

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 814**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02757223 .9**

96 Fecha de presentación: **19.08.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1434854**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2004**

54 Título: **COMPOSICIONES ÚTILES COMO LIGANDOS PARA EL RECEPTOR DE TIPO RECEPTOR 1 DE PÉPTIDOS FORMILADOS Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS.**

30 Prioridad:
09.10.2001 US 328241 P
07.05.2002 US 141620

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.11.2011

73 Titular/es:
CHEMOCENTRYX, INC.
850 MAUDE AVENUE
MOUNTAIN VIEW CALIFORNIA 94043, US

72 Inventor/es:
MIAO, Zhenhua;
PREMACK, Brett y
SCHALL, Thomas, J.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 368 814 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones útiles como ligandos para el receptor de tipo Receptor 1 de péptidos formilados y métodos de uso de las mismas.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones útiles como ligandos para el receptor de Tipo Receptor 1 de Péptidos formilados y a los métodos de uso de las mismas.

10 **Antecedentes**

Las quimioquinas (citoquinas quimiotácticas) actúan como balizas moleculares para el reclutamiento y la activación de linfocitos T, neutrófilos y macrófagos, marcando los campos de batalla con patógenos. El reclutamiento de leucocitos, los glóbulos blancos de la sangre responsables de la lucha contra las infecciones depende de los gradientes de quimioquinas. Las quimioquinas son una superfamilia de proteínas pequeñas (8-10 KD) que median diversos procesos biológicos incluyendo el tráfico y retorno de leucocitos, la inmunorregulación, la hematopoyesis y la angiogénesis. Hasta la fecha, se conocen 24 receptores de quimioquinas. Las quimioquinas juegan un papel fundamental en la inmunidad innata y las reacciones inflamatorias (Baggiolini et al. (1994); Baggiolini et al. (1997); Rollins (1997).) Se han descrito cuatro subfamilias de quimioquinas, basándose en la distancia entre los dos primeros residuos de cisteína conservados: C, CC, CXC, y CX3C. Todas las quimioquinas conocidas señalizan a través de cuatro grupos de receptores de siete dominios transmembrana que pertenecen a los receptores acoplados a proteína G y proteínas G heterotriméricas sensibles a la toxina de pertussis de la familia G_i : XCR, CCR, CXCR y CX3CR. (Murphy et al. (2000)). Los eventos de unión extracelular pueden activar las rutas de transducción de la señal específicas que conducen a diferentes respuestas, tales como la quimiotaxis. En el sistema de quimioquinas, múltiples quimioquinas pueden activar un único receptor de quimioquina; por ejemplo, el receptor CCR1 liga las quimioquinas RANTES (regulada en la activación de células T normales expresadas), MIP-1 α (una proteína inflamatoria de macrófagos) y MIP-1 β . Del mismo modo, una única quimioquina puede activar varios receptores (Mantovani (1999)).

Los monocitos y neutrófilos, que juegan un importante papel en la patogénesis de la inflamación y en la presentación de antígenos, responden a las quimioquinas (Lee et al. (2000)). Los monocitos expresan los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2, CCR5, CCR8, CXCR2, y CXCR4. (Ugucioni et al. (1995); Weber et al. (2000)). Se ha informado sobre los ligandos MIP-1 α y la Proteína 1 Quimioatrayente de Monocitos (MCP1) como activadores de monocitos potentes *in vitro*. (Fantuzzi et al. (1999).) Los neutrófilos son cruciales durante muchas respuestas inflamatorias agudas, y también pueden jugar un papel en la orientación de la inmunidad hacia las respuestas Th1. (Bonecchi et al. (1999).) Responden principalmente a algunas quimioquinas CXC pero no migran para la mayor parte de las quimioquinas CC. Los neutrófilos humanos expresan dos receptores de IL-8 de alta afinidad, CXCR1 y CXCR2.

La quimioquina CK β 8, también conocida como CCL23; hmrp-2a; factor inhibidor de los progenitores mieloides 1 (MPlF-1); SCYA23 (nomenclatura actual y sistema ID Genoma), es una quimioquina CC de 99 aminoácidos que contiene seis cisteínas. Es expresada constitutivamente en hígado, pulmón, páncreas, y médula ósea. La CK β 8 tiene actividad quimiotáctica sobre monocitos, células dendríticas, y linfocitos en reposo (Forssmann et al. (1997)) e inhibe la formación de colonias de las células formadoras de colonias potenciales poco proliferativas derivadas de médula ósea. (Patel et al. (1997)). Se ha informado sobre CK β 8-1, una forma de empalme alternativa de CK β 8 que tiene 116 aminoácidos de longitud. Ambas formas maduras CK β 8 y CK β 8-1 han sido asignadas como ligandos para el receptor CCR1. (Youn et al. (1998)). Los estudios de desensibilización cruzada tanto en monocitos como en eosinófilos indican que CK β 8-1 se une predominantemente a CCR1. El procesamiento adicional en el extremo NH $_2$ de CK β 8 da como resultado proteínas de 76 o 75 residuos que son significativamente más activos sobre las células que expresan CCR1 (Macphee et al. (1998), Berkhout et al. (2000)).

Además de los receptores de quimioquinas, los neutrófilos y monocitos también expresan el receptor de Péptidos N-formilados acoplados a proteína G (FPR) y su receptor de tipo 1 de Péptidos N-formilados (FPRL1) homólogo. Puesto que los ligandos para FPRL1 eran desconocidos cuando fue clonado originalmente, FPRL1 fue definido inicialmente como un receptor de orfano. (Bao et al. (1992); Murphy et al. (1992); Ye et al. (1992).) Fue asignado como un receptor de LXA $_4$ puesto que se une a lipoxina A $_4$ (Fiore et al. (1994).) Además, se ha informado de que varios péptidos/proteínas diferentes se unen a FPRL1 con una baja afinidad (véase la Figura 1). Se ha informado de que un amiloide A del suero, una proteína secretada durante la fase aguda de la inflamación, ha sido referida como ligando funcional de afinidad media (Su et al. (1999)). Un fragmento β -amiloide (1-42) y un péptido priónico neurotóxico 106-126 también son ligandos de baja afinidad, indicando que FPRL1 puede jugar un papel en las enfermedades neurodegenerativas (Le et al. (2001)). Algunos otros ligandos de baja afinidad incluyen: péptidos derivados de las proteínas de la envoltura del VIH (Su et al. (1999), Deng et al. (1999)); y un péptido de *Helicobacter pylori*, Hp (2-20). Algunos péptidos sintéticos, tales como Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met- NH $_2$ (WKYVMv) y Trp-Lys-

Tyr-Met-Val-Met-NH₂ (WKYMVM) ("péptidos W 1 y 2"), han sido referidos como ligandos potentes para el receptor. (Christophe *et al.* (2001); Baek *et al.* (1996)). No obstante, no se ha demostrado que estos péptidos de origen no natural derivados de genotecas de hexapéptidos al azar sean fisiológicamente relevantes.

5 Compendio

Los autores de la invención han descubierto que la variante por truncamiento de CKβ8-1, CKβ8- (25-116), está implicada en las reacciones inflamatorias y la inmunidad innata por medio de su papel como ligando funcional para el receptor de péptidos formilados de tipo 1 (FPRL1). Además, los autores de la presente invención han descubierto un exón de empalme alternativo de CKβ8-1, denominado SHAAGtido, y las variantes truncadas y otras variantes de SHAAGtido, junto con CKβ8-1 (25-116), son funcionales en ambas células que se sabe que expresan FPRL1. Los SHAAGtidos funcionales generan un flujo de calcio tras la unión receptor-ligando en leucocitos y atraen monocitos, neutrófilos, células dendríticas maduras (CDm), y células dendríticas inmaduras (CDi).

En una realización, la invención incluye SHAAGtidos así como proteínas y péptidos que comprenden SHAAGtidos, con la excepción de CKβ8-1 (25-116). En particular, la presente invención proporciona una proteína o polipéptido aislado que modula la actividad del receptor FPRL 1 que comprende una secuencia en su extremo N, teniendo la secuencia una identidad de al menos 90% con el SEQ ID No. 1 en toda su longitud, donde la proteína o polipéptido no es uno de los SEQ ID No. 15 y 16.

Además, la invención también incluye ácidos nucleicos que codifican proteínas y péptidos que comprenden SHAAGtidos, anticuerpos que se unen específicamente a SHAAGtidos, y proteínas de fusión que comprenden SHAAGtidos.

En otra realización, la invención incluye composiciones que comprenden SHAAGtidos o proteínas o péptidos que comprenden una secuencia de SHAAGtido. Tales composiciones incluyen aquellas adecuadas para la administración a un sujeto para intensificar la actividad de FPRL1.

En una realización adicional, la invención incluye kits que comprenden tales composiciones. Tales kits pueden ser ensamblados para facilitar la administración, por ejemplo, de composiciones farmacéuticas.

Asimismo se describen los métodos para tratar a un sujeto por un trastorno que comprende modular la actividad de un receptor FPRL1 administrando un compuesto que comprende un SHAAGtido o proteínas o péptidos que comprenden una secuencia de SHAAGtido.

En un aspecto adicional, la invención incluye los métodos y también están incluidos en la presente invención los kits útiles para la identificación de tales antagonistas. Tales métodos comprenden la etapa de poner en contacto un receptor FPRL1 con una composición que comprende un SHAAGtido biológicamente activo, o una proteína o péptido que comprende una secuencia de SHAAGtido, en presencia de una molécula antagonista candidato. Los antagonistas para la función del receptor FPRL1 pueden ser identificados como aquellos compuestos que reducen la actividad del receptor en comparación con la observada en ausencia del compuesto candidato.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Tabla que muestra los ligandos de baja afinidad endógenos FPRL1 referidos y los ligandos no naturales. **Figura 2.** Figura que muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las variantes CCL23/CKβ8 humanas con CCL15/MIP-1α y CCL3/MIP-1δ humanos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los autores de la presente invención han descubierto que una variante por truncamiento de CKβ8-1, CKβ8-1 (25-116), es un ligando bifuncional para dos GPCR distintos: el receptor de quimioquina CCR1 y el receptor de péptidos formilados de tipo 1 (FPRL1). Los autores de la invención también descubrieron que, además de su actividad como ligando de CCR1, CKβ8-1(25-116) está implicado en reacciones inflamatorias y en la inmunidad reclutando monocitos y neutrófilos a través de su papel como ligando funcional para FPRL1. CKβ8 atrae células que incluyen monocitos, células dendríticas y linfocitos en reposo a través de OCR1, pero carece del exón de empalme alternativo encontrado en CKβ8-1 (25-116) (secuencia de SHAAGtido). CKβ8-1 (1-116), la forma de empalme alternativo de CKβ8 (116 aminoácidos) es un ligando funcional para el receptor CCR1, como CKβ8. No obstante, CKβ8-1 (1-116) no ejerce sus funciones a través de la secuencia de SHAAGtido.

Los autores de la presente invención también han descubierto una clase de péptidos novedosos (el péptido SHAAGtido y variantes del péptido SHAAGtido – conocido de ahora en adelante colectivamente como "SHAAGtidos"), mutantes por truncamiento del exón de empalme de la quimioquina CC CCL23, CKβ8-1 (25-116), que son ligandos sorprendentemente eficaces y valiosos para el receptor FPRL1. Estos péptidos producen un flujo

- de calcio en los leucocitos que expresan el FPRL1. Además, los SHAAGtidos atraen eficazmente a las células incluyendo monocitos, neutrófilos, células dendríticas maduras (CDm) y células dendríticas inmaduras (CDi) y otros subgrupos de leucocitos. El péptido SHAAGtido (SEQ ID NO: 1) y ciertas variantes de SHAAGtido, junto con su quimioquina parental CK β 8-1 (25-116), son funcionales tanto sobre monocitos como neutrófilos que se sabe que expresan FPRL1. Los SHAAGtidos funcionales generan un flujo de calcio tras la unión receptor-ligando en leucocitos y atraen monocitos, neutrófilos, células dendríticas maduras (CDm), y células dendríticas inmaduras (CDi) en análisis quimiotácticos. A la luz de estas observaciones, los SHAAGtidos representan péptidos funcionales crípticos que son por lo tanto sorprendentemente eficaces como ligandos de FPRL1.
- La invención incluye SHAAGtidos así como proteínas y péptidos que comprenden SHAAGtidos, con la excepción de CK β 8-1 (25-116) y CK β 8-1 (1-116). Además, la invención también incluye ácidos nucleicos que codifican SHAAGtidos, así como ácidos nucleicos que codifican proteínas y péptidos que comprenden SHAAGtidos, con la excepción de los ácidos nucleicos que codifican CK β 8-1 (25-116) y CK β 8-1 (1-116). Las composiciones que contienen los SHAAGtidos así como las proteínas y péptidos que comprenden los SHAAGtidos, incluyendo CK β 8-1 (25-116) también están incluidos en la invención. Tales composiciones incluyen aquellas adecuadas para la administración a un sujeto para intensificar la actividad de FPRL1. También están incluidos los kits que comprenden tales composiciones. Tales kits pueden ser ensamblados para facilitar la administración, por ejemplo, de composiciones farmacéuticas.
- Se describen en la presente memoria los métodos para tratar a un sujeto que necesita la estimulación de las reacciones inflamatorias y de la inmunidad innata. La estimulación de dicha actividad puede beneficiar a sujetos que padecen enfermedades, por ejemplo, enfermedades infecciosas (y también en la vacunación, como se describe en la solicitud de patente co-pendiente "Methods and Compositions for Inducing an Immune Response", presentada el 7 de Mayo de 2002 – número de referencia del agente 10709/23). Tales métodos comprenden la estimulación del receptor FPRL1 mediante la administración de una composición que comprende un SHAAGtido, un péptido o una proteína que comprende un SHAAGtido, u otra molécula estimuladora.
- Asimismo se describen en la presente memoria métodos para tratar a un sujeto que necesita la regulación a la baja de las reacciones inflamatorias y de la inmunidad innata. La regulación a la baja de dicha actividad puede beneficiar a sujetos que padecen enfermedades que incluyen trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Tales métodos comprenden la regulación a la baja del receptor FPRL1 mediante la administración de una composición que comprende un antagonista de la función del receptor FPRL1.
- Los métodos y kits para la identificación de tales antagonistas también están incluidos en la presente invención. Tales métodos comprenden la etapa de poner en contacto el receptor FPRL1 con una composición que comprende una secuencia de SHAAGtido biológicamente activa, un péptido o una proteína que comprende un SHAAGtido activo, en presencia de una molécula antagonista candidata. Los antagonistas de la función del receptor FPRL1 pueden ser identificados como aquellos compuestos que reducen la actividad del receptor en comparación con la observada en ausencia del compuesto candidato. Tales métodos se pueden realizar in vitro o in vivo. Además, los kits se pueden ensamblar para facilitar tales ensayos in vitro o in vivo.

SHAAGtidos y moléculas que comprenden SHAAGtidos.

45 Péptidos SHAAGtido y polipéptidos que comprenden SHAAGtidos

- La Tabla 1 muestra la secuencia de polipéptidos de SHAAGtido (SEQ ID NO: 1) y las secuencias de polipéptidos de ciertas variantes truncadas de SHAAGtido y otras variantes. La Tabla 2 muestra la secuencia de polinucleótidos de SHAAGtido (SEQ ID NO: 12) y las secuencias de polinucleótidos de variantes truncadas de SHAAGtido y otras variantes. La Tabla 3 muestra la Secuencia de Nucleótidos de CK β 8-1(25-116) humana (SEQ ID NO: 20). La Figura 2 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las variantes de CCL23/CK β 8 (CK β (1-99) - SEQ ID NO: 13; CK β (25-99) - SEQ ID NO: 14; CK β (1-116) - SEQ ID NO: 15; CK β (25-116) - (SEQ ID NO: 16) humanas con CCL15/MIP-1 α (SEQ ID NO: 19); CCL3/MIP-1 S (SEQ ID NO: 17) y Leucotactina (SEQ ID NO: 18) humanas. Se muestran en recuadros cuatro residuos de cisteína conservados y dos cisteínas adicionales, no encontradas normalmente en la familia de quimioquinas CC, se muestran en recuadros sombreados. El exón empalmado alternativamente de CCL23/CK β 8-1 se muestra subrayado.

Tabla 2 SHAAGtido y diferentes variantes truncadas y otras variantes – secuencias de polinucleótidos

SEQ ID NO:	Secuencia de polinucleótidos	
20	atgctctgga ggagaaagat tggcctcag atgacccttt ctcatgctgc agga	54
21	aggagaaaga ttgtcctca gatgaccctt tctcatgctg cagga	
22	atgctctgga ggagaaagat tggcctcag atgacccttt ctcat	45
23	attggtcctc agatgaccct ttctcatgct gcagga	
24	atgctctgga ggagaaagat tggcctcag atgacc	36
25	atgctctgga ggagaaagat tggcctcag atgacccttt ctcatgctgc atat	54
26	tggaggagaa agattggtcc tcagatgacc ctttctcatg ctgcagga	
27	atgctctgga ggagaaagat tggcctcag atg	33
28	tggaggagaa agattggtcc tcagatg	
29	tggaggagaa agattggt	
30	ctctggagga gaaagattgg tcctcagatg acccttctc at	42

Tabla 3 Secuencia de Nucleótidos de CKβ8-1(25-116) Humana (SEQ ID NO: 12)

<u>atgctctgga ggagaaagat tggcctcag atgacccttt ctcatgctgc aggattccat</u>	60
gctactagtg ctgactgctg catctcctac accccacgaa gcatcccgtg ttcactcctg	120
gagagttact ttgaaacgaa cagcgagtgc tccaagccgg gtgtcatctt cctcaccaag	180
aagggcgac gtttctgtgc caacccagc gataagcaag ttcagggttg catgagaatg	240
ctgaagctgg acacacggat caagaccagg aagaattga	279

5 Moléculas de SHAAGtido, derivados y análogos

Los péptidos SHAAGtidos de la presente invención incluyen aquellas moléculas enumeradas en la Tabla 1. Además, se pueden sintetizar otros derivados de péptidos y nucleótidos de SHAAGtido utilizando técnicas de síntesis convencionales. Los derivados son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos formadas a partir de compuestos nativos o bien directamente o bien mediante modificación o sustitución parcial. Los análogos son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos que tienen una estructura similar, pero no idéntica, a la del compuesto nativo pero difieren de él con respecto a ciertos componentes o cadenas laterales. Los análogos pueden ser sintetizados o pueden tener un origen evolutivo diferente.

Los derivados y análogos pueden ser completos o pueden tener una longitud que no sea la completa, si el derivado o el análogo contiene un ácido nucleico o un aminoácido modificado. Por ejemplo, el SEQ ID NO: 3 contiene solamente los primeros 15 aminoácidos N-terminales de la molécula de SHAAGtido (SEQ ID NO: 1). Los derivados o análogos del ácido nucleico o el péptido *SHAAGtido* incluyen, moléculas que comprenden regiones que son esencialmente homólogas al ácido nucleico o al péptido *SHAAGtido* con una identidad de al menos aproximadamente 70%, 80%, o 95% a lo largo de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de un tamaño idéntico o cuando se compara con una secuencia alineada en la cual el alineamiento se realiza por medio de un algoritmo de homología, o cuya secuencia de ácido nucleico codificante es capaz de hibridar con una secuencia complementaria que codifica las secuencias de péptidos anteriormente mencionadas en condiciones restrictivas, moderadamente restrictivas, o poco restrictivas (Ausubel et al., 1987). Una molécula de ácido nucleico complementaria es aquella que es suficientemente complementaria a una secuencia, de manera que se forman enlaces de hidrógeno con pocos emparejamientos erróneos, formando un dúplex estable. "Complementario" hace referencia a emparejamientos de bases de Watson-Crick o Hoogsteen entre nucleótidos.

La especificidad del ADN de hebra sencilla para hibridar con fragmentos complementarios se determina por medio

de la "restricción" de las condiciones de reacción. La restricción de la hibridación aumenta a medida que disminuye la propensión a formar dúplex de ADN. En la reacción de hibridación de los ácidos nucleicos, se puede seleccionar la restricción para que favorezca hibridaciones específicas (restricción elevada), lo que puede ser utilizado para identificar, por ejemplo, clones completos de una genoteca. Se pueden utilizar hibridaciones menos específicas (baja restricción) para identificar moléculas de ADN relacionadas, pero no exactas (homólogas, pero no idénticas) o segmentos.

Los dúplex de ADN son estabilizados mediante: (1) el número de pares de bases complementarias, (2) el tipo de pares de bases, (3) la concentración de sal (fuerza iónica) de la mezcla de reacción, (4) la temperatura de la reacción, y (5) la presencia de ciertos disolventes orgánicos, tales como la formamida que disminuye la estabilidad de los dúplex de ADN. En general, cuanto más larga es la sonda, mayor es la temperatura requerida para una hibridación apropiada. Un enfoque común consiste en variar la temperatura: temperaturas relativas más altas dan como resultado condiciones de reacción más restrictivas. Ausubel et al., (1987) proporcionan una explicación excelente de la restricción de las condiciones de hibridación.

La hibridación en "condiciones restrictivas" describe protocolos de hibridación en los que las secuencias de nucleótidos homólogas entre sí al menos en 60% permanecen hibridadas. Generalmente, se seleccionan condiciones restrictivas para que estén aproximadamente 5°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica, un pH y una concentración de ácido nucleico definidos) a la cual el 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Puesto que las secuencias diana están presentes generalmente en exceso, a la T_m, el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio.

Las "condiciones de hibridación restrictivas" permiten que una sonda, cebador u oligonucleótido hibride solamente con su secuencia diana. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia y serán diferentes. Las condiciones restrictivas comprenden: (1) lavados a una fuerza iónica baja y una temperatura elevada (p. ej. cloruro de sodio 15 mM, citrato de sodio 1,5 mM, dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50°C); (2) un agente desnaturizante durante la hibridación (p. ej. formamida al 50% (v/v), albúmina de suero bovino al 0,1%, Ficoll al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1%, tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5; cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C); o (3) formamida al 50%. Los lavados también comprenderán típicamente 5X SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a sonicación (50 µg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado altamente restrictivo que consiste en 0,1 x EDTA que contiene SSC a 55°C. Preferiblemente, las condiciones son tales que las secuencias homólogas al menos aproximadamente en 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% entre sí típicamente permanecen hibridadas entre sí. Estas condiciones se presentan como ejemplos y no se pretende que sean limitantes.

Las "condiciones moderadamente restrictivas" utilizan soluciones de lavado y condiciones de hibridación que son menos restrictivas (Sambrook, 1989), de manera que un polinucleótido hibridará con la totalidad, fragmentos, derivados o análogos de los SEQ ID NO: 7-12, 14. Un ejemplo comprende la hibridación en 6X SSC, 5X solución de Denhardt, SDS a 0,5% y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado a 55°C, seguido de uno o más lavados en 1X SSC, SDS al 0,1% a 37°C. La temperatura, la fuerza iónica, etc., se pueden ajustar para acomodar factores experimentales tales como la longitud de la sonda. Se han descrito otras condiciones moderadamente restrictivas (Ausubel et al., 1987; Krieglner, 1990).

Las "condiciones poco restrictivas" utilizan soluciones de lavado y condiciones de hibridación que son menos restrictivas que las moderadamente restrictivas (Sambrook, 1989), de manera que un polinucleótido hibridará con la totalidad, fragmentos, derivados o análogos de los SEQ ID NO: 7-12, 14. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación poco restrictivas son la hibridación en formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado, sulfato de dextrano al 10% (peso/vol) a 40°C, seguido de uno o más lavados en 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1% a 50°C. Se han descrito otras condiciones poco restrictivas, tales como las hibridaciones de especie cruzada (Ausubel et al., 1987; Krieglner, 1990; Shilo y Weinberg, 1981).

Además de las variantes alélicas de origen natural del SHAAGtido, se pueden introducir cambios mediante mutaciones en el SEQ ID NO: 1 que provocan alteraciones en las secuencias de aminoácidos del SHAAGtido codificado que no alteran significativamente la función del SHAAGtido. Por ejemplo, se puede realizar una sustitución de aminoácido en el residuo de aminoácido C-terminal en la secuencia del SEQ ID NO: 6. Un "residuo de aminoácido no esencial" es un residuo que puede ser alterado a partir de las secuencias de tipo salvaje del SHAAGtido sin alterar la actividad biológica, mientras un residuo de aminoácido "esencial" es requerido para dicha actividad biológica. Por ejemplo, se pronostica que los residuos de aminoácido que están conservados entre los SHAAGtidos de la invención son particularmente poco susceptibles de alteración. Los aminoácidos para los cuales se pueden realizar sustituciones conservativas son bien conocidos en la técnica.

Las sustituciones conservativas útiles se muestran en la Tabla 4, "Sustituciones preferidas". Las sustituciones conservativas por medio de las cuales un aminoácido de una clase es sustituido por otro aminoácido del mismo tipo se encuentran dentro del alcance de la invención con tal que la sustitución no altere materialmente la actividad biológica del compuesto.

5

Tabla 4 Sustituciones preferidas

Residuo original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala -	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu,

Las sustituciones no conservativas que tienen efecto en (1) la estructura de la cadena principal del polipéptido, tal como una conformación en lámina β o en hélice α , (2) la carga, (3) el carácter hidrófobo, o (4) el volumen de la cadena lateral del sitio diana pueden modificar la función del SHAAGtido, especialmente cuando las secuencias del SHAAGtido comprenden una parte de una molécula polipeptídica más grande. Los residuos se dividen en grupos basándose en las propiedades de las cadenas laterales comunes como se indica en la Tabla 5. Las sustituciones no conservativas implican cambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Las sustituciones pueden ser introducidas en sitios de sustituciones conservativas o más preferiblemente en sitios no conservados.

10

15

Tabla 5 Clases de aminoácidos

Clase	Aminoácidos
Hidrófobo	Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile
Hidrófilo neutro	Cys, Ser, Thr
Ácido	Asp, Glu
Alcalino	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Desorganiza la conformación de la cadena	Gly, Pro
Aromático	Trp, Tyr, Phe

Se pueden elaborar polipéptidos variantes utilizando métodos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis

mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), de barrido con alanina, y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida al sitio (Carter, 1986; Zoller y Smith, 1987), la mutagénesis en cassette, la mutagénesis de selección por restricción (Wells et al., 1985) u otras técnicas conocidas se pueden realizar en el ADN clonado para producir el ADN de la variante de *SHAAGtido* (Ausubel et al., 1987; Sambrook, 1989).

Un *SHAAGtido* "aislado" o "purificado" de la presente invención comprende polipéptidos, proteínas o fragmentos biológicamente activos separados y/o recuperados de un componente de su entorno natural. Los *SHAAGtidos* aislados incluyen aquellos expresados heterológamente en células diseñadas genéticamente o expresadas *in vitro*. Los componentes contaminantes incluyen materiales que interferirían típicamente en los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido. Para ser sustancialmente aisladas, las preparaciones tienen menos de 30% en peso de material contaminante distinto del *SHAAGtido* (contaminantes), más preferiblemente menos de 20%, 10% y muy preferiblemente menos de 5% de contaminantes.

Los polipéptidos y fragmentos de interés pueden ser producidos mediante cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo mediante la expresión a través de vectores tales como bacterias, virus y células eucarióticas. Además, también se pueden utilizar la síntesis *in vitro*, tal como la síntesis de péptidos.

Un "polipéptido o fragmento de polipéptido activo" conserva una actividad biológica y/o inmunológica similar, pero no necesariamente idéntica, a la actividad de un polipéptido de *SHAAGtido* mostrado en la Tabla 1. La actividad inmunológica, en el contexto de este estudio del polipéptido per se, y no el papel biológico real para el *SHAAGtido* al lograr o intensificar la actividad de FPRL1, hace referencia a un aspecto de un polipéptido *SHAAGtido* ya que un anticuerpo específico contra un epítipo antigénico de *SHAAGtido* se une a un *SHAAGtido*. La actividad biológica hace referencia a una función, ya sea inhibitoria o estimuladora, causada por un polipéptido *SHAAGtido* nativo. Una actividad biológica de un polipéptido *SHAAGtido* incluye, por ejemplo, la unión al receptor FPRL1, o la quimiotaxis o la producción del flujo de calcio tras la unión al receptor FPRL1. Se puede utilizar un análisis biológico concreto (véanse los Ejemplos), con o sin dependencia de la dosis, para determinar la actividad del *SHAAGtido*. Se puede preparar un fragmento de ácido nucleico que codifica una porción biológicamente activa del *SHAAGtido* aislando una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica del *SHAAGtido*, expresando la porción codificada del *SHAAGtido* (p. ej., mediante la expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la porción codificada del polipéptido *SHAAGtido*.

En general, una variante de un polipéptido *SHAAGtido* que conserva la función de tipo polipéptido *SHAAGtido* incluye cualquier variante en la cual los residuos de una posición concreta de la secuencia han sido sustituidos por otros aminoácidos, y adicionalmente incluye la posibilidad de insertar uno o varios residuos adicionales entre dos residuos de la proteína parental así como la posibilidad de suprimir uno o más residuos de la secuencia parental. Cualquier sustitución, inserción, o delección de aminoácidos está incluida en la invención. En circunstancias favorables, la sustitución es una sustitución conservativa como se ha definido antes.

La Tabla 1 demuestra que es menos probable que la delección de aminoácidos en el extremo C-terminal de la secuencia del *SHAAGtido* ocasione una pérdida de actividad de FPRL 1 que la delección en el extremo N-terminal (véase el Ejemplo 9). Por ejemplo, el SEQ ID NO: 8, que consiste en los 11 aminoácidos N-terminales de la secuencia de *SHAAGtido* todavía conserva una actividad FPRL1 moderada. No obstante, la delección de 3 aminoácidos N-terminales (SEQ ID NO: 2) da como resultado solamente una baja actividad FPRL1. Sin embargo, la delección del aminoácido en el extremo N (SEQ ID NO: 11) no da como resultado una pérdida completa de la actividad FRPL 1.

"Variante de *SHAAGtido*" representa un polipéptido de *SHAAGtido* activo que tiene al menos: (1) una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 80% con una secuencia de polipéptido *SHAAGtido* nativa completa o (2) cualquier fragmento de una secuencia de polipéptido *SHAAGtido* completa. Las variantes del polipéptido de *SHAAGtido* incluyen polipéptidos *SHAAGtidos* en las que uno o más residuos de aminoácido son añadidos o suprimidos en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos nativa completa, con la excepción de aquellos fragmentos que son idénticos a CK β 8 y CK β 8-1. Una variante del polipéptido *SHAAGtido* tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y muy preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 99% con una secuencia de polipéptido *SHAAGtido* nativa completa. Normalmente, los polipéptidos de la variante de *SHAAGtido* tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, o 300 aminoácidos de longitud, o más.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia" se define como el porcentaje de residuos de aminoácido del *SHAAGtido* que son idénticos a los residuos de aminoácido de una secuencia candidata cuando las dos secuencias se alinean. Para determinar el % de identidad de aminoácidos, las secuencias se alinean y si fuera necesario, se introducen espacios para lograr el % máximo de identidad de secuencia; las sustituciones conservativas no se

consideran como parte de la identidad de secuencia. Los procedimientos de alineamiento de secuencias de aminoácidos para determinar el porcentaje de identidad son bien conocidos por los expertos en la técnica. A menudo se utiliza un programa de ordenador disponible al público tal como BLAST, BLAST2, ALIGN2 o el programa Megalign (DNASTAR) para alinear las secuencias de péptidos.

5 Cuando las secuencias de aminoácidos se alinean, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A para, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede ser formulada como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se puede calcular como:

$$10 \quad \% \text{ de identidad de la secuencia de aminoácidos} = X/Y \cdot 100$$

donde

15 X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias o el alineamiento de algoritmos de A y B
e

20 Y es el número total de residuos de aminoácido de B.

Si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

25 Los polipéptidos de fusión son útiles en estudios de expresión, localización celular, bioanálisis, y purificación de SHAAGtidos. Una "proteína quimérica" o una "proteína de fusión" con SHAAGtido comprende un SHAAGtido fusionado a un polipéptido distinto del SHAAGtido. Un polipéptido distinto del SHAAGtido no es sustancialmente homólogo a un polipéptido SHAAGtido. Una proteína de fusión con SHAAGtido puede incluir cualquier porción del SHAAGtido completo, incluyendo cualquier número de porciones biológicamente activas. Por ejemplo, se puede fusionar el SHAAGtido con el extremo C de las secuencias de GST (glutación S-transferasa). Tales proteínas de fusión facilitan la purificación de los SHAAGtidos recombinantes. En ciertas células anfitrionas, (p. ej. de mamífero), las fusiones con secuencias señal heterólogas pueden mejorar la expresión y/o secreción de los SHAAGtidos.

35 Los anticuerpos específicos para el SHAAGtido y las secuencias variantes de SHAAGtido también se describen en la presente memoria. Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo los fragmentos de unión (p. ej., $F_{(ab)2}$) y las versiones de cadena sencilla son bien conocidos. Por consiguiente, se pueden preparar anticuerpos policlonales o monoclonales mediante técnicas convencionales.

40 Las composiciones quimiotácticas de la invención contienen uno o más polinucleótidos o polipéptidos que contienen una secuencia de SHAAGtido. En una realización, la composición contiene un SHAAGtido que es un polinucleótido o un polipéptido aislado o recombinante. En una realización, el o los SHAAGtidos es/son las especies predominantes (esto es, más de aproximadamente 50%, más a menudo más de aproximadamente 80% en peso del total de los miembros de la clase de moléculas de la composición) de su clase (p. ej., polipéptido, polinucleótido, lípido, carbohidrato) en la composición. Las composiciones quimiotácticas de la invención contienen SHAAGtidos libres de los materiales asociados normalmente con su entrono *in situ* (si son de origen natural).

45 Una molécula de ácido nucleico de SHAAGtido aislada se purifica del entorno en el cual se encuentra en la naturaleza y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante. Las moléculas de SHAAGtido aisladas se distinguen de la molécula de SHAAGtido específica, tal como existe en las células.

50 **Uso de composiciones de SHAAGtido en el tratamiento de enfermedades.**

En la presente memoria se describen métodos tanto terapéuticos como profilácticos de tratamiento de un sujeto con riesgo (o susceptible) de un trastorno o que tiene un trastorno asociado con el receptor FPRL1 o la actividad del ligando FPRL1 aberrantes. Los ejemplos incluyen los trastornos neurodegenerativos, tales como la Enfermedad de Alzheimer.

60 Las enfermedades o afecciones de los seres humanos u otras especies que pueden ser tratadas con SHAAGtidos o proteínas o péptidos que comprenden SHAAGtidos, o inhibidores o agonistas de las interacciones FPLR1-SHAAGtido, incluyen, pero no están limitadas a, enfermedades relacionadas con inflamación periféricas - crónicas, por ejemplo: inflamación crónica; trombosis; aterosclerosis; restenosis; insuficiencia venosa crónica; infecciones bacterianas recurrentes; sepsis; infecciones cutáneas; enfermedades renales; glomerulonefritis; enfermedades pulmonares fibróticas; enfermedades alérgicas; IBS; artritis reumatoide y bronquitis aguda. También se pueden tratar enfermedades relacionadas con la macroglia y la microglia - Sistema nervioso central, por ejemplo:

enfermedades neurodegenerativas; enfermedad de Alzheimer; Esclerosis múltiple; enfermedad de Parkinson; neuroinflamación; enfermedades neurológicas asociadas a VIH; demencia asociada a VIH; infecciones bacterianas del SNC; *Toxoplasma gondii* en el cerebro; infecciones por *Acanthamoeba*; infecciones por *Listeria*; enfermedades priónicas; encefalopatías espongiiformes subagudas y degeneración macular.

5 Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por un incremento de los niveles o la actividad biológica de FPRL1 se pueden tratar con agentes terapéuticos que tienen un efecto antagónico (esto es, reducen o inhiben) la actividad. Los antagonistas pueden ser administrados de una manera terapéutica o profiláctica. Los agentes terapéuticos que se pueden utilizar incluyen: (1) moléculas que comprenden péptidos SHAAGtidos inactivos, o sus análogos, derivados, fragmentos u homólogos; (2) ácidos nucleicos antisentido de SHAAGtidos(3) anticuerpos para péptidos SHAAGtidos o sus análogos, derivados, fragmentos u homólogos o (4) moduladores (esto es, inhibidores y antagonistas) que ejercen un efecto antagónico sobre la actividad del receptor FPRL1.

15 Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por una disminución de los niveles o la actividad biológica de FPRL1 se pueden tratar con agentes terapéuticos que incrementan (esto es, son agonistas) la actividad. Los agentes terapéuticos que regulan al alza la actividad se pueden administrar terapéuticamente o profilácticamente. Los agentes terapéuticos que se pueden utilizar incluyen péptidos, o sus análogos, derivados, fragmentos u homólogos; o un agonista que incrementa la biodisponibilidad. Los agentes terapéuticos que se pueden utilizar incluyen: (1) moléculas que comprenden péptidos SHAAGtidos, o sus análogos, derivados, fragmentos u homólogos; (2) ácidos nucleicos de SHAAGtidos; o (3) moduladores que ejercen un efecto agonístico sobre la actividad del receptor FPRL1.

25 Asimismo se describe en la presente memoria un método para prevenir, en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con la expresión o la actividad aberrante del receptor FPRL1, administrando un agente que modula la actividad de FPRL1. Los sujetos con riesgo de una enfermedad causada por, o a la que contribuye la actividad aberrante de FPRL1 se pueden identificar, por ejemplo, por medio de cualquier combinación de análisis diagnósticos o pronósticos. La administración de un agente profiláctico se puede producir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración de FPRL1, de manera que se evite la enfermedad o el trastorno, o alternativamente, se retrase su progreso. Dependiendo del tipo de aberración de FPRL1, por ejemplo, se puede utilizar un agonista de FPRL1 o un antagonista de FPRL1 para tratar al sujeto. El agente apropiado puede ser determinado basándose en análisis de escrutinio.

35 Asimismo se describen en la presente memoria los métodos para modular la actividad de FPRL1 con fines terapéuticos. Los métodos moduladores implican poner en contacto una célula con un agente que modula una o más de las actividades de la actividad de FPRL1 asociadas con la célula. Un agente que modula la actividad de FPRL1 puede ser un ácido nucleico o una proteína, un ligando cognado de origen natural de FPRL1, un péptido, un peptidomimético de SHAAGtido, u otra molécula pequeña. El agente puede estimular la actividad de FPRL1. El agente puede inhibir una actividad de FPRL1. Los métodos moduladores se pueden realizar *in vitro* (p. ej., cultivando la célula con el agente) o, alternativamente, *in vivo* (p. ej., administrando el agente a un sujeto). Por ejemplo, el método puede implicar la administración de un SHAAGtido o una molécula de ácido nucleico como terapia para compensar la expresión o actividad aberrante o reducida del ligando de FPRL1.

45 La estimulación de la actividad de FPRL1 es deseable en situaciones en las cuales FPRL1, o el ligando de FPRL1 es anormalmente regulado a la baja y/o en las cuales es probable que el incremento de FPRL1, o de la actividad del ligando de FPRL1 tenga un efecto beneficioso; por ejemplo, en el tratamiento de una infección o en una vacunación. Por el contrario, se desea la disminución de FPRL1, o de la actividad del ligando de FPRL1 en condiciones en las cuales el FPRL1, o la actividad del ligando de FPRL1 es anormalmente regulada al alza y/o en las cuales es probable que la disminución de FPRL1, o de la actividad del ligando de FPRL1 tenga un efecto beneficioso; por ejemplo, en el tratamiento de la inflamación crónica.

50 Se pueden realizar análisis *in vitro* o *in vivo* para determinar el efecto de un agente terapéutico específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado.

55 En diferentes realizaciones específicas, se pueden realizar análisis *in vitro* con células representativas del tipo o los tipos implicados en el trastorno del paciente, para determinar si un agente terapéutico dado ejerce el efecto deseado sobre el tipo o los tipos de células. Las modalidades para el uso en terapia se pueden someter a ensayo en sistemas de modelos animales adecuados incluyendo, pero no limitados a ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, perros y similares, antes de someterlas a ensayo en sujetos humanos. De un modo similar, para el ensayo *in vivo*, se puede utilizar cualquiera de los sistemas de modelos animales conocidos en la técnica antes de la administración a sujetos humanos.

60 Las enfermedades y afecciones asociadas con la inflamación y la infección se pueden tratar utilizando los métodos de la presente invención. La enfermedad o afección es aquella en la que las acciones de un ligando de FPRL1 sobre un receptor FPRL1 van a ser inhibidas o promovidas, con el fin de modular la respuesta inmunitaria.

Las composiciones pueden ser administradas por medio de las rutas de administración oral, parenteral (p. ej., inyección o infusión intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, ICV, intracisternal, inyección subcutánea, o implante), mediante pulverización por inhalación, nasal, vaginal, rectal, sublingual, o tópica y pueden ser formuladas, solas o de forma conjunta, en formulaciones unitarias de dosificación adecuadas que contienen portadores, coadyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, convencionales apropiados para cada ruta de administración. Además del tratamiento de animales de sangre caliente tales como ratones, ratas, caballos, ganado vacuno, ovejas, perros, gatos, monos, etc., las composiciones de la invención son eficaces para su uso en seres humanos.

La terapia combinada para modular la actividad de FPLR1 o del ligando de FPLR1 y de ese modo evitar y tratar enfermedades infecciosas o trastornos y enfermedades inflamatorias se ilustra por medio de la combinación de los compuestos de esta invención y de otros compuestos que son conocidos para tales utilidades.

Por ejemplo, en el tratamiento o la prevención de la inflamación, los presentes compuestos se pueden utilizar junto con un agente anti-inflamatorio o analgésico tal como un agonista de opiáceos, un inhibidor de lipoxigenasa, tal como un inhibidor de 5-lipoxigenasa, un inhibidor de ciclooxigenasa, tal como un inhibidor de ciclooxigenasa-2, un inhibidor de interleuquina, tal como TNF α , un inhibidor de interleuquina-1, un antagonista de NMDA, un inhibidor de óxido nítrico o un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, un agente anti-inflamatorio no esteroideo, o un agente anti-inflamatorio supresor de citoquina, por ejemplo con un compuesto tal como acetaminofeno, aspirina, codeína, fentanilo, ibuprofeno, indometacina, ceterolac, morfina, naproxeno, fenacetina, piroxicam, un analgésico esteroideo, sufentanilo, sunlindac, tenidap, y similares. De un modo similar, los presentes compuestos pueden ser administrados con un mitigador del dolor; un potenciador tal como la cafeína, un antagonista de H₂, simeticona, hidróxido de aluminio o magnesio; un descongestivo tal como fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina, oximetazolina, epinefrina, nafazolina, xilometazolina, propilhexedrina, o levo-desoxi-efedrina; un antitusivo tal como codeína, hidrocodona, caramifeno, carbetapentana, o dexametorfano; un esteroide; ciclosporina A; metotrexato; IL-10; un diurético; y una anti-histamina sedante o no sedante.

Composiciones farmacéuticas

Se pueden incorporar agonistas o antagonistas del receptor FPRL1 a las composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden típicamente los agonistas o antagonistas y un portador farmacéuticamente aceptable. Un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica (Gennaro (2000)). Los ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero no están limitados a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina de suero humano al 5%. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijados. Excepto cuando un medio o agente convencional es incompatible con un compuesto activo, se contempla el uso de estas composiciones. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos suplementarios.

Se formula una composición farmacéutica del agonista o antagonista para que sea compatible con su ruta de administración pretendida, incluyendo la administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (esto es, tópica), transmucosal, y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o álcalis, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser incluida en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyectables incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL[®] (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida con el fin de ser administrada utilizando una jeringa. Tales composiciones deben ser estables durante la fabricación y el almacenamiento y se deben preservar frente a la contaminación por microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (tal como glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, utilizando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y utilizando tensioactivos. Los diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, y timerosal, pueden contener contaminación por microorganismos. Se pueden incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y

cloruro de sodio. Las composiciones que pueden retrasar la absorción incluyen agentes tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida a un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes según se requiera, seguido de esterilización. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino, y los otros ingredientes requeridos. En los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen secado a vacío y liofilización que producen un polvo que contiene el ingrediente activo y cualquier ingrediente deseado a partir de soluciones estériles.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden incluir en cápsulas de gelatina o formar en comprimidos. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede ser incorporado a excipientes y utilizado en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un portador líquido como colutorio, donde el compuesto en el portador líquido se aplica oralmente. Se pueden incluir agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales coadyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, PRIMOGEL, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o STEROTES; un antiapelmazante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se liberan en forma de una pulverización en aerosol desde un nebulizador o un recipiente presurizado que contiene un propelente adecuado, *p. ej.*, un gas tal como dióxido de carbono.

La administración generalizada también puede ser transmucosal o transdérmica. Para la administración transmucosal o transdérmica, se seleccionan agentes penetrantes que pueden atravesar las barreras diana. Los agentes penetrantes transmucosales incluyen, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. Se pueden utilizar pulverizaciones nasales o supositorios para la administración transmucosal. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles, o cremas.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (*p. ej.*, con bases tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la liberación rectal.

Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegen el compuesto frente a la rápida eliminación del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables o biocompatibles, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Los polietilenglicoles, *p. ej.* PEG, también son buenos portadores. Tales materiales pueden ser obtenidos comercialmente de ALZA Corporation (Mountain View, CA) y NOVA Pharmaceuticals, Inc. (Lake Elsinore, CA), o preparados por un experto en la técnica. También se pueden utilizar suspensiones liposomales como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo en (Eppstein et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.522.811, 1985).

Se pueden crear formulaciones orales o composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria hace referencia a unidades físicamente discretas adaptadas en forma de dosificaciones individuales para el sujeto que se va a tratar, que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto activo asociado con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención vienen dictadas por, y dependen directamente de, las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico deseado concreto, y las limitaciones inherentes de la composición del compuesto activo.

Las moléculas de ácido nucleico del *SHAAGtido* pueden ser insertadas en vectores y utilizadas como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden liberar en el sujeto, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, administración local (Nabel y Nabel, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.328.470, 1994), o mediante inyección estereotáctica (Chen et al. (1994)). La preparación farmacéutica de un vector de terapia génica puede incluir un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está embebido el vehículo de liberación génica. Alternativamente, cuando el vector de liberación génica completo puede ser producido intacto a partir de células recombinantes, *p. ej.*, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que produzcan el sistema de liberación génica.

En un aspecto, el *SHAAGtido* es liberado en forma de ADN de manera que se liberan *in situ* los polipéptidos. En una realización, el ADN está "desnudo", como describe, por ejemplo, Ulmer *et al.* (1993) y revisado por Cohen, (1993).

La absorción del ADN desnudo puede aumentar recubriendo con el ADN un portador, *p. ej.* cuentas biodegradables, que es eficazmente transportado en las células. En tales vacunas, el ADN puede estar presente dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de liberación conocidos por los expertos normales en la técnica, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico, sistemas de expresión bacterianos y virales.

5 Los vectores, utilizados para lanzar el material genético de organismo a organismo, se pueden dividir en dos clases generales: Los vectores de clonación son plásmidos o fagos replicantes con regiones que no son esenciales para la propagación en una célula anfitriona apropiada y en los cuales se puede insertar ADN foráneo; el ADN foráneo es replicado y propagado como su fuera un componente del vector. Se utiliza un vector de expresión (tal como un
10 plásmido, una levadura, o un genoma de un virus animal) para introducir material genético foráneo en una célula o tejido del anfitrión con el fin de transcribir y traducir el ADN foráneo, tal como un SHAAGtido. En los vectores de expresión, el ADN introducido es conectado operablemente a elementos tales como promotores que señalizan la célula anfitriona para transcribir el ADN insertado. Algunos promotores son excepcionalmente útiles, tales como los promotores inducibles que controlan la transcripción génica en respuesta a factores específicos. Conectando
15 operablemente un polinucleótido de SHAAGtido a un promotor inducible se puede controlar la expresión de un polipéptido de SHAAGtido o sus fragmentos. Los ejemplos de los promotores inducibles clásicos incluyen aquellos que son sensibles al interferón α , al choque térmico, a los iones metálicos pesados, y a los esteroides tales como los glucocorticoides (Kaufman, 1990. *Methods Enzymol* 185:487-511) y a la tetraciclina. Otros promotores inducibles deseables incluyen aquellos que no son endógenos en las células en las cuales se está introduciendo el constructo, pero, sin embargo, son sensibles en aquellas células en las que se suministra de manera exógena el agente de inducción. En general, los vectores de expresión útiles a menudo son plásmidos. No obstante, se contemplan otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (*p. ej.*, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados).

25 La elección del vector viene dictada por el organismo o las células que están siendo utilizadas y el destino deseado del vector. Los vectores pueden replicar una vez en las células diana, o pueden ser vectores "suicidas". En general, los vectores comprenden secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos intensificadores, promotores, y secuencias de terminación de la transcripción.

30 La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente otros compuestos terapéuticamente activos como se ha indicado en la presente memoria que se aplican normalmente en el tratamiento de afecciones relacionadas con FPRL1.

35 En el tratamiento o la prevención de las afecciones que requieren la modulación de FPRL1 el nivel de dosificación apropiado de un agonista o un antagonista será generalmente de aproximadamente 0,01 a 500 mg per kg de peso corporal del paciente por día, que puede ser administrado en una sola dosis o en múltiples dosis. Preferiblemente, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg por día; más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a 250 mg/kg por día, aproximadamente de 0,05 a 100 mg/kg por día, o de aproximadamente
40 0,1 a 50 mg/kg por día. En este intervalo la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, de 0,5 a 5 o de 5 a 50 mg/kg por día. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan preferiblemente en forma de comprimidos que contienen de 1,0 a 1000 miligramos del ingrediente activo, concretamente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0, y 1000,0 miligramos del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se está tratando. Los compuestos se pueden
45 administrar en un régimen de 1 a 4 veces por día, preferiblemente una vez o dos veces por día.

No obstante, el nivel de dosificación específico y la frecuencia de la dosificación para un paciente concreto se pueden variar, y dependerán de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el momento de la administración, la tasa de excreción, la combinación con fármacos, la gravedad de la afección concreta, y el anfitrión que padezca la terapia.

Kits

55 En un aspecto, la invención proporciona kits que contienen uno o más de los siguientes en un paquete o recipiente: (1) una composición biológicamente activa de la invención o un antagonista de FPRL1; (2) un coadyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable; (3) un vehículo para la administración, tal como una jeringa; (4) instrucciones para su administración. También se contemplan realizaciones en las cuales se encuentran dos o más
60 de los componentes (1) - (4).

Cuando se suministra un kit, los diferentes componentes de la composición se pueden empaquetar en recipientes separados y mezclarlos inmediatamente antes de su uso. Dicho empaquetamiento de los componentes por separado puede permitir el almacenamiento a largo plazo sin pérdida de las funciones de los componentes activos.

Los reactivos incluidos en los kits pueden ser suministrados en recipientes de cualquier clase de manera que la vida de los diferentes componentes se conserve y no sea adsorbidos o alterados por los materiales del recipiente. Por ejemplo, las ampollas de vidrio selladas pueden contener polipéptidos o polinucleótidos de SHAAGtidos liofilizados, o tampones que hayan sido envasados en un gas no reaccionante, neutro, tal como nitrógeno. Las ampollas pueden consistir en cualquier material adecuado, tal como vidrio, polímeros orgánicos, tales como policarbonato, poliestireno, etc.; cerámica, metal o cualquier otro material típicamente empleado para contener reactivos similares. Otros ejemplos de recipientes adecuados incluyen simples botellas que pueden estar fabricadas de sustancias similares en forma de ampollas, y sobres, que pueden comprender interiores forrados de lámina metálica, tal como aluminio o una aleación. Otros recipientes incluyen tubos de ensayo, viales, matraces, botellas, jeringas, o similares. Los recipientes pueden tener un puerto de acceso estéril, tal como una botella que tiene un tapón que puede ser atravesado por una aguja hipodérmica para inyectables. Otros recipientes pueden tener dos compartimentos que estén separados por una membrana fácilmente eliminable que tras su eliminación permita que se mezclen los componentes. Las membranas eliminables pueden ser de vidrio, plástico, caucho, etc.

Los kits también pueden estar provistos de instrucciones. Las instrucciones pueden ser impresas en papel o en otro sustrato, y/o pueden ser suministradas en forma de un medio legible electrónico, tal como un disquete, un CD-ROM, un DVD-ROM, un disco Zip, una cinta de video, una cinta de audio, etc. Las instrucciones detalladas pueden no estar asociadas físicamente con el kit; en lugar de eso, el usuario puede ser remitido a un sitio de la red especificado por el fabricante o el distribuidor del kit, o suministrado en forma de dirección de correo electrónico.

Métodos de escrutinio y detección

Los SHAAGtidos (y nucleótidos de SHAAGtidos utilizados para expresar SHAAGtidos) se pueden utilizar como reactivos en los métodos para escrutar compuestos que modulan la actividad del receptor FPRL1. Tales compuestos pueden ser útiles en el tratamiento de los trastornos caracterizados por una producción insuficiente o excesiva de receptor FPRL1 o de ligando del receptor FPRL1, o una producción de formas de receptor FPRL1 o de ligando del receptor FPRL1 que pueden tener una actividad aberrante en comparación con las moléculas de tipo salvaje. En general, tales compuestos pueden ser utilizados para modular las funciones biológicas que implican al receptor FPRL1/ligando del receptor FPRL1.

La invención proporciona métodos (análisis de escrutinio) para identificar modalidades, esto es, compuestos o agentes candidato o de ensayo (*p. ej.*, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos), alimentos, combinaciones de los mismos, etc., que afectan al receptor FPRL1 o al ligando del receptor FPRL1. Este puede ser un efecto estimulador o inhibidor. La invención también incluye los compuestos identificados en tales análisis de escrutinio.

Es deseable someter a ensayo los compuestos que incrementan o disminuyen la actividad del receptor FPRL1 en respuesta a, o con independencia de un ligando. Un compuesto puede modular la actividad del receptor FPRL1 incrementando o disminuyendo la actividad del propio receptor FPRL1 (agonistas y antagonistas).

Se pueden obtener compuestos de ensayo utilizando cualquiera de los numerosos enfoques de métodos de genotecas combinatorias, incluyendo: genotecas biológicas; genotecas en fase sólida o en fase de disolución paralelas, espacialmente direccionables; métodos de genotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de la genoteca de "una cuenta-un compuesto"; y los métodos de genotecas sintéticas que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de genotecas biológicas está limitado a los péptidos, mientras los otros cuatro incluyen genotecas de compuestos oligoméricos peptídicos, no peptídicos o de molécula pequeña (Lam, 1997).

Una "molécula pequeña" hace referencia a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD y más preferiblemente menos de aproximadamente 4 kD, y muy preferiblemente menos de 0,6 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Las genotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos fúngicos, bacterianos, o de algas, son conocidas en la técnica y pueden ser escrutadas con cualquiera de los análisis de la invención. Se han descrito ejemplos de los métodos para la síntesis de las genotecas moleculares (Carell et al., 1994a; Carell et al., 1994b; Cho et al., 1993; DeWitt et al., 1993; Gallop et al., 1994; Zuckermann et al., 1994).

Las genotecas de compuestos se pueden presentar en disolución (Houghten et al., 1992) o sobre cuentas (Lam et al., 1991), sobre chips (Fodor et al., 1993), bacterias, esporas (Ladner et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409, 1993), plásmidos (Cull et al., 1992) o sobre fagos (Cwirla et al., 1990; Devlin et al., 1990; Felici et al., 1991; Ladner et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409, 1993; Scott u Smith, 1990).

Se encuentran disponibles muchos análisis para el escrutinio de compuestos candidato o de ensayo que se unen a o modulan la actividad del receptor FPRL1. Un análisis sin células comprende, por ejemplo, poner en contacto el

receptor FPRL1 o un fragmento biológicamente activo con un compuesto SHAAGtido que se une al receptor FPRL1 para formar una mezcla de análisis, poner en contacto la mezcla de análisis con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con el receptor FPRL1, donde la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con el receptor FPRL1 comprende la determinación de la capacidad del receptor FPRL1 para unirse preferentemente a, o modular, la actividad del compuesto de ensayo. Los análisis basados en células incluyen, por ejemplo, los análisis de flujo de calcio, los análisis de unión y los análisis de migración celular comentados en los ejemplos.

La inmovilización o bien de una molécula que contiene una secuencia de SHAAGtido o bien de una de sus moléculas acompañantes (tal como FPRL1) puede facilitar la separación de las formas complejadas de las formas no complejadas de una o de ambas proteínas, así como la adaptación a análisis de alto rendimiento. La unión de un compuesto de ensayo a una molécula de SHAAGtido o a una molécula de receptor FPRL1, o la interacción de una molécula de SHAAGtido con una molécula de receptor FPRL1 en presencia y ausencia de un compuesto candidato, se puede completar en cualquier recipiente adecuado para contener los reaccionantes, tales como placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga. Se puede proporcionar una proteína de fusión que añada un dominio que permita que una o ambas proteínas se unan a la matriz. Por ejemplo, se pueden adsorber proteínas de fusión de GST (glutathion S-transferasa)-SHAAGtido o proteínas de fusión de GST-diana sobre cuentas de glutatión-sefarosa (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivadas de glutatión que después son combinadas con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y o bien el receptor FPRL1 no adsorbido o bien la molécula de SHAAGtido, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación de complejos (*p. ej.*, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las cuentas o los pocillos de las placas de microtitulación se lavan para separar cualquiera de los componentes no unidos, la matriz se inmoviliza en el caso de las cuentas, el complejo se determina directa o indirectamente. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la matriz, y determinar el nivel de unión o actividad de SHAAGtido utilizando técnicas convencionales.

También se pueden utilizar otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices en los análisis de escrutinio. Véase, por ejemplo la Solicitud de Patente de los Estados Unidos co-pendiente con el Número de Serie 09/721.902. Se puede inmovilizar una molécula de SHAAGtido o una molécula de receptor FPRL1 utilizando sistemas de biotina-avidina o biotina-estreptavidina. Se puede completar la biotilación utilizando muchos reactivos, tales como biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida; PIERCE Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizándolos en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (PIERCE Chemical). Alternativamente, se pueden derivatizar hacia los pocillos de la placa anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con las moléculas de SHAAGtido o las moléculas de receptor FPRL1 pero que no interfieren en la unión del SHAAGtido a la molécula de receptor FPRL1, y atrapar la molécula de receptor FPRL1 o el SHAAGtido en los pocillos mediante conjugación con los anticuerpos. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos reactivos con moléculas de receptor FPRL1 o moléculas de SHAAGtido, así como análisis con enzima ligada que cuentan con la detección de una actividad enzimática asociada con las moléculas de receptor FPRL1 o las moléculas de SHAAGtido.

Para demostrar que los compuestos son antagonistas del receptor FPRL1, se puede determinar si inhiben la actividad de un SHAAGtido sobre el receptor. Preferiblemente tales compuestos tienen al menos una de las siguientes características:

- (1) inhiben potencialmente la unión de un SHAAGtido o una molécula que comprende una secuencia de SHAAGtido al receptor FPRL1;
- (2) inhiben significativamente la respuesta de Ca^{2+} de un SHAAGtido o una molécula que comprende un SHAAGtido que se une a FPRL1;
- (3) presentan una respuesta de Ca^{2+} no específica, limitada; o
- (4) inhiben la actividad quimiotáctica.

Se pueden emplear análisis de unión *in vitro* convencionales para demostrar la afinidad de los compuestos por el receptor FPRL1 (inhibiendo de ese modo la actividad de un SHAAGtido por medio de la interacción competitiva con el receptor). Véanse los ejemplos de más abajo. Preferiblemente, los compuestos activos muestran un valor de Cl_{50} $<10 \mu\text{M}$, más preferiblemente $<5 \mu\text{M}$, muy preferiblemente $<1 \mu\text{M}$.

Los compuestos que inhiben la actividad de SHAAGtido afectan a la concentración de Ca^{2+} intracelular en las células estimuladas con SHAAGtido. La unión del ligando al receptor FPRL1 da como resultado la activación de fosfolipasa C inducida por proteína G, que conduce a la conversión de fosfatidil inositol fosfato en inositol fosfato y diacilglicerol. El inositol fosfato se une a su vez a un receptor localizado en sitios intracelulares para liberar Ca^{2+} en el citoplasma. Además de los incrementos de concentración de Ca^{2+} debidos a la liberación de los almacenes intracelulares, la unión del inositol fosfato a su receptor conduce a un incremento del flujo de calcio extracelular a través de la membrana y en el interior de la célula. Pueden estar implicadas otras rutas de señalización de proteína G.

De este modo, la activación del receptor FPRL1 por un SHAAGtido, y, con posterioridad, la inhibición de la activación por los compuestos de la invención puede ser determinada analizando el incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular libre. Típicamente, esto se puede lograr mediante el uso de sondas fluorescentes sensibles al calcio tales como quin-2, fura-2 e indo-1. El efecto de los compuestos activos en el bloqueo de la respuesta de Ca^{2+} depende de la cantidad de compuesto activo y de quimioquina presente. Generalmente, cuando se encuentran presentes 10 nM de quimioquina, 10 μM de compuesto activo deben producir una inhibición del 20 al 100% de la respuesta de Ca^{2+} .

Para determinar si el compuesto activo produce una respuesta de Ca^{2+} no específica, se incuban las células que portan múltiples receptores, incluyendo el receptor al que se dirige el compuesto activo, con el compuesto. Las células son estimuladas después con un ligando para el receptor diana y seguido sucesivamente de la estimulación con ligandos para los otros receptores encontrados en las células de la muestra. Una respuesta comparable de los receptores no diana al ligando en presencia o ausencia de compuesto indica que el compuesto activo es específico para el receptor diana.

Para determinar la quimiotaxis, se puede utilizar cualquier formato de análisis de la migración celular, tal como el sistema ChemoTx[®] (NeuroProbe, Rockville, MD) o cualquier otro sistema o dispositivo adecuado (Bacon et al., 1988; Penfold et al., 1999). En resumen, estos análisis de migración de células funcionan como sigue. Después de cosechar y preparar las células que portan el receptor de la quimioquina diana activo, las células se mezclan con los antagonistas candidato. La mezcla se coloca en la cámara superior del aparato de migración celular. A la cámara inferior, se le añade una concentración estimuladora de ligando de quimioquina. Después se ejecuta el análisis de migración, se termina, y se evalúa la migración celular.

Los autores de la invención han mostrado actividad de SHAAGtido en el receptor FPRL1 expresado en monocitos, neutrófilos, Células Dendríticas Inmaduras y Células Dendríticas Maduras. Por consiguiente, tales células se pueden utilizar en métodos de análisis *in vitro*. Se pueden utilizar poblaciones de células enriquecidas o esencialmente purificadas en análisis de quimiotaxis *in vitro*. Estas poblaciones de células se pueden preparar por medio de una variedad de métodos conocidos en la técnica dependiendo del tipo celular específico deseado. Típicamente, se preparan poblaciones de células esencialmente purificadas mediante cultivo en condiciones específicas, por sus características físicas tales como el comportamiento en un gradiente de densidad, mediante clasificación de acuerdo con marcadores característicos (p. ej., mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) utilizando anticuerpos (preferiblemente anticuerpos monoclonales) para las proteínas de la superficie celular, inmunoprecipitación), u otros métodos.

Se pueden identificar las células por medio de histología (véase, p. ej., Luna, 1968), mediante tinción inmunológica y métodos similares (véase, p. ej., Harlow et al. 1998; Coligan et al., 1991). Los métodos para preparar composiciones de células esencialmente purificadas para su uso en los análisis de quimiotaxis *in vitro* se describen brevemente más abajo y en los Ejemplos. No obstante, la invención no requiere la utilización de ningún método de purificación concreto, con tal que se obtengan las células deseadas; muchas variaciones y métodos alternativos son conocidos por los expertos en la técnica. Adicionalmente, se conocen en la técnica o se pueden desarrollar fácilmente muchos otros métodos de purificación y detección, incluyendo métodos para células no enumeradas específicamente en la presente memoria. Además, se pueden utilizar líneas celulares clonadas derivadas de tejidos del sistema inmunario, en los análisis de quimiotaxis descritos en la presente memoria, si se desea. Los métodos generales inmunológicos, de purificación y de cultivo celular se describen en Coligan et al. (1991), incluyendo los suplementos hasta 1999. A menos que se especifique de otro modo, las células en cultivo se incuban a 37°C en CO_2 al 5%.

Los métodos adecuados para la purificación de monocitos se encuentran en Bender et al., 1996. (véase también la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.126). En resumen, se aíslan monocitos de PBMC agotando células T utilizando anticuerpos inmovilizados contra un marcador de superficie celular pan T CD2. Convenientemente, se utiliza una fuente de anticuerpos para CD2 asequible comercialmente anclados a cuentas magnéticas (Dyna; Lake Success, NY). Se vuelven a suspender PBMC aislados de una capa leucocitaria (típicamente 35 ml que contienen 400×10^6 PMBC) mediante métodos de centrifugación en gradiente de Ficoll convencional en tampón MACS (DPBS (HyClone; Logan, UT) con BSA al 1% (Sigma)) a 20×10^6 células por ml. DPBS es Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco (CaCl_2 (0,1 g/l), KCl (0,2 g/l), KH_2PO_4 (0,2 g/l), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l), NaCl (8,0 g/l), Na_2HPO_4 (2,16 g/l)). Se añade una cantidad apropiada de CD2 inmovilizado + cuentas magnéticas (típicamente 10 μl por 10^6 células) a las células. La mezcla se incuba durante 15 minutos a 4°C con rotación suave. Las células T etiquetadas magnéticamente se separan de las células no marcadas en un clasificador celular magnético (Dyna) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las células no marcadas contienen principalmente monocitos y células B.

Las células B de la preparación anterior se separan sacando provecho de las propiedades de adherencia diferenciales. En resumen, se permite que las PBMC con las células T agotadas se adhieran al plástico de un matraz de cultivo de tejidos T-175 (100×10^6 células/matraz; Costar; Acton, MA) durante 3 horas a 37°C. Las células no adherentes (que comprenden en su mayor parte células B) se aspiran. Para eliminar completamente las células no adherentes, los matraces se enjuagan 3 veces más con DPBS. Las células resultantes están enormemente

enriquecidas (esto es, > 90%) en monocitos.

También se pueden aislar monocitos mediante selección positiva de antígeno CD14. En resumen, las PBMC aisladas de sangre periférica, tal como la capa leucocitaria, mediante métodos de centrifugación en gradiente de Ficoll convencionales se resuspenden en tampón MACS a 1×10^6 células/ml. Se añaden los anticuerpos inmovilizados frente al antígeno de superficie CD14, tal como microcuentas magnéticas CD14+ (Miltenyi) (1 μ l de cuentas por 1×10^5 células) y se incuba la mezcla a 4°C durante 15 minutos. Se separan los monocitos de las otras poblaciones de células haciendo pasar la mezcla a través de una columna de selección positiva sobre un clasificador celular magnético (Miltenyi Biotech; Auburn, CA) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Los monocitos que son retenidos en la columna se hacen eluir con tampón MACS una vez que la columna se separa del aparato MACS. Después las células se sedimentan mediante centrifugación y se resuspenden en RPMI más medio FCS al 10% a 10^6 células por ml. Los monocitos aislados mediante este método se cultivan esencialmente de la misma manera que los aislados mediante el método de agotamiento de CD2+.

Los métodos adecuados para la purificación de las células dendríticas, incluyendo la separación de las poblaciones maduras e inmaduras, son conocidos en la técnica. Se pueden preparar células dendríticas esencialmente purificadas (incluyendo subpoblaciones de células maduras e inmaduras) por medio de condiciones de cultivo *in vitro* selectivas.

Las células dendríticas están ampliamente distribuidas en todos los tejidos que tienen contacto con patógenos potenciales (*p. ej.*, piel, tractos gastrointestinal y respiratorio, y zonas ricas en células T de los tejidos linfoides secundarios). En la piel y el tracto respiratorio superior forman una entramados de células ampliamente ramificadas (denominadas células de Langerhans en la piel). Después de capturar el antígeno, las células dendríticas de los tejidos periféricos tales como la piel y el intestino, lo hacen circular a través de los vasos linfáticos de drenaje hacia las zonas con células T de los ganglios linfáticos donde presentan el antígeno internalizado. Las células dendríticas inmaduras funcionan absorbiendo y procesando los antígenos. Durante la migración posterior al ganglio linfático de drenaje, las CD maduran. Las células dendríticas maduras funcionan como CPA clave para iniciar las respuestas inmunitarias induciendo la proliferación de células T citotóxicas específicas de patógenos y coadyuvantes.

Las poblaciones esencialmente puras de células dendríticas pueden ser producidas mediante cultivo *in vitro*, más abajo). Además, existen cambios marcados en la expresión de los receptores de quimioquinas durante la maduración de células dendríticas que pueden ser utilizados para identificar la fase celular (Campbell *et al.* 1998; Chan *et al.* 1999; Dieu *et al.* 1998; Kellermann *et al.* 1999). Por ejemplo, las células dendríticas inmaduras expresan predominantemente CCR1, CCR5, y CXCR4. Tras la maduración, estos receptores, con la excepción de CXCR4, están regulados a la baja.

En cultivo, las formas inmaduras de las células dendríticas experimentan maduración que se piensa que es análoga a los eventos durante la migración de las células dendríticas desde el punto de contacto con el antígeno hasta los tejidos linfoides secundarios. Se pueden generar en cultivo células dendríticas humanas o de macaco de diferentes fases de desarrollo, a partir de progenitores sanguíneos CD14⁺ utilizando citoquinas específicas. Se puede diferenciar un linaje separado de células dendríticas a partir de células precursoras CD34+ de médula espinal o de médula ósea. En una realización de la invención, se generan subpoblaciones de células dendríticas para análisis *in vitro* para la identificación de composiciones quimiotácticas (esto es para evaluar la potencia y selectividad de la quimiotaxina frente a subtipos definidos de CD). Las subpoblaciones ilustrativas de células dendríticas son: (1) células derivadas de monocitos de sangre periférica; (2) células derivadas de monocitos de sangre periférica maduros, y (3) células derivadas de precursores CD34+. Las subpoblaciones son aisladas o producidas mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células dendríticas maduras e inmaduras de PBMC son producidas de acuerdo con Bender *et al. supra*.

En resumen, se agotan las células T de las PBMC utilizando anticuerpos inmovilizados contra el marcador de la superficie celular CD2 (presente en todas las células T). Se pueden utilizar dynabeads CD2+ disponibles en el mercado (Dynal) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La mezcla con las células T agotadas se separa en fracciones adherentes frente a no adherentes incubando las células sobre plástico de calidad para cultivo de tejidos durante 3 horas a 37°C. Las células no adherentes se separan suavemente, y las células adherentes (generalmente monocitos CD14⁺) se colocan en medio de cultivo (*p. ej.*, RPMI + FCS al 10%) con un suplemento de 1000 U/ml cada uno de GM-CSF e IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) ("Día 1"). Entre los días 3-7 las células comienzan a presentar una morfología velada, y se reabastecen de citoquinas los días 2, 4, y 6, en cuyo momento las células pueden ser cosechadas en forma de células dendríticas inmaduras. En una realización, las células de esta fase *in vitro* se aíslan y se utilizan en el análisis. Por lo general se obtienen aproximadamente 10×10^6 células dendríticas a partir de 400×10^6 PBMC.

El día 7 las células dendríticas inmaduras muestran la morfología típica de las células dendríticas, con un cuerpo celular alargado y muchos procesos. El tamaño de las células aumenta significativamente en comparación con los monocitos precursores. Las células dendríticas inmaduras se pueden caracterizar fenotípicamente controlando su

expresión de marcadores de la superficie celular.

Las células dendríticas inmaduras (generadas a partir de monocitos de sangre periférica o a partir de precursores CD34+ derivados de médula ósea) pueden ser activados adicionalmente y diferenciados para convertirse en células dendríticas maduras. Se utilizan principalmente dos métodos: MCM (medio acondicionado de macrófagos) y estimulación de ARN-poli (I:C) de doble hebra (Cella et al, 1999; Verdijk *et al.* 1999).

En el método de MCM, se cosechan células dendríticas inmaduras de 6 días mediante centrifugación y se resuspenden a 10^6 células/ml en medio de maduración (*p. ej.*, MCM diluido (hasta 1:1 con RPMI que contiene FCS al 10%). Se añaden GM-CSF (1000 U/ml) e IL-4 (1000 U/ml). Las células se cultivan durante tres días más, con una nueva adición de GM-CSF (1000 U/ml) e IL-4. Las células del Día 9 se utilizan como células dendríticas maduras.

En el método de poli (I:C), se cosechan células dendríticas inmaduras del Día 6 y se resuspenden en un medio de cultivo convencional (RPMI más FCS al 10%) con un suplemento de 20 µg/ml de poli (I:C) (Sigma), 1000 U/ml de GM-CSF e IL-4. Las células se cultivan otros tres días sin citoquinas adicionales. Las células del Día 9 se utilizan como células dendríticas maduras.

Las células dendríticas maduras generadas por estos dos métodos diferentes muestran propiedades fenotípicas y funcionales distintas de las de las células dendríticas inmaduras o los monocitos precursores. Las células dendríticas maduras de cada preparación se caracterizan perfectamente mediante FACS para asegurar que se han obtenido los tipos de células deseables.

Notablemente, las células dendríticas maduras generadas expresan un nivel significativamente superior de MHC de clase II sobre la superficie celular que las células inmaduras. La expresión de CD80, CD83 y CD86 también está regulada al alza. La expresión del receptor de quimioquinas también cambia espectacularmente durante el proceso de maduración. Por ejemplo, CCR1, CCR5 son regulados a la baja nítidamente en las células maduras, mientras CCR7 es regulado al alza y aparece sobre la superficie celular a las pocas horas de la adición de MCM. Funcionalmente, las células dendríticas maduras ya no son capaces de absorber eficazmente el antígeno, pero adquieren la capacidad de estimular la proliferación de células T y células B no sometidas a tratamiento previo. Las células dendríticas maduras también cambian sus comportamientos migratorios; ya no responden a los ligandos para CCR1, CCR2 y CCR5, tales como MIP-1 α , RANTES y MIP-1 β . En lugar de ello, responden a los ligandos para CCR7 SLC y ELC.

El MCM se prepara como describen Romani *et al.* 1996, con pequeñas modificaciones. En resumen, se recubren placas de petri (100 mm, Falcon) con 5 ml de Ig humana (10 mg/mL) durante 30 min a 37°C y se lavan con PBS 2-3 veces inmediatamente antes de su uso. Se disponen en capas 50×10^6 PBMC en 8 ml sobre las placas recubiertas con Ig durante 1-2 horas. Las células no adherentes se lavan y se descartan. Las células adherentes se incuban en medio completo de nueva aportación (RPMI + suero humano normal al 10%) a 37°C, y el medio resultante (MCM) se recoge después de 24 horas. Se determina la concentración de TNF- α en el MCM mediante el método ELISA convencional (*p. ej.*, utilizando un kit de ELISA para TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN)). El nivel de TNF- α final en el MCM se ajusta a 50 U/ml mezclando una cantidad apropiada de MCM con RPMI/suero de ternera fetal al 10%.

Los métodos adecuados para la purificación de neutrófilos son conocidos en la técnica. De acuerdo con un método adecuado, se diluye sangre fresca completa (WB) 1:1 con dextrano al 3% en un tubo de centrifuga de 50 ml y se deja que se sedimente durante 30 - 45 minutos a la temperatura ambiente. Veinticinco ml de WB más 25 ml de dextrano dan como resultado aproximadamente 35 ml de sobrenadante después de 30 minutos de sedimentación. El sobrenadante se aplica en capas sobre 12-15 ml de Ficoll y se centrifuga a 400 x g durante 30-40 minutos a 18-20°C. La capa de plasma/plaquetas que contiene células mononucleares y Ficoll-Paque se separa mediante aspiración. Los neutrófilos se encuentran en la capa blanca por encima de la capa de eritrocitos (RBC). (En algunas preparaciones, las capas de neutrófilos y eritrocitos están mezcladas. En estos casos, las RBC se separan mediante lisis hipotónica: se añaden 12,5 ml de NaCl al 0,2% frío al sedimento de neutrófilos/RBC mientras se someten a vórtice. Se añaden inmediatamente 12,5 ml de NaCl al 1,6% frío mientras se somete a vórtice. Las células se centrifugan a 60 - 100 x g durante 10 m y se recuperan. Si fuera necesario se repite la etapa de lisis). Los neutrófilos resultantes tienen una pureza >95% (con eosinófilos como células restantes primarias).

Análisis Prognóstico

Los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria se pueden utilizar además para identificar sujetos que tienen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociados con la expresión o actividad aberrante del receptor FPRL1 o el ligando de FPRL1. Por ejemplo, se pueden utilizar los análisis descritos para identificar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno tal como un trastorno neurodegenerativo. Típicamente, se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto y se detecta el receptor FPRL1 o el ligando de FPRL-1 o se analiza su actividad. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un fluido biológico (*p. ej.*, suero), una muestra de células, o un tejido.

Se pueden utilizar análisis pronósticos para determinar si se puede administrar a un sujeto una modalidad (*p. ej.*, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, alimento, *etc.*) para tratar una enfermedad o trastorno asociados con la expresión o actividad aberrante del receptor FPRL1 o el ligando de FPRL1. Tales métodos se pueden utilizar para determinar si un sujeto puede ser tratado eficazmente con un agente por un trastorno. Asimismo se describen en la presente memoria métodos para determinar si un sujeto puede ser tratado eficazmente con un agente por un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante del receptor FPRL1 o el ligando de FPRL1. En dicho análisis, se obtiene una muestra de ensayo y se detecta un SHAAGtido o un ácido nucleico (*p. ej.*, donde la presencia de SHAAGtido o ácido nucleico es diagnóstico para un sujeto al que se puede administrar el agente para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante del receptor FPRL1 o el ligando de FPRL1).

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención y no se pretende que sean limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: CKβ8-1 (25-116), como otras variantes de CKβ8, estimula el flujo de calcio intracelular en células que expresan CCR1.

Las quimioquinas recombinantes humanas, la leucotactina, tres variantes de CKβ8 conocidas CKβ8(1-99), CKβ8(25-99), CKβ8-1(1-116) y una forma truncada NH₂-terminal novedosa de CKβ8-1, CKβ8-1(25-116) fueron obtenidas de R&D Systems (Minneapolis, MN). Se comparó CKβ8-1(25-116) con las otras tres variantes para determinar la capacidad para lograr una movilización del calcio intracelular en células HEK239 transfectadas con CCR1 humanas estables. Se prepararon células HEK293-CCR1 humanas utilizando Fugena 6 (Roche, IN) siguiendo el protocolo del fabricante. Las líneas de células HEK-293 se mantuvieron en DMEM con FBS al 10% con un suplemento de 800 µg/ml de G-418.

Se obtuvo la expresión estable del receptor CCR1 de quimioquina humano en células HEK293 como sigue: se clonó ADNc completo que codificaba CCR1 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico aislado de células de sangre periférica humana. El producto de la PCR se clonó en pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando procedimientos de clonación molecular convencionales y se secuenció completamente para confirmar su identidad.

Se utilizaron dos microgramos del constructo CCR1/pcDNA3.1 para transfectar las células HEK293 como sigue. Se preparó complejo FuGENE:DNA mezclando 6,0 µl de reactivo FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals, CA) y 2 µg de CCR1/pcDNA3.1 en 100 µl de medio sin suero (Hyclone, CO). Después de incubar durante 30 minutos a la temperatura ambiente, se añadió el complejo a una placa de cultivo de 60 mm que contenía 0,5 · 10⁶ células en 10 ml de medio DMEM con un suplemento de FBS al 10% (Hyclone, CO). Después de mezclar, las células se hicieron volver a la incubadora para cultivar a 37°C durante dos días. A las 48 horas de la transfección, se añadió Genetinin (G418) (Mediatech, Hemdon, VA) a una concentración final de 800 µg/ml. Las células se cultivaron después en placa en placas de 96 pocillos a una concentración de 20.000 células/pocillo. Después de 2-3 semanas bajo selección con G418, se evaluaron las células que expresaban CCR1 resistentes a geneticina estables para determinar su capacidad para movilizar el calcio en respuesta a MIP-1α a una concentración de 1-500 nM.

Las respuestas de movilización de Ca²⁺ se realizaron utilizando el colorante fluorescente radiométrico intracelular, Indo-1. Las células se cargaron con Indo-1/AM (3 µM; Molecular Probes, Eugene, OR) en medio de cultivo (45 min, 20°C, 10⁷ células/ml). Después de cargar el colorante, las células se lavaron una vez con 10 ml de PBS) y se resuspendieron a 10⁶ células/ml en HBSS que contenía FBS al 1%. Se determinó la liberación de [Ca²⁺] citosólico utilizando la excitación a 350 nm utilizando un fluorómetro Photon Technology International (excitación a 350 nm, emisión dual ajustada a 400 y 490 nm).

Con los transfectantes HEKCCR1-293, CKβ8-1(25-116) y las otras variantes de CKβ8 indujeron un rápido flujo de calcio a 100 nM. Las dos variantes truncadas CKβ8(25-99) y CKβ8-1(25-116) indujeron una elevada respuesta de calcio, mientras las señales generadas por las variantes CKβ8(25-99) y CKβ8-1(1-116) fueron inferiores. Ninguna de estas quimioquinas indujo una señal con las células HEK293 parentales no transfectadas, demostrando que la actividad es debida a CCR1 y no a un receptor endógeno. Las estimulaciones de receptores máximas obtenidas con CKβ8(25-99) y CKβ8-1(25-116) 100nM fueron equivalentes a las obtenidas con la misma concentración del agonista de CCR1, leucotactina.

Ejemplo 2: la variante de CCL23 CKβ8-1(25-116) presenta un perfil de actividad único en monocitos y neutrófilos humanos que no es un evento ligado a CCR1.

Las quimioquinas recombinantes humanas, la leucotactina, MIP-1α, tres variantes de CKβ8 conocidas CKβ8(1-99), CKβ8(25-99), CKβ8-1(1-116) y una forma truncada NH₂-terminal novedosa de CKβ8-1, CKβ8-1(25-116) se obtuvieron de R&D Systems (Minneapolis, MN). Se generaron monocitos humanos a partir de capas leucocitarias

(Stanford Blood Center, Palo Alto, CA) siguiendo un protocolo convencional. En resumen, se aislaron PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad convencional (Ficoll-Paque-Plus, Pharmacia). Los monocitos se purificaron utilizando la selección positiva magnética con CD14 Microbeads (Miltenyi, Auburn, CA). Se aislaron neutrófilos humanos a partir de sangre periférica fresca de individuos sanos mediante centrifugación en gradiente sobre Ficoll-Hypaque (Hyclone, CA).

La actividad de las variantes de CCL23 fue sometida a ensayo sobre monocitos y neutrófilos humanos recién preparados utilizando el ensayo de flujo de calcio descrito en el Ejemplo 1. Aunque todas las quimioquinas estimularon algo la liberación de calcio en monocitos, CK β 8(1-99) y CK β 8-1(1-116) mostraron una escasa actividad, incluso a 250nM. CK β 8(25-99) mostró una estimulación de calcio ligeramente superior. Sin embargo, CK β 8-1(25-116) mostró un flujo de calcio único con una liberación de calcio ampliada. La máxima estimulación del receptor obtenida con CK β 8-1(25-116) 100 nM fue al menos dos veces superior a la obtenida con la misma concentración de leucotactina.

En neutrófilos, la leucotactina 100 nM indujo flujo de calcio pero ni MIP-1 α ni CK β 8(1-99), CK β 8(25-99) ni CK β 8(1-116) indujeron flujo de calcio. Sin embargo, CK β 8-1(25-116) indujo una liberación de calcio única. La magnitud fue mucho mayor que la observada para la misma cantidad de estimulación con leucotactina.

Ejemplo 3: Ensayo de desensibilización cruzada realizado en transfectantes HEK293-CCR1, monocitos y neutrófilos.

En los ensayos de desensibilización cruzada, las células se estimularon sucesivamente con leucotactina y después las quimioquinas CK β 8(1-99), CK β 8(25-99), CK β 8-1(1-116), y CK β 8-1(25-116). En los transfectantes HEK293-CCR1 (preparados en el Ejemplo 1), la leucotactina indujo patrones similares de desensibilización del receptor para todas las variantes. Cuando las células fueron pretratadas con leucotactina 100 nM, la respuesta de flujo de calcio a todos los ligandos fue completamente inhibida.

Se realizaron ensayos de desensibilización cruzada de receptores similares utilizando tanto monocitos como neutrófilos (preparados como en el Ejemplo 2). En monocitos, la leucotactina desensibilizó completamente las variantes de CCL23, CK β 8(1-99), CK β 8(25-99), CK β 8-1(1-116). Por el contrario, la preestimulación con leucotactina no sensibilizó la actividad de CK β 8-1(25-116) sobre monocitos. En neutrófilos, CK β 8(1-99), CK β 8(25-99), y CK β 8-1(1-116) fueron inactivos y la preestimulación con leucotactina no tuvo efecto. Sin embargo, la preestimulación con leucotactina no desensibilizó la estimulación con CK β 8-1(25-116).

Ejemplo 4: Las variantes de CCL23 compiten con I¹²⁵-MIP-1 α por la unión a células que expresan CCR1.

Las características de unión de las variantes de CCL23 se compararon en células que expresaban CCR1 humano. La capacidad de MIP-1 α y de las variantes de CCL23 CK β 8(1-99), CK β 8(25-99), CK β 8-1(1-116) y CK β 8-1(25-116) para competir con la unión I¹²⁵-MIP-1 α se investigó en células HEK293:CCR1 (preparadas como se describe en el Ejemplo 1). Las células se incubaron con MIP-1 α marcado con I¹²⁵ (concentración final ~ 0,05 nM) en presencia de quimioquina no marcada (3 horas a 4°C: HEPES 25 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM y BSA al 0,2%, ajustado a pH 7,1). Las mezclas de reacción se aspiraron sobre filtros de fibra de vidrio GF/B tratados con PEI utilizando un cosechador celular (Packard). Los filtros se lavaron dos veces (HEPES 25 mM, NaCl 500 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, ajustado a pH 7,1). Se añadió agente de centelleo (MicroScint-10; 35 μ l) a filtros secos y los filtros se sometieron a recuento en un contador de centelleo Packard Topcount. Los datos se analizaron y se trazaron utilizando el programa Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

Se observaron las curvas de competición con concentraciones crecientes de MIP-1 α o variantes de CCL23. MIP-1 α produjo una CI50 de 0,54 nM. Las variantes de CCL23 produjeron valores de CI50 de 64 nM, 1,34 nM, 206 nM, y 112 nM, respectivamente. CK β 8-1(1-116) mostró 3-4 veces menos potencia que CK β 8(1-99) en su transfectante para el desplazamiento del I¹²⁵-MIP-1 α unido desde CCR1, coincidente con su afinidad relativamente débil para CCR1. Asimismo, como se esperaba, el truncamiento de CK β 8(1-99), CK β 8(25-99), mostró un incremento de 40 veces en la CI50. Sin embargo, la CI50 para CK β 8-1(25-116), la variante truncada en el mismo aminoácido de CK β 8-1(1-116), solamente se incrementa una vez.

Se llevaron a cabo ensayos de competición por la unión en simios sobre monocitos y neutrófilos. Estas células fueron preparadas como en el Ejemplo 2. La competición por la unión entre MIP-1 α en neutrófilos no pudo ser estudiada, puesto que MIP-1 α no se une a neutrófilos. En monocitos, MIP-1 α tiene una CI50 de 0,27 nM, y las variantes de CCL23 CI50 de 10 nM, 0,25 nM, 55 nM, y 5 nM, respectivamente. En general, CK β 8(1-99) y CK β 8(25-99) mostraron una CI50 similar a la observada en células HEK293-CCR1. Sin embargo, CK β 8-1(1-116) y CK β 8-1(25-116) mostraron actividades de desplazamiento de MIP-1 α superiores en monocitos, especialmente CK β 8-1(25-116) que fue 10 veces superior. Los datos de competición por la unión de I¹²⁵-MIP-1 α (CI50) se muestran en la Tabla 6. La CI50 para cada interacción fue obtenida del ajuste de curvas por mínimos cuadrados no lineales.

Tabla 6. Datos de la Competición por la Unión de ^{125}I -MIP-1 α para transfectantes HEK293-CCR1 y Monocitos

	HEK293-CCR1	Monocitos
MIP1 α	0,54 nM	0,27 nM
CK β 8(1-99)	64 nM	10,3 nM
CK β 8(25-99)	1,34 nM	0,25 nM
CK ρ 8-1(1-116)	206 nM	55 nM
CK β 8-1(25-116)	112 nM	5,1 nM

Ejemplo 5 La variante CK β 8-1(25-116) induce la migración de monocitos y neutrófilos humanos con una propiedad migratoria novedosa.

5 Se realizaron análisis de migración en monocitos y neutrófilos. Los monocitos y neutrófilos humanos (preparados como en el Ejemplo 2) fueron cosechados y resuspendidos en medio de quimiotaxis (CM). El CM consistió en solución salina tamponada de Hank (Gibco, MA) que contenía CaCl_2 (1 mM) y MgSO_4 (1 mM) con BSA al 0,1% añadido (Sigma, St. Louis, MO). Los análisis se realizaron en microplacas ChemoTx® de 96 pocillos (Neuroprobe, MA). Se añadieron leucotactina, MIP-1 α y quimioquinas (CK β 8(1-99), CK β 8(25-99), CK β 8-1(1-116) o CK β 8-1(25-116), preparadas como en el Ejemplo 1) a los pocillos inferiores (volumen final 29 μL), y se añadieron 20 μL de suspensión celular (5×10^6 células/mL para los monocitos; $2,5 \times 10^6$ células/mL para los neutrófilos) a los filtros de policarbonato (tamaño de poro de 5 μm para los monocitos; tamaño de poro de 3 μm para los neutrófilos). Después de incubar durante 90 min (37°C, 100% humedad, CO_2 al 5%), las células se separaron de la superficie superior del filtro raspando. Las células que migraban a la cámara inferior fueron cuantificadas utilizando el kit de análisis de proliferación celular Quant (Molecular Probes, OR).

En monocitos, CK β 8-1(25-99), CK β 8-1(1-99) y CK β 8-1(1-116) mostraron una actividad moderada a todas las concentraciones hasta 100 nM. CK β 8-1(25-116) mostró una actividad espectacularmente superior a la de las otras tres variantes a 100 nM, aunque su actividad a 1 y 10 nM fue muy similar a la de las otras variantes.

Se realizó el mismo ensayo en neutrófilos humanos. Generalmente los neutrófilos humanos carecían de respuesta a los ligandos de CCR1. Coincidiendo con los resultados del flujo de calcio, ninguno de los ligandos de CCR1 conocidos incluyendo leucotactina y MIP-1 α era activo. No obstante, CK β 8-1(25-116) indujo una respuesta robusta a 100 nM. Esta magnitud es comparable a muchos otros ligandos de CXCR1 y CXCR1 potentes incluyendo IL-8 y GRO- α .

Ejemplo 6 CK β 8-1(25-116) es capaz de inducir flujo de calcio intracelular y quimiotaxis en células que expresan receptor de péptidos formilados de tipo 1 (FPRL1).

Las actividades funcionales de CK β 8-1(25-116) fueron investigadas en transfectantes FPRL1-L1.2 humanos y en células L1.2 nativas. La expresión estable del receptor de péptidos formilados de tipo 1 (FPRL1) en células L1.2 se obtuvo como sigue. Se clonó ADNc completo que codificaba FPRL1, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de ADN genómico aislado de células HL-60 indiferenciadas. El producto de la reacción en cadena de la polimerasa se clonó en pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando procedimientos de clonación molecular convencionales y se secuenció completamente para confirmar su identidad. Se linealizaron 20 μg del constructo FPRL1/pcDNA3.1 mediante digestión con Bsm 1 (New England Biolabs, Beverly, MA) y se utilizaron para transfectar la línea de células B murina L1.2 como sigue. Se lavaron 25 millones de células dos veces y se resuspendieron en 0,8 ml de PBS. Las células se incubaron durante 10 min a la temperatura ambiente con el ADN del constructo FPRL1/pcDNA3.1 linealizado y se transfirieron a una cubeta de 0,4 cm, y se aplicó un único pulso de electroporación a 250 V, 960 μF . Las células sometidas a electroporación se incubaron durante 10 min a la temperatura ambiente y se transfirieron a un cultivo a 37°C en RPMI con un suplemento de FCS al 10%. Se añadió Geneticina (G418) a una concentración final de 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 48 h después de la transfección y las células se cultivaron en placa en placas de 96 pocillos a 25.000 células/pocillo. Después de 2-3 semanas bajo selección con fármaco, se evaluaron las células que expresaban FPRL1 resistentes a geneticina estables para determinar su capacidad para movilizar Ca^{++} en respuesta al SHAAGtd o CK β 8-1 a concentraciones de 1 a 1000 nM.

Se realizó un ensayo de flujo de calcio con estos transfectantes utilizando el método descrito en el Ejemplo 1. De las variantes de CCL23, solamente CK β 8-1(25-116) estimuló la liberación de calcio en células que expresaban FPRL1. Los péptidos sintéticos Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH $_2$ (WKYMVM) y Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH $_2$ (WKYMMV) ("péptidos W 1 y 2") (obtenidos de Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA)), ligandos no naturales conocidos para FPRL1, produjeron un flujo de calcio robusto. No se observó una liberación de calcio inducida por CK β 8-1(25-116) en células parentales o en células transfectadas con otros receptores de quimioquinas. Cuando se realizó un análisis de respuesta a la dosis de flujo de calcio inducido por CK β 8-1(25-116), se observó una CE50 de 10-20 nM en estas

células. CKβ8-1(1-116) no mostró actividad sobre las células que expresaban FPRL1, ni siquiera a 200 nM.

Se examinó la capacidad de CKβ8-1(25-116) para lograr la migración de las células que expresaban FPRL1. Las condiciones del ensayo fueron las del Ejemplo 5. Aunque las células L1.2 parentales no migraban en el análisis, las células que expresaban FPRL1 migraban de una manera dependiente de la dosis con forma de campana en respuesta a concentraciones de CKβ8-1(25-116) que oscilaban de 1 nM a 1 μM. La migración celular semi-máxima se observó a 30 nM. La magnitud de la respuesta máxima fue superior a la observada con los péptidos sintéticos WKYMVM y WKYMVM. En general, en comparación con otras quimioquinas, CKβ8-1(25-116) mostró una curva en forma de campana más ancha en la migración mediada por FPRL1. Por consiguiente, además de su actividad sobre CCR1, CKβ8-1(25-116) también funciona a través del receptor FPRL1 expresado en monocitos y neutrófilos.

Ejemplo 7 CKβ8-1(25-116) es capaz de desplazar la unión de WKYMVM marcado con I¹²⁵ en monocitos humanos y células que expresan FPRL1

La unión de CKβ8-1(25-116) a FPRL1 se determinó midiendo la capacidad de CKβ8-1(25-116) para desplazar WKYMVM marcado con I¹²⁵ (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH₂ marcado con I¹²⁵, Perkin Elmer Life Science (Boston, MA)) de transfectantes FPRL1-L1.2 humanos y monocitos humanos. Las células se incubaron con WKYMVM- I¹²⁵ 0,01 nM en presencia de concentraciones crecientes de WKYMVM no marcado o CKβ8-1(25-116) durante tres horas a 4°C. La CI50 para cada interacción se obtuvo del ajuste de la curva por mínimos cuadrados no lineal de los datos utilizando el programa Prism (GraphPad Software).

Para los transfectantes FPRL1-L1.2 y los monocitos, se observaron curvas de competición con concentraciones crecientes de WKYMVM o CKβ8-1(25-116) (Tabla 7). Tales curvas no se observaron para otras variantes de CCL23.

Tabla 7 Curvas de competición para WKYMVM marcado con I¹²⁵ observadas con WKYMVM y CKβ8-1(25-116).

	CI50	
	Monocitos Humanos	Células L1.2 EPRL1
WKYMVM	1,5 nM	80 nM
CKβ8-1(25-116)	31 nM	196 nM

Ejemplo 8 Movilización de calcio inducida por quimioquinas o SHAAGtido por Células Dendríticas Inmaduras, Células Dendríticas Maduras o Neutrófilos.

Se obtuvo la quimioquina CKβ8-1 (25-116) recombinante humana de R&D Systems (Minneapolis, MN). Los péptidos SHAAGtidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6 y una proteína de control (la secuencia inversa del SEQ ID NO: 1) se sintetizaron y se purificaron mediante HPLC utilizando técnicas de rutina como las descritas por Sambrook *et al.*, 1989, y Ausubel *et al.*, 1999.

Los monocitos humanos fueron generados o bien a partir de capas leucocitarias (Stanford Blood Center, Palo Alto, CA) o a partir de sangre fresca de individuos sanos siguiendo un protocolo convencional. En resumen, se aislaron PBMC mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque (Ficoll-Paque-Plus, Pharmacia). Los monocitos se purificaron mediante selección positiva magnética con CD14 Microbeads (Miltenyi). Los neutrófilos humanos se aislaron a partir de sangre fresca mediante sedimentación con dextrano y centrifugación en gradiente Ficoll-Paque. Todas las células se lavaron y se resuspendieron (1×10^7 /ml) en medio RPMI con FBS al 10%.

Las CD inmaduras se obtuvieron cultivando monocitos CD14+ en presencia de GM-CSF e IL4. En resumen, se cultivaron en un matraz T-175 a 10^6 células/ml en RPMI/FCS al 10%. Se añadieron GM-CSF humanos e IL4 el día 0, 2, 4 y 6 a una concentración final de 1000 u/ml y 500 u/ml, respectivamente. Las células se cosecharon el día 7 en forma de DC inmaduras y se caracterizaron para determinar la expresión de la proteína superficial mediante análisis FACS. Se llevó a cabo la maduración de las CD cultivando 6 días CD inmaduras en medio acondicionado para macrófagos (MCM). En resumen, se cosecharon CD mediante centrifugación y se resuspendieron en MCM a 10^6 células/ml. Al medio se le añadió un suplemento de 1000 u/ml de GM-CSF y 500 u/ml de IL4. Después de tres días más de cultivo, las células se cosecharon en forma de CD maduras y se caracterizaron por medio de citometría de flujo para determinar la expresión de la proteína superficial.

Se preparó MCM como sigue: los PBMC aislados de la capa leucocitaria se incubaron a 37°C en un matraz de plástico previamente recubierto con 10 mg/ml de IgG humana (Sigma, St Louis, MO) durante 30 minutos. Después de 30 minutos, se separaron las células no adherentes y las células adherentes se lavaron tres veces con DPBS, después se cultivaron en RPMI/suero humano al 10%. El medio acondicionado se recogió después de 24 horas. Se determinó la concentración de TNF-α, que es crítica para la maduración de las CD, utilizando un kit de ELISA para TNF-α (R&D Systems, MN). El nivel de TNF-α final se ajustó a 50 u/ml mezclando con RPMI/suero humano al 10%, y se almacenó a 80 hasta su uso.

5 Las respuestas de movilización de Ca^{2+} se realizaron utilizando un colorante fluorescente radiométrico intracelular, Indo-1. Las células se cargaron con Indo-1/AM (3 μ M; Molecular Probes (Eugene, OR)) en medio de cultivo (45 min, 20°C, 10^7 células/ml). Después de cargar el colorante, las células se lavaron una vez (10 ml PBS) y se resuspendieron a 10^6 células/ml en HBSS que contenía FBS al 1%. Se determinó la liberación de $[Ca^{2+}]$ citosólico utilizando la excitación a 350 nm empleando un fluorómetro Photon Technology International (excitación a 350 nm, emisión dual ajustado a 400 y 490 nm).

10 Los SHAAGtidos del SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6, así como CK β 8-1(25-116), produjeron un flujo de calcio robusto en monocitos y neutrófilos humanos y fueron parcialmente activos sobre Células Dendríticas inmaduras y Células Dendríticas maduras. No se observó un flujo de calcio significativo con el péptido de control. Puesto que las Células Dendríticas inmaduras expresan elevados niveles de CCR1, CK β 8-1(25-116) induce la liberación de Ca^{2+} en estas células.

15 **Ejemplo 9 Movilización de calcio inducida por quimioquina, SHAAGtido, y variantes truncadas de SHAAGtido por células FPRL1 expresadas estables.**

20 Se obtuvo la expresión estable de FPRL1 humano en células L1.2 como en el Ejemplo 6. Los ensayos del flujo de calcio se llevaron a cabo en los transfectantes utilizando el método descrito en el Ejemplo 1. Las quimioquinas (CK β 8(1-99), CK β 8(25-99), CK β 8-1(1-116) y CK β 8-1(25-116), se prepararon como en el Ejemplo 1. Se obtuvieron los péptidos W 1 y 2 como en el Ejemplo 6. Además, se sometieron a ensayo las siguientes secuencias de SHAAGtido y las variantes truncadas (preparadas como en el Ejemplo 8):

CCXP1	SEQ ID NO: 1
CCXP2	SEQ ID NO: 2
CCXP3	SEQ ID NO: 3
CCXP4	SEQ ID NO: 4
CCXP5	SEQ ID NO: 5
CCXP6	SEQ ID NO: 6
CCXP7	SEQ ID NO: 7
CCXP8	SEQ ID NO: 8
CCXP9	SEQ ID NO: 9
CCXP10	SEQ ID NO: 10

25 Todos los ligandos se añadieron de una manera dosis respuesta y se determinó la respuesta de flujo de calcio pico. La Tabla 8 demuestra que CK β 8(25-116) (SEQ ID NO: 16) y ciertos SHAAGtidos inducían la movilización de calcio en transfectantes FPRL1. Sin embargo, CK β 8(1-116), que no contiene un extremo N de SHAAGtido libre, no produjo una movilización significativa. Los datos también indican que el extremo N del SHAAGtido es importante para su actividad en transfectantes de FPRL1. Aquellos SHAAGtidos que tienen un extremo N truncado tienen una
30 movilización de calcio enormemente reducida. Los SHAAGtidos que tenían un extremo C truncado o sustituido no mostraron la misma pérdida de actividad que se observó tras el truncamiento del extremo N.

Tabla 8 – Inducción del Flujo de Calcio en células FPRL1-L1.2. (CI50 – donde no se enumera valor de CI50, la secuencia mostró una actividad baja o no mostró actividad significativa.)

	CI 50
SEQ ID NO: 1	150 nM
SEQ ID NO: 2	>50 μ M
SEQ ID NO: 3	68 nM
SEQ ID NO: 4	-
SEQ ID NO: 5	7,4 nM
SEQ ID NO: 6	38 nM
SEQ ID NO: 7	-
SEQ ID NO: 8	45 nM

	CI 50
SEQ ID NO: 9	-
SEQ ID NO: 10	-
SEQ ID NO: 13 - CK β 8(1-99)	-
SEQ ID NO: 14 - CK β 8(25-99)	-
SEQ ID NO: 15 CK β 8(1-116)	-
SEQ ID NO: 16 CK β 8(25-116)	11 nM
péptido W 1	0,7 nM
péptido W 2	<0,1 μ M

Ejemplo 10 Actividad quimiotáctica de quimioquinas, SHAAGtido y variantes truncadas de SHAAGtido sobre células FPRL1-L1.2.

- 5 La actividad quimiotáctica de las quimioquinas (CK β 8(1-99) y CK β 8(25-99), los SHAAGtidos (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) y los péptidos W 1 y 2 (obtenidos como en el Ejemplo 6) en células FPRL1-L1.2 se determinó en análisis de migración. Las quimioquinas se prepararon como en el Ejemplo 1. Las secuencias de SHAAGtido SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se prepararon como en el Ejemplo 8. Las células FPRL1-L1.2 se prepararon como en el Ejemplo 6.
- 10 Los análisis de migración se llevaron a cabo en microplacas ChemoTx® de 96 pocillos (Neuroprobe) utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 5. Tanto SEQ ID NO: 1 como CK β 8-1(25-116) hicieron migrar los transfectantes, indicando que son funcionales para este receptor.

Ejemplo 11 Actividad quimiotáctica de quimioquinas, SHAAGtido y variantes truncadas de SHAAGtido en monocitos y neutrófilos humanos.

- 15 La actividad quimiotáctica sobre monocitos y neutrófilos humanos de las quimioquinas: CK β 8(1-99), CK β 8(25-99), CK β 8(1-116) y CK β 8(25-116); los péptidos W 1 y 2 y las secuencias de SHAAGtidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se determinaron en análisis de migración. Los péptidos anteriores se prepararon como en los ejemplos anteriores.
- 20 Los análisis de migración se realizaron en microplacas CHEMOTX® de 96 pocillos (Neuroprobe) utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 5. Tanto el SEQ ID NO: 1 de SHAAGtido como CK β 8-1(25-116) produjeron la migración tanto de neutrófilos como de monocitos.

Referencias

- 25 Patente de los Estados Unidos Núm. 4.522.811. Serial injection of muramyldipeptides and liposomes enhances the anti-infective activity of muramyldipeptides. 1985
- Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409. Directed evolution of novel binding proteins. 1993.
- 30 Patente de los Estados Unidos Núm. 5.328.470. Treatment of diseases by site-specific instillation of cells or site-specific transformation of cells and kits therefor. 1994.
- Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.126. Method for in vitro proliferation of dendritic cell precursors and heir use to produce immunogens. 1999.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, et al. 1987. Current protocols in molecular biology. John. Wiley & Sons, New York.
- 35 Baek SH, Seo JK, Chae CB, Suh PG, Ryu SH. 1996. Identification of the peptides that stimulate the phosphoinositide hydrolysis in lymphocyte cell lines from peptide libraries. J Biol Chem 271(14):8170-5.
- Baggiolini, M., y C. A. Dahinden. 1994. CC chemokines in allergic inflammation. Immunol Today 15:127.
- Baggiolini, M., B. Dewald, y B. Moser. 1997. Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol 15:675.
- Bender et al., 1996, J. Immunol. Methods 196:121-35
- 40 Berkhout, T. A., J. Gohil, P. Gonzalez, C. L. Nicols, K. E. Moores, C. H. Macphee, J. R. White, y P. H. Groot. 2000. Selective binding of the truncated form of the chemokine CKbeta8 (25- 99) to CC chemokine receptor I (CCR1). Biochem Pharmacol 59:591.
- Bonecchi, R., N. Polentarutti, W. Luini, A. Borsatti, S. Bernasconi, M. Locati, C. Power, A. Proudfoot, T. N. Wells, C. Mackay, A. Mantovani, y S. Sozzani. 1999. Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. J Immuno/ 162:474.
- 45 Bao L, Gerard NP, Eddy RL Jr, Shows TB, Gerard C. 1992. Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19. Genomics 13(2):437-40.
- Campbell et al., 1998, J Cell Biol 141:1053
- 50 Carell, T., E.A. Wintner, y J. Rebek Jr. 1994a. A novel procedure for the synthesis of libraries containing small

- organic molecules. *Angewandte Chemie International Edition*. 33:2059-2061.
- Carell, T., E.A. Wintner, y J. Rebek Jr. 1994b. A solution phase screening procedure for the isolation of active compounds from a molecular library. *Angewandte Chemie International Edition*. 33:2061-2064.
- Carter, P. 1986. Site-directed mutagenesis. *Biochem J*. 237:1-7.
- 5 Cella et al, 1999, *J Exp Med*. 189:821-9.
- Chan et al., 1999, *Blood* 93:3610.
- Chen, S.H., H.D. Shine, J.C. Goodman, R.G. Grossman, et al. 1994. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:3054-7.
- Cho, C.Y., E.J. Moran, S.R. Cherry, J.C. Stephans, et al. 1993. An unnatural biopolymer. *Science*. 261:1303-5.
- 10 Christophe, T., Karlsson, A., Dugave, C, Marie-Josèphe Rabiet, Francois Boulay, F., y Dahlgren, C. (2001). The Synthetic Peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ Specifically Activates Neutrophils through FPRL1/Lipoxin A4 Receptors and Is an Agonist for the Orphan Monocyte-expressed Chemoattractant Receptor FPRL2. *J. Biol. Chem., Viol.* 276, Issue 24, 21585-21593. Cohen. 1993. *Science* 259:1691-1692.
- Coligan, 1991. *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene, NY.
- 15 Cull, M.G., J.F. Miller, y P.J. Schatz. 1992. Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:1865-9.
- Cwirla, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett, and W.J. Dower. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:6378-82.
- Deng, X., Ueda, H., Su, S. B., Gong, W., Dunlop, N. M., Gao, J.-L., Murphy, P. M., e Wang, J. M. (1999) A Synthetic Peptide Derived From Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Downregulates the Expression and Function of Chemokine Receptors CCR5 and CXCR4 in Monocytes by Activating the 7-Transmembrane G-Protein-Coupled Receptor FPRL1/LXA4R. *Blood* 94, 1165-1173.
- 20 Devlin, J.J., L.C. Panganiban, e P.E. Devlin. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science*. 249:404-6.
- 25 DeWitt, S.H., J.S. Kiely, C.J. Stankovic, M.C. Schroeder, et al. 1993. "Diversomers": an approach to nonpeptide, nonoligomeric chemical diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:6909-13.
- Dieu et al., 1998, *J Exp Med* 188:373.
- Fantuzzi, L., P. Borghi, V. Ciolli, G. Pavlakis, F. Belardelli, y S. Gessani. 1999. Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood* 94:875 Felici, F., L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli, et al. 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol*. 222:301-10.
- 30 Fodor, S.P., R.P. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, et al. 1993. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*. 364:555-6.
- 35 Forssmann, U., M. B. Delgado, M. Ugucioni, P. Loetscher, G. Garotta, y M. Baggiolini. 1997. CKbeta8, a novel CC chemokine that predominantly acts on monocytes. In *FEBS Lett*, Vol. 408, p. 211.
- Gallop, M.A., R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P. Fodor, et al. 1994. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J Med Chem*. 37:1233-51.
- Gennaro, A.R. 2000. *Remington: The science and practice of pharmacy*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- 40 Harlow, E., y D. Lane. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 págs.
- Harlow, E., y D. Lane. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 45 Houghten, R.A., J.R. Appel, S.E. Blondelle, J.H. Cuervo, et al. 1992. The use of synthetic peptide combinatorial libraries for the identification of bioactive peptides. *Biotechniques*. 13:412-21.
- Kaufman, R.J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells. *Methods Enzymol*. 185:487-511.
- Kellermann et al., 1999, *J Immunol* 162:3859.
- Kriegler, M. 1990. *Gene transfer and expression: A laboratory manual*. Stockton Press, New York. 242 pp
- 50 Lam, K.S. 1997. Application of combinatorial library methods in cancer research and drug discovery. *Anticancer Drug Design*. 12:145-167.
- Lam, K.S., S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, et al. 1991. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Nature*. 354:82-84.
- Le, Y., Oppenheim J. J., y Wang, J. M. 2001. Survey: Pleiotropic roles of formyl peptide receptors, Cytokine and Growth Factor Reviews 12: 91-105.
- 55 Lee, S. C., M. E. Brummet, S. Shahabuddin, T. G. Woodworth, S. N. Georas, K. M. Leiferman, S. C. Gilman, C. Stellato, R. P. Gladue, R. P. Schleimer, y L. A. Beck. 2000. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol* 164:3392
- Luna, L. G. 1968. *The Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*", McGraw-Hill, 3^a edición.
- 60 Macphee, C. H., E. R. Appelbaum, K. Johanson, K. E. Moores, C. S. Imburgia, J. Fornwald, T. Berkhout, M. Brawner, P. H. Groot, K. O'Donnell, D. O'Shannessy, G. Scott, and J. R. White. 1998. Identification of a truncated form of the CC chemokine CK beta-8 demonstrating greatly enhanced biological activity. *J Immunol* 161:6273.
- Mantovani, A. 1999. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20:254.

- Murphy, P. M., Ozcelik, T., Kenney, R. T., Tiffany, H. L., McDermott, D., y Francke, U. 1992. A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *J. Biol. Chem.* 267, 7637-7643
- 5 Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim, y C. A. Power. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52:145.
- Patel, V. P., B. L. Kreider, Y. Li, H. Li, K. Leung, T. Salcedo, B. Nardelli, V. Pippalla, S. Gentz, R. Thotakura, D. Parmelee, R. Gentz, y G. Garotta. 1997. Molecular and functional characterization of two novel human C-C chemokines as inhibitors of two distinct classes of myeloid progenitors. *J Exp Med* 185:1163.
- 10 Romani et al., 1996, *J. Immunol. Methods* 196:137
- Rollins, B. J. 1997. Chemokines. *Blood* 90:909.
- Sambrook, J. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Scott, J.K., and G.P. Smith. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 249:386-90.
- 15 Shao Bo Su, Ji-liang Gao, Wang-hua Gong, Nancy M. Dunlop, Philip M. Murphy, Joost J. Oppenheim y Ji Ming Wang. 1999. T21/DP107, A Synthetic Leucine Zipper-Like Domain of the HIV-1 Envelope gp41, Attracts and Activates Human Phagocytes by Using G-Protein-Coupled Formyl Peptide Receptors. *Journal of Immunology*, 162: 5924-5930.
- Su, S. B., Gao, J.-L., Gong, W., Dunlop, N. M., Murphy, P. M., Oppenheim, J. J., y Wang, J. M. 1999. T21/DP107, A Synthetic Leucine Zipper-Like Domain of the HIV-1 Envelope gp41, Attracts and Activates Human Phagocytes by Using G-Protein-Coupled Formyl Peptide Receptors. *J. Immunol.* 162, 5924-5930.
- 20 Uguccioni, M., M. D'Apuzzo, M. Loetscher, B. Dewald, y M. Baggiolini. 1995. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol* 25:64.
- Ulmer et al., (1993) *Science* 259:1745-1749
- Verdijk et al., 1999, *J Immunol.* 1:57-61
- 25 Weber, C., K. U. Belge, P. von Hundelshausen, G. Draude, B. Steppich, M. Mack, M. Frankenberger, K. S. Weber, y H. W. Ziegler-Heitbrock. 2000. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* 67:699.
- Wells, J.A., M. Vasser, y D.B. Powers. 1985. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene*. 34:315-23.
- 30 Ye, R. D., Cavanagh, S. L., Quehenberger, O., Prossnitz, E. R., y Cochrane, C. G. 1992. Isolation of a cDNA that encodes a novel granulocyte N-formyl peptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 582-589:
- Youn, B. S., S. M. Zhang, H. E. Broxmeyer, S. Cooper, K. Antol, M. Fraser, Jr., y B. S. Kwon. 1998. Characterization of CKbeta8 and CKbeta8-1: two alternatively spliced forms of human beta-chemokine, chemoattractants for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and potent agonists at CC chemokine receptor 1. *Blood* 91:3118.
- 35 Zoller, M.J., y M. Smith. 1987. Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol.* 154:329-50.
- Zuckermann, R.N., E.J. Martin, D.C. Spellmeyer, G.B. Stauber, et al. 1994. Discovery of nanomolar ligands for 7-transmembrane G-protein-coupled receptors from a diverse N-(substituted)glycine peptoid library. *J Med Chem.* 37:2678-85.
- 40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína o polipéptido aislados que modulan la actividad del receptor FPRL1 que comprenden una secuencia en su extremo N, teniendo la secuencia una identidad de al menos 90% con el SEQ ID No. 1 a lo largo de toda su longitud, donde la proteína o el polipéptido no es uno de los SEQ ID Nos. 15 y 16.
2. La proteína o polipéptido aislados de la reivindicación 1, donde dicha secuencia N-terminal tiene una identidad de al menos 95% con el SEQ ID No. 1.
- 10 3. La proteína o polipéptido aislados de la reivindicación 1, donde la secuencia N-terminal tiene una identidad de secuencia del 100% con el SEQ ID No. 1.
- 15 4. La proteína o polipéptido aislados de la reivindicación 1, donde dicha secuencia N-terminal es el SEQ ID No. 1 o el SEQ ID No. 6.
5. Una proteína o polipéptido aislados que comprenden una secuencia que corresponde al SEQ ID NO. 3 en el extremo N terminal, donde el polipéptido no es uno de los SEQ ID No. 15 y 16.
- 20 6. Un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende la proteína o polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un portador farmacéuticamente aceptable, y una jeringa.
7. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína o polipéptido de la reivindicación 1.
- 25 8. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7 que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID No. 20.
9. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7, que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 95% con el SEQ ID No. 20.
- 30 10. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7, que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 99% con el SEQ ID No. 20.
11. Un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia complementaria al ácido nucleico de la reivindicación 10.
- 35 12. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 10, que comprende el SEQ ID No. 20 o el SEQ ID No. 25.
13. Una proteína de fusión que comprende la proteína o polipéptido de la reivindicación 1 fusionados a una proteína o polipéptido que no son la proteína o polipéptido del SEQ ID No. 1.
- 40 14. Un método de identificación de un modulador de la unión de una proteína o polipéptido que comprende una secuencia N-terminal, donde la secuencia N-terminal tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID No. 1, a un receptor FPRL1, que comprende:
 - 45 poner en contacto una célula que expresa un receptor FPRL1 con un compuesto candidato en presencia de una proteína o polipéptido marcados que comprenden una secuencia N-terminal, donde la secuencia N-terminal tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID No. 1; y
 - 50 comparar el nivel de unión de dicha proteína o polipéptido con el receptor FPRL1 en presencia del compuesto candidato con el nivel de unión de dicha proteína o polipéptido con el receptor FPRL1 en ausencia del compuesto candidato,
 - donde la disminución de la unión indica que el compuesto candidato es un inhibidor de la unión, y un incremento de la unión indica que el compuesto candidato es un potenciador de la unión.
15. El método de la reivindicación 14, donde el compuesto candidato es un anticuerpo, un péptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña.
- 55 16. El método de la reivindicación 14, donde la célula es un neutrófilo, un monocito, un linfocito T o una célula dendrítica.

60

Figura 1 Ligandos de FPRL1 Referidos

Ligandos	Flujo de Calcio (CE50)	Migración (CE50)	Unión (CE50)
<u>Ligandos Endógenos:</u> Lipoxina A4 Amiloide A del Suero β-Amiloide ₍₁₋₄₂₎ Péptido Priónico PrP ₍₁₀₆₋₁₂₆₎ LL-37 ¹ D2D3 ₍₈₈₋₂₇₄₎ ²	? >0,2 μM >2 μM >2 μM >5 μM ?	? >0,2 μM 10 μM 25-50 μM 5-10 μM 0,1 nM (sobre 293-FPRL1) ³	2-10 nM para H ³ -LPX 250 nM para I ¹²⁵ -SSA 83 nM para I ¹²⁵ -D2D3 ₍₈₈₋₂₇₄₎
<u>Codificados por Virus y Bacterias:</u> T21/DP107 (gp41 VIH) gp120 ₍₄₁₄₋₄₃₄₎ VIH Péptido de H. pylori, Hp ₍₂₋₂₀₎ ⁴ fMLP	>0,5 μM 5-10 μM 10 μM >5 μM	>0,5 μM 5-10 μM	
<u>Ligandos No Naturales:</u> WKYMVM/m WKYMVM MMK-1	0,1-1 nM 1-10 nM poco nM	0,1-1 nM 1-10 nM poco nM	10 nM para I ¹²⁵ -Péptido W >10 nM para I ¹²⁵ -Péptido W

Notas:

1. Péptido bacteriano derivado de catelicidina humana, LL-37.
2. Activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), D2D3(88-274).
3. En neutrófilos, ni uPA ni D2D3(88-274) inducen flujo de calcio.
4. Péptido de helicobacter pylori, Hp(2-20).

CKβ8 (1-99) RVTKDAETEFMMSKLPLENP VLLD.....RFHATSADCCISYTPRSIP
CKβ8 (25-99) RFHATSADCCISYTPRSIP
CKβ8-1 (1-116) RVTKDAETEFMMSKLPLENP VLLDMLWRRKIGPQMTLSHAAGFHATSADCCISYTPRSIP
CKβ8-1 (25-116) MLWRRKIGPQMTLSHAAGFHATSADCCISYTPRSIP
MIP1δ QFINDAETELMMSKLPLENP VVLN.....SFHF-AADCCTSYISQSIP
Leucotactina SFHF-AADCCTSYISQSIP
MIP1α SLAADTPTACCFSYTSRQIP

CKβ8 (1-99) CSLLESYFETNSECSKPGVI FLTKKRRFFCANPSDKQVQVCMRMLKLDTRIKTRKN
CKβ8 (25-99) CSLLESYFETNSECSKPGVI FLTKKRRFFCANPSDKQVQVCMRMLKLDTRIKTRKN
CKβ8-1 (1-116) CSLLESYFETNSECSKPGVI FLTKKRRFFCANPSDKQVQVCMRMLKLDTRIKTRKN
CKβ8-1 (25-116) CSLLESYFETNSECSKPGVI FLTKKRRFFCANPSDKQVQVCMRMLKLDTRIKTRKN
MIP1δ CSLMKSYPFETSECSKPGVI FLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKKLPYSI
Leucotactina CSLMKSYPFETSECSKPGVI FLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKKLPYSI
MIP1α QNF IADYFETSSQCSKPGVI FLTKRSRQVCA DPSEEWVQKYVSDLE

CKβ8(1-99) SEQ ID NO:13 MIP-1δ SEQ ID NO:17
CKβ8(25-99) SEQ ID NO:14 Leucotactina SEQ ID NO:18
CKβ8(1-116) SEQ ID NO:15 MIP-1α SEQ ID NO:19
CKβ8(25-116) SEQ ID NO:16

Figura 2.