr	100	105	110	336
15	tgc cgc acc atc tct ggc ctc tac tgc gcc tcc ttc cac gcc ggc ttc Cys Arg Thr Ile Ser Gly Leu Tyr Ser Ala Ser Phe His Ala Gly Phe	115	120	125	384
20	ctc ttc ctg gcc tgt atc agc gcc gac cgc tac gtg gcc atc gcg cga Leu Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Val Ala Ile Ala Arg	130	135	140	432
25	gcg ctc cca gcc ggg ccg cgg ccc tcc act ccc ggc cgc gca cac ttg Ala Leu Pro Ala Gly Pro Arg Pro Ser Thr Pro Gly Arg Ala His Leu	145	150	155	480
30	gtc tcc gtc atc gtg tgg ctg ctg tca ctg ctc ctg gcg ctg cct gcg Val Ser Val Ile Val Trp Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ala Leu Pro Ala	165	170	175	528
35	ctg ctc ttc agc cag gat ggg cag cgg gaa ggc caa cga cgc tgt cgc Leu Leu Phe Ser Gln Asp Gly Gln Arg Glu Gly Gln Arg Arg Cys Arg	180	185	190	576
40	ctc atc ttc ccc gag ggc ctc acg cag acg gtg aag ggg gcg agc gcc Leu Ile Phe Pro Glu Gly Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala	195	200	205	624
45	gtg gcg cag gtg gcc ctg ggc ttc gcg ctg ccg ctg ggc gtc atg gta Val Ala Gln Val Ala Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Val	210	215	220	672
50	gcc tgc tac gcg ctt ctg ggc cgc acg ctg ctg gcc gcc agg ggg ccc Ala Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro	225	230	235	720
55	gag cgc cgg cgt gcg ctg cgc gtc gtg gtg gct ctg gtg gcg gcc ttc Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Val Ala Leu Val Ala Ala Phe	245	250	255	768
60	gtg gtg ctg cag ctg ccc tac agc ctc gcc ctg ctg ctg gat act gcc Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ala	260	265	270	816
65	gat cta ctg gct gcg cgc gag cgg agc tgc cct gcc agc aaa cgc aag Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Pro Ala Ser Lys Arg Lys	275	280	285	864
70	gat gtc gca ctg ctg gtg acc agc ggc ttg gcc ctc gcc cgc tgt ggc Asp Val Ala Leu Leu Val Thr Ser Gly Leu Ala Leu Ala Arg Cys Gly	290	295	300	912
75	ctc aat ccc gtt ctc tac gcc ttc ctg ggc ctg cgc ttc cgc cag gac Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu Arg Phe Arg Gln Asp	305	310	315	960

ES 2 281 205 T3

ctg cgg agg ctg cta cgg ggt ggg agc tcg ccc tca ggg cct caa ccc 1008
 Leu Arg Arg Leu Leu Arg Gly Gly Ser Ser Pro Ser Gly Pro Gln Pro
 325 330 335
 5
 cgc cgc ggc tgc ccc cgc cgg ccc cgc ctt tct tcc tgc tca gct ccc 1056
 Arg Arg Gly Cys Pro Arg Arg Pro Arg Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro
 340 345 350
 10
 acg gag acc cac agt ctc tcc tgg gac aac tag 1089
 Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp Asp Asn
 355 360

15 <210> 2
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> primate
 20
 <400> 2

25 Met Gly Thr Glu Val Leu Glu Gln Val Ser Trp Gly His Tyr Ser Gly
 1 5 10 15
 Asp Glu Glu Asp Ala Tyr Ser Ala Glu Pro Leu Pro Glu Leu Cys Tyr
 20 25 30
 30 Lys Ala Asp Val Gln Ala Phe Ser Arg Ala Phe Gln Pro Ser Val Ser
 35 40 45
 Leu Thr Leu Ala Ala Leu Gly Leu Ala Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala
 50 55 60
 35 Thr His Leu Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ser Pro Thr Ser Ala His
 65 70 75 80
 Leu Leu Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro
 85 90 95
 40 Phe Ala Ala Ala Gly Ala Leu Gln Gly Trp Ser Leu Gly Ser Ala Thr
 100 105 110
 Cys Arg Thr Ile Ser Gly Leu Tyr Ser Ala Ser Phe His Ala Gly Phe
 115 120 125
 45 Leu Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Val Ala Ile Ala Arg
 130 135 140
 50 Ala Leu Pro Ala Gly Pro Arg Pro Ser Thr Pro Gly Arg Ala His Leu
 145 150 155 160
 Val Ser Val Ile Val Trp Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ala Leu Pro Ala
 165 170 175
 55 Leu Leu Phe Ser Gln Asp Gly Gln Arg Glu Gly Gln Arg Arg Cys Arg
 180 185 190
 Leu Ile Phe Pro Glu Gly Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala
 195 200 205
 60 Val Ala Gln Val Ala Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Val
 210 215 220
 65

ES 2 281 205 T3

	Ala Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro	
	225 230 235 240	
5	Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Val Ala Leu Val Ala Ala Phe	
	245 250 255	
	Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ala	
	260 265 270	
10	Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Pro Ala Ser Lys Arg Lys	
	275 280 285	
	Asp Val Ala Leu Leu Val Thr Ser Gly Leu Ala Leu Ala Arg Cys Gly	
15	290 295 300	
	Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu Arg Phe Arg Gln Asp	
	305 310 315 320	
20	Leu Arg Arg Leu Leu Arg Gly Gly Ser Ser Pro Ser Gly Pro Gln Pro	
	325 330 335	
	Arg Arg Gly Cys Pro Arg Arg Pro Arg Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro	
	340 345 350	
25	Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp Asp Asn	
	355 360	
30	<210> 3	
	<211> 1089	
	<212> ADN	
	<213> roedor	
35	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(1086)	
40	<400> 3	
45	atg ggg acc aag ccc aca gag cag gtc tcc tgg gga ctt tac tcc ggg 48	
	Met Gly Thr Lys Pro Thr Glu Gln Val Ser Trp Gly Leu Tyr Ser Gly	
	1 5 10 15	
	tac gat gag gag gcc tat tcg gtt ggg ccg ctg cca gag ctc tgt tac 96	
50	Tyr Asp Glu Glu Ala Tyr Ser Val Gly Pro Leu Pro Glu Leu Cys Tyr	
	20 25 30	
	aag gct gat gtc cag gct ttc agt cgg gcc ttc caa ccc agt gtc tcc 144	
	Lys Ala Asp Val Gln Ala Phe Ser Arg Ala Phe Gln Pro Ser Val Ser	
55	35 40 45	
	ctg atg gtg gct gta ctg ggt ctg gct ggc aat ggc cta gtc ttg gcc 192	
	Leu Met Val Ala Val Leu Gly Leu Ala Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala	
	50 55 60	
60	acc cat ctg gca gcc aga cga act acc cga tct ccc acc tcc gtt cac 240	
	Thr His Leu Ala Ala Arg Arg Thr Thr Arg Ser Pro Thr Ser Val His	
	65 70 75 80	
65	ctg ctc cag ttg gcc ctg gct gac ctt tta ttg gcc ctg act ttg cct 288	
	Leu Leu Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro	

ES 2 281 205 T3

	85	90	95	
5	ttt gct gca gca ggg gct ctt cag ggc tgg aat cta gga agt acc acc Phe Ala Ala Ala Gly Ala Leu Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Thr Thr	336		
	100	105	110	
10	tgc cgt gcc atc tca ggc ctc tac tgc gcc tct ttc cac gct gcc ttc Cys Arg Ala Ile Ser Gly Leu Tyr Ser Ala Ser Phe His Ala Gly Phe	384		
	115	120	125	
15	ctc ttc cta gcc tgt atc agc gcc gac cgc tat gtg gcc atc gca cga Leu Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Val Ala Ile Ala Arg	432		
	130	135	140	
20	gct ctc cca gcc ggg cag cgg ccc tca acg cct agc cga ggc cac ttg Ala Leu Pro Ala Gly Gln Arg Pro Ser Thr Pro Ser Arg Ala His Leu	480		
	145	150	155	160
25	gtt tca gtc ttc gtg tgg ctg ttg gcg ctg ttt ctg gct cta cct gcg Val Ser Val Phe Val Trp Leu Leu Ala Leu Phe Leu Ala Leu Pro Ala	528		
	165	170	175	
30	ctc ctt ttc agc cgg gac ggg cca cgt gaa ggc caa cga cgc tgt cgg Leu Leu Phe Ser Arg Asp Gly Pro Arg Glu Gly Gln Arg Arg Cys Arg	576		
	180	185	190	
35	ctc att ttt ccc gaa agc ctc acg cag act gtg aaa ggg gca agc gca Leu Ile Phe Pro Glu Ser Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala	624		
	195	200	205	
40	gtg gcg cag gtg gtc ctc ggc ttc gcg ctc cct ctg gcc gtc atg qca Val Ala Gln Val Val Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Ala	672		
	210	215	220	
45	gcc tgt tat gcg ctc ctg ggc cgc acg ctt ctg gcc gcc agg ggg cca Ala Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro	720		
	225	230	235	240
50	gag cgg cgg cgt gca ctg cgc gtc gtg gtg gct ttg gtg gtg gcc ttc Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Ala Leu Val Val Ala Phe	768		
	245	250	255	
55	gtg gtg ctg cag ttg ccc tac agc ctt gcc ctg ctg ctg gat aca gcc Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ala	816		
	260	265	270	
60	gat cta ctg gca gcc cgc gag cgg agc tgc tcc tcc agc aag cgc aag Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Ser Ser Ser Lys Arg Lys	864		
	275	280	285	
65	gat cta gct ttg ctg gtc acc ggc ggc ttg acc ctg gtc cgt tgc agc Asp Leu Ala Leu Leu Val Thr Gly Gly Leu Thr Leu Val Arg Cys Ser	912		
	290	295	300	
70	ctc aat ccg gtg ctt tat gcc ttt ttg ggc ctg cgt ttc cgc cgg gac Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu Arg Phe Arg Arg Asp	960		
	305	310	315	320
75	ctg cgg agg ctg ctc cag ggc gga gga tgc agc ccg aag ccc aac cct Leu Arg Arg Leu Leu Gln Gly Gly Gly Cys Ser Pro Lys Pro Asn Pro	1008		
	325	330	335	

ES 2 281 205 T3

cgt ggc cgc tgc ccc cgt cga ctc cgc ctt tct tcc tgc tct gct cct 1056
 Arg Gly Arg Cys Pro Arg Arg Leu Arg Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro
 340 345 350

5 act gag acc cac agt ctc tct tgg gac aac tag 1089
 Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp Asp Asn
 355 360

10 <210> 4
 <211> 362
 <212> PRT
 15 <213> roedor
 <400> 4

20 Met Gly Thr Lys Pro Thr Glu Gln Val Ser Trp Gly Leu Tyr Ser Gly
 1 5 10 15
 Tyr Asp Glu Gln Ala Tyr Ser Val Gly Pro Leu Pro Glu Leu Cys Tyr
 20 25 30
 25 Lys Ala Asp Val Gln Ala Phe Ser Arg Ala Phe Gln Pro Ser Val Ser
 35 40 45
 Leu Met Val Ala Val Leu Gly Leu Ala Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala
 50 55 60
 30 Thr His Leu Ala Ala Arg Arg Thr Thr Arg Ser Pro Thr Ser Val His
 65 70 75 80
 35 Leu Leu Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro
 85 90 95
 Phe Ala Ala Ala Gly Ala Leu Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Thr Thr
 100 105 110
 40 Cys Arg Ala Ile Ser Gly Leu Tyr Ser Ala Ser Phe His Ala Gly Phe
 115 120 125
 Leu Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Val Ala Ile Ala Arg
 130 135 140
 45 Ala Leu Pro Ala Gly Gln Arg Pro Ser Thr Pro Ser Arg Ala His Leu
 145 150 155 160
 Val Ser Val Phe Val Trp Leu Leu Ala Leu Phe Leu Ala Leu Pro Ala
 165 170 175
 50 Leu Leu Phe Ser Arg Asp Gly Pro Arg Glu Gly Gln - rg Arg Cys Arg
 180 185 190
 55 Leu Ile Phe Pro Glu Ser Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala
 195 200 205
 Val Ala Gln Val Val Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Ala
 210 215 220
 60 Ala Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro
 225 230 235 240

65

ES 2 281 205 T3

Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Val Ala Leu Val Val Ala Phe
 245 250 255
 5 Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ala
 260 265 270
 Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Ser Ser Ser Lys Arg Lys
 275 280 285
 10 Asp Leu Ala Leu Leu Val Thr Gly Gly Leu Thr Leu Val Arg Cys Ser
 290 295 300
 Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu Arg Phe Arg Arg Asp
 305 310 315 320
 15 Leu Arg Arg Leu Leu Gln Gly Gly Gly Cys Ser Pro Lys Pro Asn Pro
 325 330 335
 Arg Gly Arg Cys Pro Arg Arg Leu Arg Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro
 340 345 350
 20 Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp Asp Asn
 355 360
 25 <210> 5
 <211> 731
 <212> ADN
 30 <213> primate
 <220>
 <221> CDS
 35 <222> (56)..(436)
 <220>
 <221> péptido mat
 40 <222> (122)..(436)
 <220>
 <221> característica misc
 45 <222> (529)
 <223> V; puede ser A, C, o G
 50 <400> 5
 ggctgatcga acagcctcac ttgtgttgct gtcagtgcca gtagggcagg cagga atg 58
 Met
 55 cag cag aga gga ctc gcc atc gtg gcc ttg gct gtc tgt gcg gcc cta 106
 Gln Gln Arg Gly Leu Ala Ile Val Ala Leu Ala Val Cys Ala Ala Leu
 -20 -15 -10
 cat gcc tca gaa gcc ata ctt ccc att gcc tcc agc tgt tgc acg gag 154
 His Ala Ser Glu Ala Ile Leu Pro Ile Ala Ser Ser Cys Cys Thr Glu
 -5 -1 1 5 10
 60 gtt tca cat cat att tcc aga agg ctc ctg gaa aga gtg aat atg tgt 202
 Val Ser His His Ile Ser Arg Arg Leu Leu Glu Arg Val Asn Met Cys
 15 20 25
 65 cgc atc cag aga yct gat ggg gat tgt gac ttg gct gct gtc atc ctt 250
 Arg Ile Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile Leu

ES 2 281 205 T3

	30	35	40	
5	cat gtc aag cgc aga aga atc tgt gtc agc ccg cac aac cat act gtt His Val Lys Arg Arg Arg Ile Cys Val Ser Pro His Asn His Thr Val 45 50 55	298		
10	aag cag tgg atg aaa gtg caa gct gcc aag aaa aat ggt aaa gga aat Lys Gln Trp Met Lys Val Gln Ala Ala Lys Lys Asn Gly Lys Gly Asn 60 65 70 75	346		
15	gtt tgc cac agg aag aaa cac cat ggc aag agg aac agt aac agg gca Val Cys His Arg Lys Lys His His Gly Lys Arg Asn Ser Asn Arg Ala 80 85 90	394		
20	cat cag ggg aaa cac gaa aca tac ggc cat aaa act cct tat His Gln Gly Lys His Glu Thr Tyr Gly His Lys Thr Pro Tyr 95 100 105	436		
25	tagagagtct acagataaat ctacagagac aattcctcaa gtggacttgg ccatgattgg ttgtcctgca tactgatgaa actactgatg tcvgctggtc tgaaaggacc taccagaagc taaattctcca agaatgccat ttccctatcc ctaatgattc aatctccctt accctgacca atcagtggcc caaattttcc agccccttgc ctcccagaac cccagcccag aactcttcag agatttaaga atctcctcct acctcctgac tcagcccccatt gtaatcatta aactc	496 556 616 676 731		

<210> 6
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> primate
 <400> 6

40	Met Gln Gln Arg Gly Leu Ala Ile Val Ala Leu Ala Val Cys Ala Ala -20 -15 -10
45	Leu His Ala Ser Glu Ala Ile Leu Pro Ile Ala Ser Ser Cys Cys Thr -5 -1 1 5 10
50	Glu Val Ser His His Ile Ser Arg Arg Leu Leu Glu Arg Val Asn Met 15 20 25
55	Cys Arg Ile Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile 30 35 40
60	Leu His Val Lys Arg Arg Arg Ile Cys Val Ser Pro His Asn His Thr 45 50 55
65	Val Lys Gln Trp Met Lys Val Gln Ala Ala Lys Lys Asn Gly Lys Gly 60 65 70
70	Asn Val Cys His Arg Lys Lys His His Gly Lys Arg Asn Ser Asn Arg 75 80 85 90
75	Ala His Gln Gly Lys His Glu Thr Tyr Gly His Lys Thr Pro Tyr 95 100 105

<210> 7
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> primate

ES 2 281 205 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(492)

5

<400> 7

```

      atg tcg cga ttg agg aga tac gag gtg gcg ctg gaa gcg gag gag gag   48
Met Ser Arg Leu Arg Arg Tyr Glu Val Ala Leu Glu Ala Glu Glu Glu
      1             5             10             15

      atc tac tgg ggc tgc ttc tac ttt ttt cct tgg ctg cga atg tgg cgc   96
Ile Tyr Trp Gly Cys Phe Tyr Phe Phe Pro Trp Leu Arg Met Trp Arg
                20             25             30

      agg gag cgg agt ccg atg tct cca aca agc cag aga cta agt ctg gaa   144
Arg Glu Arg Ser Pro Met Ser Pro Thr Ser Gln Arg Leu Ser Leu Glu
                35             40             45

      gcc ccc agc ctc cca ctg aga agc tgg cat ccg tgg aac aag act aag   192
Ala Pro Ser Leu Pro Leu Arg Ser Trp His Pro Trp Asn Lys Thr Lys
                50             55             60

      cag aag caa gaa gcc ttg cct ctg ccc tcc agc act agc tgc tgt act   240
Gln Lys Gln Glu Ala Leu Pro Leu Pro Ser Ser Thr Ser Cys Cys Thr
                65             70             75             80

      cag ctc tat aga cag cca ctc cca agc agg ctg ctg agg agg att gtc   288
Gln Leu Tyr Arg Gln Pro Leu Pro Ser Arg Leu Leu Arg Arg Ile Val
                85             90             95

      cac atg gaa ctg cag gag gcc gat ggg gac tgt cac ctc cag gct gtc   336
His Met Glu Leu Gln Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Val
                100            105            110

      gtg ctt cac ctg gct cgg cgc agt gtc tgt gtt cat ccc cag aac cgc   384
Val Leu His Leu Ala Arg Arg Ser Val Cys Val His Pro Gln Asn Arg
                115            120            125

      agc ctg gct cgg tgg tta gaa cgc caa ggg aaa agg ctc caa ggg act   432
Ser Leu Ala Arg Trp Leu Glu Arg Gln Gly Lys Arg Leu Gln Gly Thr
                130            135            140

      gta ccc agt tta aat ctg gta cta caa aag aaa atg tac tca aac ccc   480
Val Pro Ser Leu Asn Leu Val Leu Gln Lys Lys Met Tyr Ser Asn Pro
                145            150            155            160

      caa cag caa aac taataaagca acattagacg acaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa   532
Gln Gln Gln Asn

      aaaaaaaaaa a                                                    543

```

50

<210> 8

<211> 164

55

<212> PRT

<213> primate

60

65

ES 2 281 205 T3

<400> 8

```

5      Met Ser Arg Leu Arg Arg Tyr Glu Val Ala Leu Glu Ala Glu Glu Glu
      1          5          10          15
      Ile Tyr Trp Gly Cys Phe Tyr Phe Phe Pro Trp Leu Arg Met Trp Arg
      20          25          30
10     Arg Glu Arg Ser Pro Met Ser Pro Thr Ser Gln Arg Leu Ser Leu Glu
      35          40          45
      Ala Pro Ser Leu Pro Leu Arg Ser Trp His Pro Trp Asn Lys Thr Lys
      50          55          60
15     Gln Lys Gln Glu Ala Leu Pro Leu Pro Ser Ser Thr Ser Cys Cys Thr
      65          70          75          80
      Gln Leu Tyr Arg Gln Pro Leu Pro Ser Arg Leu Leu Arg Arg Ile Val
      85          90          95
20     His Met Glu Leu Gln Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Val
      100          105          110
      Val Leu His Leu Ala Arg Arg Ser Val Cys Val His Pro Gln Asn Arg
      115          120          125
25     Ser Leu Ala Arg Trp Leu Glu Arg Gln Gly Lys Arg Leu Gln Gly Thr
      130          135          140
      Val Pro Ser Leu Asn Leu Val Leu Gln Lys Lys Met Tyr Ser Asn Pro
      145          150          155          160
      Gln Gln Gln Asn

```

<210> 9

<211> 393

<212> ADN

<213> roedor

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(390)

<220>

<221> péptido mat

<222> (67)..(390)

<400> 9

```

55     atg cag caa gca ggg ctc aca ctc atg gct gtg gct gtg tgt gtg gct 48
      Met Gln Gln Ala Gly Leu Thr Leu Met Ala Val Ala Val Cys Val Ala
      -20          -15          -10
      ttt caa acc tca gaa gcc ata ctt ccc atg gcc tcc agc tgt tgc act 96
      Phe Gln Thr Ser Glu Ala Ile Leu Pro Met Ala Ser Ser Cys Cys Thr
      -5          -1 1          5          10
60     gag gtg cct cat cat gtt tcc gaa aga ctt ctg gaa aga gtg agt tca 144
      Glu Val Ser His His Val Ser Gly Arg Leu Leu Glu Arg Val Ser Ser
      15          20          25
65     tgc agc atc cag aga gct gac ggg gac tgc gac ctg gct gct gtc atc 192

```

ES 2 281 205 T3

```

Cys Ser Ile Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile
      30              35              40
5    ctt cat gtt aaa cgt aga aga atc tgc atc agc ccg cac aat cgt act 240
    Leu His Val Lys Arg Arg Arg Ile Cys Ile Ser Pro His Asn Arg Thr
      45              50              55

10   ttg aag cag tgg atg aga gcc tca gag gta aag aag aat ggc aga gaa 288
    Leu Lys Gln Trp Met Arg Ala Ser Glu Val Lys Lys Asn Gly Arg Glu
      60              65              70

15   aac gtc tgt tct ggg aaa aaa caa ccc agc agg aag gac aga aaa ggg 336
    Asn Val Cys Ser Gly Lys Lys Gln Pro Ser Arg Lys Asp Arg Lys Gly
      75              80              85              90

20   cac act acg aga aag cac aga aca cgt gga aca cac agg cac gaa gcc 384
    His Thr Thr Arg Lys His Arg Thr Arg Gly Thr His Arg His Glu Ala
      95              100              105

20   tct cgt tag 393
    Ser Arg

```

<210> 10

25 <211> 130

<212> PRT

<213> roedor

30 <400> 10

```

Met Gln Gln Ala Gly Leu Thr Leu Met Ala Val Ala Val Cys Val Ala
      -20              -15              -10
35   Phe Gln Thr Ser Glu Ala Ile Leu Pro Met Ala Ser Ser Cys Cys Thr
      -5              -1 1              5              10

40   Glu Val Ser His His Val Ser Gly Arg Leu Leu Glu Arg Val Ser Ser
      15              20              25

40   Cys Ser Ile Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile
      30              35              40

45   Leu His Val Lys Arg Arg Arg Ile Cys Ile Ser Pro His Asn Arg Thr
      45              50              55

50   Leu Lys Gln Trp Met Arg Ala Ser Glu Val Lys Lys Asn Gly Arg Glu
      60              65              70

50   Asn Val Cys Ser Gly Lys Lys Gln Pro Ser Arg Lys Asp Arg Lys Gly
      75              80              85              90

55   His Thr Thr Arg Lys His Arg Thr Arg Gly Thr His Arg His Glu Ala
      95              100              105

55   Ser Arg

```

<210> 11

60 <211> 362

<212> ADN

<213> primate

65 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

ES 2 281 205 T3

<220>

<221> péptido mat

<222> (73)..(336)

5

<400> 11

```

10      atg aag ggg ccc cca acc ttc tgc agc ctc ctg ctg ctg tca ttg ctc   48
      Met Lys Gly Pro Pro Thr Phe Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
           -20                      -15                      -10

15      ctg agc cca gac cct aca gca gca ttc cta ctg cca ccc agc act gcc   96
      Leu Ser Pro Asp Pro Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Pro Ser Thr Ala
           -5                      -1    1                      5

20      tgc tgt act cay ctc tac cga aag cca ctc tca gac aag cta ctg agg   144
      Cys Cys Thr Gln Leu Tyr Arg Lys Pro Leu Ser Asp Lys Leu Leu Arg
           10                      15                      20

25      aag gtc atc cag gtg gaa ctg cag gag gct gac ggg gac tgt cac ctc   192
      Lys Val Ile Gln Val Glu Leu Gln Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu
           25                      30                      35                      40

30      cag gct ttc gtg ctt cac ctg gct caa cgc agc atc tgc atc cac ccc   240
      Gln Ala Phe Val Leu His Leu Ala Gln Arg Ser Ile Cys Ile His Pro
           45                      50                      55

35      cag aac ccc agc ctg tca cag tgg ttt gag cac caa gag aga aag ctc   288
      Gln Asn Pro Ser Leu Ser Gln Trp Phe Glu His Gln Glu Arg Lys Leu
           60                      65                      70

40      cat ggg act ctg ccc aag ctg aat ttt ggg atg cta agg aaa atg ggc   336
      His Gly Thr Leu Pro Lys Leu Asn Phe Gly Met Leu Arg Lys Met Gly
           75                      80                      85

45      tgaagcccca atagccaaat aataaa   362

```

<210> 12

<211> 112

40

<212> PRT

<213> primate

<400> 12

45

```

50      Met Lys Gly Pro Pro Thr Phe Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
           -20                      -15                      -10

55      Leu Ser Pro Asp Pro Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Pro Ser Thr Ala
           -5                      -1    1                      5

60      Cys Cys Thr Gln Leu Tyr Arg Lys Pro Leu Ser Asp Lys Leu Leu Arg
           10                      15                      20

65      Lys Val Ile Gln Val Glu Leu Gln Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu
           25                      30                      35                      40

70      Gln Ala Phe Val Leu His Leu Ala Gln Arg Ser Ile Cys Ile His Pro
           45                      50                      55

75      Gln Asn Pro Ser Leu Ser Gln Trp Phe Glu His Gln Glu Arg Lys Leu
           60                      65                      70

80      His Gly Thr Leu Pro Lys Leu Asn Phe Gly Met Leu Arg Lys Met Gly
           75                      80                      85

```

ES 2 281 205 T3

<210> 13

<211> 433

<212> ADN

5 <213> roedor

<220>

<221> CDS

10 <222> (23)..(382)

<220>

<221> péptido mat

15 <222> (98)..(382)

<400> 13

```

20      gaaacctcta ggctgagtga gc atg atg gag ggg ctc tcc ccc gcc agc agc  52
           Met Met Glu Gly Leu Ser Pro Ala Ser Ser
           -25                -20

      ctc ccg ctg tta ctg ttg ctt ctg agc ccg gct cct gaa gca gcc ttg  100
25      Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ser Pro Ala Pro Glu Ala Ala Leu
           -15                -10                -5                -1    1

      cct ctg ccc tcc agc act agc tgc tgt act cag ctc tat aga cag cca  148
30      Pro Leu Pro Ser Ser Thr Ser Cys Cys Thr Gln Leu Tyr Arg Gln Pro
           5                10                15

      ctc cca agc agg ctg ctg agg agg att gtc cac atg gaa ctg cag gag  196
      Leu Pro Ser Arg Leu Leu Arg Arg Ile Val His Met Glu Leu Gln Glu
           20                25                30

35      gcc gat ggg gac tgt cac ctc cag gct gtc gtg ctt cac ctg gct cgg  244
      Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Val Val Leu His Leu Ala Arg
           35                40                45

      cgc agt gtc tgt gtt cat ccc cag aac cgc agc ctg gct cgg tgg tta  292
40      Arg Ser Val Cys Val His Pro Gln Asn Arg Ser Leu Ala Arg Trp Leu
           50                55                60                65

      gaa cgc caa ggg aaa agg ctc caa ggg act gta ccc agt tta aat ctg  340
45      Glu Arg Gln Gly Lys Arg Leu Gln Gly Thr Val Pro Ser Leu Asn Leu
           70                75                80

      gta cta caa aag aaa atg tac tca aac ccc caa cag caa aac  382
      Val Leu Gln Lys Lys Met Tyr Ser Asn Pro Gln Gln Gln Asn
           85                90                95

50      taataaagca acattagacg acaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a  433

```

<210> 14

55 <211> 120

<212> PRT

<213> roedor

60

65

ES 2 281 205 T3

<400> 14

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

<210> 15

<211> 32

30 <212> ADN

<213> primate

<400> 15

35 ATCTGGCACC ACACCTTCTA CAATGAGCTG CG

32

<210> 16

40 <211> 32

<212> ADN

<213> primate

45 <400> 16

CGTCATACTC CTGCTTGCTG ATCCACATCT GC

32

50

55

60

65