

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 315**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2007 E 07798159 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 2038652**

54 Título: **Método para la detección de actividad IL-16 y modulación de actividad IL-16 en base a niveles RANTES proxy**

30 Prioridad:

**12.06.2006 US 804468 P**

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

**10.01.2014**

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)  
800/850 Ridgeview Drive  
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**GLASS, WILLIAM G.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 437 315 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

Método para la detección de actividad IL-16 y modulación de actividad IL-16 en base a niveles RANTES proxy

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de la actividad biológica de la IL-16 y la detección de la modulación de la actividad biológica de la IL-16. Además, la presente invención se dirige a un procedimiento de diagnóstico de la presencia de y / o la susceptibilidad a un trastorno relacionado a la IL-16.

10

**Antecedente de la Invención**

15

La interleucina – 16 (IL – 16; SEC ID N° 3), es una citocina proinflamatoria que induce la quimiotaxis positiva de los linfocitos T, monocitos, eosinófilos y las células dendríticas (67 J. Leukocyte Biol. 757 (2000)). Los monómeros de cadena peptídica de la IL – 16 están formados por la caspasa – 3 mediada por el procesamiento proteolítico de una molécula precursora de 14 kDa más grande (273 J. Biol. Chem. 1144 (1998)). Los monómeros de la IL – 16 forman complejos de cadena peptídica tetramérica. Se cree que estos complejos tetraméricos de la IL – 16 son la forma bioactiva de la IL – 16 (67 J. Leukocyte Biol. 757 (2000)). Las células eucariotas que producen la IL – 16 incluyen células que expresan CD4 o CD8, como las células T, mastocitos, eosinófilos, células dendríticas, células epiteliales, fibroblastos y células del cerebelo (67 J. Leukocyte Biol. 757 (2000)). Las células eucariotas receptoras a la expresión de la IL – 16 expresan las cadenas de peptídicas de CD4 y CD9 pero la respuesta a la IL – 16 puede ser independiente de estas cadenas peptídicas (véase, por ejemplo, 164 J. Immunol. 4429 (2000)).

20

25

Se ha informado que la IL – 16 desempeña un importante papel en enfermedades como el asma, la dermatitis atópica y la artritis reumatoide, entre otras (véase, por ejemplo, 162 Am. J. Respir. Crit. Care Med. 105 (2000); 109 J. Allergy Clin. Immunol. 681 (2002); 31 J. Rheumatol. 35 (2004)). Por ejemplo, se ha demostrado que la IL – 16 en pacientes humanos es responsable de atraer a las células que inducen asma en los pulmones y desempeña un importante papel en el desencadenamiento de las respuestas asmáticas en los pacientes. (162 Am. J. Respir. Crit. Care Med. 105 (2000)). Claramente, la capacidad para detectar e identificar moléculas que activan o inhiben la IL – 16 es crítica para el desarrollo de tratamientos eficaces para la enfermedades mediadas de la IL – 16.

30

35

El nivel de la IL – 16 se redujo en las células transfectadas con HIV – 1 si se compara con las células transfectadas sin virus que contienen una solución (113 Virus Research 26 (2005)). La patente US6936426 describe un procedimiento de diagnóstico de las enfermedades inflamatorias autoinmunes como las patologías de tejido conectivo asociado a la enfermedad de Graves.

Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos procedimientos para la detección de la actividad biológica de la IL – 16, activadores de la actividad biológica de la IL – 16 e inhibidores de la actividad biológica de la IL – 16.

40

**Breve Descripción de la Figuras**

45

La Figura 1 es una gráfica que muestra que la actividad biológica de la IL – 16 disminuye la secreción de la citocina RANTES por células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en relación a los controles.

50

La Figura 2 es una gráfica que muestra que la actividad biológica de la IL – 16 disminuye la secreción de la citocina RANTES por las células Hut – 78 en relación a los controles.

La Figura 3 es una gráfica que muestra que los inhibidores de la actividad biológica de la IL – 16 incrementa la secreción de la citocina RANTES por CMSP en relación a los controles.

**Resumen de la Invención**

55

Un aspecto de la presente invención es un procedimiento de detección de la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra que comprende las etapas para proporcionar una primera población de células eucariotas que rodean los medios y receptoras a la actividad biológica de la IL – 16 con una primera muestra de ensayo; proporcionar una segunda población de células eucariotas rodean los medios y receptoras a la actividad biológica de la IL – 16 con una muestra de control negativa; medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de células eucariotas por la que una cantidad más pequeña de un proxy de RANTES producido por la primera población de las células eucariotas relativa al nivel de proxy de RANTES producido por una segunda población de células eucariotas indica la detección de la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo. en la que el proxy de RANTES es una cadena peptídica con al menos el 75% de identidad con los residuos de aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4 o un ácido nucleico que codifica una cadena peptídica con al menos el 75% de identidad con los residuos de aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4.

60

65

- Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para detectar una molécula que incrementa la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra que comprende las etapas para proporcionar una primera población de células eucariotas que rodean los medios y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una primera muestra de ensayo; proporcionar una segunda población de células eucariotas que rodean los medios y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una muestra de control positiva que mantiene biológicamente activa a la IL – 16; medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de las células eucariotas y comparar la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de las células eucariotas mediante las cuales una cantidad menor de un proxy de RANTES producido por una primera población de células eucariotas en relación al nivel de proxy de RANTES producido por la segunda población de células eucariotas indica la presencia de una molécula que incrementa la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo, en la que el proxy de RANTES es una cadena peptídica con al menos el 75 % de identidad con los residuos de aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4 o un ácido nucleico que codifica una cadena peptídica con al menos el 75 % de identidad con los residuos de aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4.
- Un procedimiento para detectar una molécula que disminuya la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra que comprende las etapas para proporcionar una primera población de células eucariotas que rodean los medios y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una primera muestra de ensayo; proporcionar una segunda población de células eucariotas que rodean los medios y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una muestra de control positiva que mantiene biológicamente activa a la IL – 16; medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de las células eucariotas y comparar la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de las células eucariotas mediante las cuales una cantidad mayor de un proxy de RANTES producido por una primera población de células eucariotas en relación al nivel de proxy de RANTES producido por la segunda población de células eucariotas indica la presencia de una molécula que disminuye la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo, en la que el proxy de RANTES es una cadena peptídica con al menos el 75 % de identidad con los residuos de aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4 o un ácido nucleico que codifica una cadena peptídica con al menos el 75 % de identidad con los residuos de aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4.
- Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para diagnosticar la presencia de o la susceptibilidad a un trastorno relacionado con la IL – 16 en un sujeto que comprende las etapas para proporcionar una muestra a partir del sujeto de las células eucariotas; medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las muestras de las células eucariotas y comparar la cantidad de un proxy de RANTES producido por la muestra contra una referencia estándar; es decir, las células a partir de un sujeto que no tiene o es susceptible a un trastorno relacionado con la IL – 16 mediante las cuales una cantidad mayor de un proxy de RANTES producido por la muestra de sujeto en relación al nivel de proxy de RANTES producido en el estándar indica la presencia de o susceptibilidad de un trastorno relacionado con la IL – 16, en la que el proxy de RANTES es una cadena peptídica con al menos el 75 % de identidad con los residuos de aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4 o un ácido nucleico que codifica una cadena peptídica con al menos el 75% de identidad con los residuos de aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4.

#### **Descripción Detallada de la Invención**

- Tal como se utiliza en la presente y en las reivindicaciones, las formas singulares de “un / una”, “y” y “el / la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “una célula” es una referencia a una o más células e incluye equivalentes de los mismos conocidas por los expertos en la disciplina.
- Salvo que se determine lo contrario, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la disciplina a la que pertenece esta invención. Aunque las composiciones y los procedimientos similares o equivalentes a los descritos en la presente pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la invención, se describen en la presente composiciones y procedimientos ejemplares.
- El término “anticuerpo” se refiere a las moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpos que comprenden anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos murinos, humanos, humanizados, quiméricos y fragmentos, porciones o variantes de anticuerpos. Los anticuerpos se secretan por proteínas constitutivamente expresadas y secretadas por células plasmáticas. Se pueden producir también anticuerpos utilizando células plasmáticas inmortalizadas por procedimientos estándares como la generación de hibridoma o por transfección pesada de anticuerpos y / o genes de cadena ligera en una célula B inmortalizada como una célula de mieloma o cualquier otro tipo de células, como las células de ovario de hámster chino (COH), células vegetales y células de insectos.
- El término “actividad biológica” se refiere a la respuesta de un sistema biológico a una molécula. Dichos sistemas biológicos pueden ser, por ejemplo, una célula, un ácido nucleico replicable, como un virus o un plásmido,

- componentes aislados de una célula o ácidos nucleicos replicables o un sistema *in vitro* que incorpore uno o más de estos.
- 5 El término “CD4” se refiere a una cadena peptídica con al menos un 50 % de identidad en los residuos 1 a 433 de la SEC ID N° 1 y que es receptiva a la IL – 16. Puede determinarse la identidad entre dos cadenas peptídicas por alineamiento de secuencia de aminoácidos por pares utilizando la configuración predeterminada del módulo AlignX del Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). AlignX utiliza el algoritmo CLUSTALW para llevar a cabo los alineamientos de la secuencia de aminoácidos por pares. “CD4” es un acrónimo de “Cúmulo de diferenciación 4”.
- 10 El término “CD9” se refiere a una cadena peptídica con al menos un 90 % de identidad en los residuos 1 a 228 de la SEC ID N° 2 y que es receptiva a la IL – 16. “CD9” es un acrónimo de “Cúmulo de diferenciación 9”.
- El término “ célula eucariota” se refiere a una célula en la que el material genético se organiza en al menos un núcleo unido a la membrana.
- 15 El término “expresar” se refiere a la producción detectable de una cadena peptídica codificada por un ácido nucleico.
- El término “IL – 16” se refiere a una cadena peptídica con al menos un 80 % de identidad en los residuos de aminoácidos 1 a 121 de la SEC ID N° 3 que puede unirse al CD4 y descender la producción de un proxy de RANTES. “IL – 16” es un acrónimo de “Interleucina – 16”.
- 20 El término “trastorno relacionado a la IL – 16” se refiere a un trastorno inflamatorio inmune mediado o infeccioso como la tuberculosis, la neumonía, el virus respiratorio sincitial, el asma, la dermatitis atópica, la enfermedad de Crohn, la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide, trastornos relacionados del sistema nervioso central, como la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Graves, el virus de la hepatitis C, las paperas, el coxsakievirus, el echovirus, la gripe, la infección de E. Coli, la listeria, la meningitis, el virus de Epstein – Barr y enfermedades y trastornos con mecanismos relacionados y / o caracterizados por el incremento de la IL – 16 o el aumento de la actividad de la IL – 16.
- 25 El término “cadena peptídica” se refiere a una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico para formar una cadena. Las cadenas peptídicas grandes de más de 50 aminoácidos se pueden denominar “polipeptídicas” o “proteínas”. Las cadenas peptídicas pequeñas de menos de 50 aminoácidos se pueden denominar como “peptídicas”.
- 30 El término “ células Hut – 78” se refiere a las células con Número ATCC®: TIB – 161<sup>TM</sup> de la Colección Americana de Cultivos Tipo (CACT), Manassas, VA o células derivadas de estos.
- 35 El término “ células THP – 1” se refiere a las células con Número ATCC®: TIB – 202<sup>TM</sup> de la Colección Americana de Cultivos Tipo (CACT), Manassas, VA o células derivadas de estos.
- 40 El término “población” se refiere al menos a dos elementos como dos células.
- El término “proxy de RANTES”, también conocido como CCL5, se refiere a una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4, un ácido nucleico que codifica a una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4, una cadena peptídica expresada por activación de la región reguladora de un gen nativo que codifica la SEC ID N° 4, o un ácido nucleico transcrito por activación de la región reguladora del gen nativo que codifica la SEC ID N° 4. Puede utilizarse un proxy de RANTES como indicador de la activación génica RANTES. Puede determinarse la identidad entre dos cadenas por pares del módulo AlignX del Vector NTI v. 9.0.0 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). AlignX utiliza el algoritmo LUSTALW para llevar a cabo los alineamientos de secuencia de aminoácidos por pares.
- 45 “RANTES” es un acrónimo de “citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación”.
- 50 El término “receptivo” se refiere a la capacidad de producir una señal detectable en reacción a un estímulo.
- 55 Un aspecto que se describe en la presente, es un procedimiento para detectar en una muestra la actividad biológica de la IL – 16 (que puede indicar la presencia o susceptibilidad de un trastorno relacionado con la IL – 16), que comprende las etapas para proporcionar una primera población de células eucariotas que rodean los medios y receptoras a la actividad biológica de la IL – 16 con una primera muestra de ensayo; proporcionar una segunda población de células eucariotas que rodean los medios y receptoras a la actividad biológica de la IL – 16 con una muestra de control negativa; medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de células eucariotas y comparar la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de las células eucariotas por la que una cantidad más pequeña de un proxy de RANTES producido por la primera población de las células eucariotas relativa al nivel de proxy de RANTES producido por una segunda población de células eucariotas indica la detección de la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo.
- 60
- 65

La magnitud del cambio del proxy de RANTES que indica cambios en la actividad biológica en la IL – 16 es estadísticamente significativo, por ejemplo, al menos 1,5, por ejemplo, 2, 3, etc.

Las células eucariotas utilizadas en los procedimientos de la presente invención pueden ser adherentes o estar en suspensión. Estas células eucariotas pueden rodearse por medios aptos para el crecimiento celular o el mantenimiento que contiene suero o está libre de suero. Las células eucariotas en los procedimientos de la presente invención son receptivas a la IL – 16. Las células receptivas a la IL – 16 responden a los estímulos de la IL – 16 por quimiotaxis hacia una fuente de IL – 16, a la expresión IL -1b incrementada, a la IL – 6 incrementada, a la expresión IL- 15 incrementada o a la producción de RANTES disminuido y se pueden identificar en estas bases. Las células receptivas de la IL – 16 expresan CD4, CD9 o pueden identificarse ambas en esta base. Las muestras de ensayo y las muestras de control negativo pueden comprender un vehículo compatible con el mantenimiento de la actividad biológica IL – 16 en una muestra y es compatible con las células eucariotas utilizadas en los procedimientos de la presente invención. El tampón fosfato salino (TFS) es un ejemplo de vehículo, los expertos en la disciplina reconocerán otros. Idealmente, las muestras de control negativo son conocidas por no contener actividad biológica detectable de la IL – 16.

Puede medirse en diferentes formas la producción de un proxy de RANTES. Por ejemplo, donde el proxy de RANTES es una cadena péptidica, la producción puede medirse por ensayos de expresión proxy de RANTES que detectan específicamente las cadenas péptidicas de proxy de RANTES. Estos ensayos pueden incluir SDS-PAGE, transferencia Western, ELISA, ensayos enzimáticos específicos de proxy de RANTES como los ensayos de luciferasa o análisis de anticuerpos específicos de proxy de RANTES conjugados con microesferas. Estas cadenas péptidicas de proxy de RANTES pueden ser la cadena péptidica RANTES de la SEC ID N° 4 o una cadena péptidica codificada por una secuencia de ácido nucleico bajo control de la región regulatoria del gen nativo que codifica la SEC ID N° 4. La cadena péptidica codificada por una secuencia de ácido nucleico bajo control de la región regulatoria del gen nativo que codifica la SEC ID N° 4 puede ser un péptido fácilmente detectable como por ejemplo, proteína fluorescente verde o luciferasa. Los expertos en la disciplina reconocerán fácilmente otras cadenas péptidicas adecuadas para la utilización en los procedimientos de la presente invención. Alternativamente, cuando el proxy de RANTES es un ARN, puede medirse su producción por PCR con transcriptasa inversa (RT- PCR), transferencia Northern u otras técnicas muy conocidas por los expertos en la disciplina para la detección de transcritos de ARN específicos.

Una secuencia de ácido nucleico puede colocarse bajo el control de la región regulatoria del gen nativo que codifica la SEC ID N° 4 uniéndose operablemente a esta región reguladora de la secuencia de ácido nucleico. Tal unión operable puede crearse en el contexto de un ácido nucleico extracromosomal, como un plásmido que puede utilizarse como un constructo reportero extracromosomal que codifica una cadena péptidica o un ARN. Estos constructos extracromosomales pueden introducirse en el ADN cromosomal por eventos de recombinación aleatorios utilizando técnicas de transfección muy conocidas en la disciplina. Alternativamente, estas uniones operables pueden crearse en el contexto de un ácido nucleico cromosomal como el ADN cromosomal. El gen nativo que codifica la SEC ID N° 4 es un ejemplo de unión operable en el contexto de un ácido nucleico cromosomal. Sin embargo, los expertos en la disciplina reconocerán que pueden utilizarse técnicas de recombinación específica para unir operablemente un gen heterólogo a la región regulatoria de un gen nativo presente en el ADN cromosomal. La cadena péptidica resultante o el ARN codificado por tal ácido nucleico cromosomal puede entonces funcionar como un proxy de RANTES.

En una realización del procedimiento, las células eucariotas expresan una cadena péptidica CD4 o una cadena péptidica CD9. Las cadenas péptidicas CD4 o CD9 pueden expresarse constitutiva o indeciblemente y pueden codificarse por genes nativos o ácidos nucleicos heterólogos como los ADNc. Estos ADNc pueden, por ejemplo, codificar la cadena péptidica de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2.

En otra forma de realización del procedimiento, se seleccionan las células eucariotas del grupo de las células mononucleares de sangre periférica, de las células HuT – 78 y las células THP – 1. Estas células eucariotas pueden rodearse por medios adecuados para el crecimiento celular o el mantenimiento que contiene suero o está libre de suero.

En otra forma de realización del procedimiento que proporciona la primera muestra de ensayo produce una concentración final de IL – 16 en el medio que rodea la primera población de células eucariotas que oscila entre 100 ng / ml a 1000 ng / ml. Los procedimientos de ensayo descritos en la presente son capaces de detectar la actividad biológica de la IL – 16 presente en el medio que rodea las células eucariotas en una concentración que oscila entre al menos 100 ng/ ml a 1000 ng/ ml de IL – 16. Sin embargo, los procedimientos de la presente invención son también adecuados para detectar altas y bajas concentraciones finales de IL - 16 en muestras que se encuentran fuera de este rango.

En otra realización del procedimiento se secreta en el medio el proxy de RANTES. La cadena péptidica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 que es un ejemplo de un proxy de RANTES secretado en el medio. Estos proxies de RANTES pueden generarse por la expresión de una cadena péptidica de fusión que comprende una secuencia de señal secretora fusionada a la cadena péptidica de proxy de RANTES. Una de estas secuencias

de señal secretora es la secuencia de señal secretora de la Hormona del Crecimiento Humano (HCH), (SEC ID N° 5). Los expertos en la disciplina reconocerán otras secuencias de señal secretora apropiadas.

Otro aspecto descrito en la presente es un procedimiento de detección de una molécula que incrementa la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra que comprende las etapas para proporcionar una primera población de células eucariotas que rodean los medios y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una primera muestra de ensayo; proporcionar una segunda población de células eucariotas que rodean los medios y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una muestra de control positiva que mantiene biológicamente activa a la IL – 16; medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de las células eucariotas y mediante las cuales una cantidad menor de un proxy de RANTES producido por una primera población de células eucariotas en relación al nivel de proxy de RANTES producido por la segunda población de células eucariotas indica la presencia de una molécula que incrementa la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo. Este procedimiento puede utilizarse para detectar o identificar moléculas como los fármacos que activan la actividad biológica de la IL – 16 mediante cualquier mecanismo.

Las muestras de control positivo pueden comprender un vehículo compatible con las células eucariotas utilizadas en los procedimientos de la invención. El tampón fosfato salino (TFS) es un ejemplo de vehículo, los expertos en la disciplina reconocerán otros. Las muestras de control positivo son conocidas por contener actividad biológica detectable de la IL – 16.

En una realización del procedimiento, las células eucariotas expresan una cadena peptídica CD4 o una cadena peptídica CD9.

En otra realización del procedimiento, se seleccionan las células eucariotas del grupo de las células mononucleares de sangre periférica, de las células HuT – 78 y las células THP – 1.

En otra realización del procedimiento, la primera muestra de ensayo comprende una molécula de anticuerpo.

En otra realización del procedimiento, el proxy de RANTES se secreta al medio.

Otro aspecto descrito en la presente, es un procedimiento de detección de una molécula que disminuye la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra que comprende las etapas para proporcionar una primera población de células eucariotas que rodean los medios y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una primera muestra de ensayo; proporcionar una segunda población de células eucariotas que rodean los medios y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una muestra de control positiva que mantiene biológicamente activa a la IL – 16; medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de las células eucariotas y comparar la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de las células eucariotas mediante las cuales una cantidad mayor de un proxy de RANTES producido por una primera población de células eucariotas en relación al nivel de proxy de RANTES producido por la segunda población de células eucariotas indica la presencia de una molécula que disminuye la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo. Este procedimiento puede utilizarse para detectar o identificar moléculas como los fármacos que inhiben la actividad biológica de la IL – 16. Estas moléculas pueden inhibir la actividad biológica de la IL – 16 mediante cualquier mecanismo.

La presente invención describe además en referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son meramente ilustrativos de los aspectos de la presente invención y no pretenden limitar la misma.

### **Ejemplo 1**

#### **Método de Ensayo para Detectar la Actividad de la IL – 16 y la Modulación Positiva o Negativa de la Actividad de la IL – 16 basada en los Niveles de RANTES Disminuidos**

La presencia de actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo disminuye el nivel de la citocina quimiotáctica de RANTES secretado por las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) receptivas a la IL – 16 o a la líneas de células eucariotas en relación a las células de control negativo no expuestas en la muestra que mantiene activa biológicamente a la IL – 16 (Figuras 1 y 2). La detección de los niveles disminuidos de secreción de la citocina de RANTES por CMSP (Figura 1) o las células HuT – 78 eucariotas receptivas a la IL – 16 reciben una muestra de ensayo que contiene moléculas desconocidas que pueden utilizarse en ensayos para la presencia de la IL – 16 biológicamente activa en la muestra de ensayo. Este método de ensayo puede utilizarse para detectar la actividad biológica de la IL – 16 aumentada o disminuida en dos muestras de ensayo diferentes (Figuras 1 y 2). Se aíslan y se mantienen en suero libre de AIM - V® en medios de cultivo celular a las CMSP humanas (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) utilizando procedimientos estándares (véase por ejemplo 74 (4) Blood. 1348 (1989)). Las células linfoblastoides humanas HuT – 78 eucariotas inmortalizadas (ATCC®: TIB – 161™ de la Colección Americana de Cultivos Tipo (CACT), Manassas, VA) expresan CD4 (Cúmulo de diferenciación 4) y se mantiene la respuesta a la actividad de la IL – 16 utilizando técnicas de cultivo de células eucariotas estándares en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (D-MEM; Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) un medio de cultivo celular que contiene un 20 % de Suero Bovino Fetal (FBS; Invitrogen Inc., Carlsbad, CA).

- La actividad biológica de la IL - 16 se ensayó en muestras de ensayo utilizando CMSP (Figura 1) o células HuT – 78 (Figura 2). En primer lugar, 500.000 CMSP o células HuT – 78 se colocaron en pocillos de 96 placas de cultivo tisular que contiene medio de cultivo celular (AIM – V o D – MEM) adecuado para el mantenimiento de CMSP (Figura 1) o las células HuT – 78 (Figura 2). En segundo lugar, una muestra de ensayo de IL – 16 activa biológicamente recombinante de *Homo sapiens* (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) en un vehículo de tampón fosfato salino (TFS) se añadió a cada pocillo de cultivo tisular de tal manera que la concentración final de la IL – 16 activa biológicamente del medio que rodea las células fue de entre 100 ng/ ml y 1000 ng/ ml (Figura 1 y Figura 2). CMSP de control negativo o las células HuT – 78 de control negativo no tienen muestras de ensayo que contienen IL – 16 añadido a los pocillos de cultivo y en su lugar las muestras de control negativo que contienen sólo vehículos de TFS se añadieron al medio que rodea estas células (Figuras 1 y 2): En tercer lugar, las células que reciben las muestras de control que mantienen a la IL -16 activa biológicamente y las células de control negativo se incubaron luego por separado durante 6 horas a 37 °C en condiciones de cultivo de células eucariotas estándar. En cuarto lugar, los niveles de citocina de RANTES secretado en el medio que rodea las células que reciben a las muestras de ensayo o las células de control negativo se midieron utilizando ensayos específicos de Luminex® de RANTES según las indicaciones del fabricante. En quinto lugar, los niveles de citocina de RANTES secretado en el medio rodeado de células que recibieron la muestras de ensayo se compararon con los niveles de citocina de RANTES en el medio que rodea las células de control negativo. Los niveles disminuidos del RANTES secretado en el medio que rodea las células que reciben las muestras de ensayo en relación a las células de control negativo fue indicativo de una muestra de ensayo que mantiene a la IL – 16 activa biológicamente (Figuras 1 y 2). Por último, los niveles de citocina de RANTES secretado en el medio rodeado por células que reciben una primera muestra de ensayo que mantiene a la IL – 16 activa biológicamente se comparó con los niveles de citocina de RANTES en el medio que rodea las células que recibieron una segunda muestra de ensayo que mantienen cantidades diferentes de la IL – 16 activa biológicamente. La muestra de ensayo que contiene la mayor cantidad de la actividad biológica de la IL – 16 puede identificarse por esta comparación ya que esta muestra contiene el nivel más bajo de RANTES secretado en el medio que rodea las células (Figuras 1 y 2). La muestra de ensayo contiene la cantidad más baja de la actividad biológica de la IL – 16 que puede identificarse por esta comparación ya que esta muestra contienen el nivel más alto de RANTES secretado en el medio rodeado por células (Figuras 1 y 2).
- Estos resultados demuestran que la actividad de la IL – 16 en una muestra puede detectarse por un método de ensayo celular en el que el RANTES secretado por las células receptivas a la IL – 16 expuestas a una muestra de ensayo que mantienen a la IL – 16 activa biológicamente disminuye en relación a las células del control negativo que no recibieron la muestra de ensayo.
- Estos resultados también demostraron que el ensayo de la actividad biológica de la IL – 16 descrita anteriormente puede utilizarse para identificar a las muestras de ensayo que contienen actividad de la IL – 16 incrementada o disminuida. Por consiguiente, el ensayo descrito anteriormente es adecuado para la detección o identificación de moléculas que incrementan o disminuyen la actividad de la IL – 16 en una muestra. Estas moléculas pueden ser fármacos que incrementen la actividad de la IL – 16 o simplemente ser moléculas adicionales de la IL – 16 activa biológicamente que se han añadido a la muestra. Alternativamente, estas moléculas pueden ser fármacos que disminuyen la actividad de la IL – 16. Por consiguiente, el ensayo aquí descrito puede detectar la modulación positiva o negativa de la actividad de la IL – 16 en una muestra de ensayo y puede utilizarse para la detección o identificación de moléculas, como los fármacos, que modulan la actividad biológica de la IL – 16.
- Los asteriscos indican las diferencias significativas estadísticamente en relación a los controles negativos en una  $P < 0,05$  utilizando la Prueba T de Student (Figuras 1 y 2).

## Ejemplo 2

### Método de Ensayo para Detectar Moléculas que Modulan la Actividad de la IL – 16 Basado en los Niveles de RANTES Disminuidos

El método de ensayo descrito en el Ejemplo 1 anterior puede ser modificado para permitir la detección o la identificación de moléculas (por ejemplo, fármacos) en una muestra de ensayo que module la actividad de la IL – 16. Estas moléculas pueden ser, por ejemplo, inhibidores de la actividad de la IL – 16. Como se muestra en la Figura 3, la secreción de citocina de RANTES por CMSP que reciben en una muestra de ensayo que contienen un inhibidor de la actividad biológica de la IL – 16 se incrementa en relación a las células de control positivo que reciben una muestra de ensayo que contienen solo IL – 16. Por consiguiente, el método de ensayo modificado descrito en la presente puede utilizarse para detectar o identificar moléculas que modulan la actividad biológica de la IL – 16.

Se describen aquí los métodos de ensayo para detectar o identificar moléculas que modulan la actividad de la IL – 16. En primer lugar, 500.000 células de CMSP se colocan en pocillos de 96 placas de cultivo tisular que contiene medio de cultivo celular AIM – V. Las células CSMP se obtienen y se mantienen como se describe en el Ejemplo 1. En segundo lugar, una muestra de ensayo de IL – 16 activa biológicamente recombinante de *Homo sapiens* (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) en un vehículo de tampón fosfato salino (TFS) se añadió a cada pocillo de cultivo tisular.. Como se indica en la Figura 3, se añade IL – 16 de tal manera que la concentración final de la IL – 16 activa

biológicamente en el medio que rodea las células fue de 100 ng/ ml o 1000 ng/ ml. El anticuerpo de la IL- 16 antihumano fue un múrido, un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad biológica de la IL – 16. Las células de CMSP del control negativo no tienen añadida IL – 16 a los pocillos de cultivo y en su lugar las muestras de control negativo que contienen solo vehículos de TFS o mAb anti IL – 16 inhibitoria se añadieron a las concentraciones indicadas en la Figura 3 al medio que rodea estas células. Las células de CSMP del control positivo recibieron solo IL – 16 activa biológicamente de tal manera que la concentración final de la IL – 16 activa biológicamente en el medio que rodea las células fue de 100 ng/ ml o 1000 ng/ ml como se indica en la Figura 3. En tercer lugar, las células de CSMP que reciben las muestras de ensayo, las células de CSMP del control negativo y las células de CSMP del control positivo se incubaron después durante 6 horas a 37 °C en condiciones de cultivo de células eucariotas estándar. En cuarto lugar, los niveles de citocina RANTES secretado en el medio que rodea las células que reciben muestras de ensayo, células de control negativo, células de control positivo se midieron utilizando ensayos específicos de Luminex® de RANTES según las indicaciones del fabricante. En quinto lugar, los niveles de citocina de RANTES secretado en el medio que rodea las células que recibieron la muestras de ensayo que contienen la IL – 16 activa biológicamente y mAb anti IL – 16 inhibitoria se compararon con los niveles de citocina de RANTES en el medio que rodea las las células de control positivo que recibe solo de la IL -16 activa biológicamente. Los niveles incrementados de RANTES secretado en el medio que rodea las células que reciben muestras de ensayo en relación a las células de control positivo fue indicativo de una muestra de ensayo que contiene un inhibidor de la IL – 16 activa biológicamente (Figura 3).

Estos resultados demuestran que el ensayo de actividad biológica de la IL – 16 descritos anteriormente pueden utilizarse para detectar o identificar moléculas que modulan la actividad de la IL – 16 en una muestra de ensayo. Estas moléculas pueden ser fármacos que inhiben la actividad de la IL – 16 o alternativamente, fármacos que incrementan la actividad de la IL – 16.

Las barras de error representan la desviación estándar de los medios (Figura 3).



LISTA SECUENCIAL

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

<110> CENTOCOR, INC.

<120> MÉTODO PARA DETECTAR ACTIVIDAD DE LA IL - 16  
Y MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA IL - 16 BASADA EN NIVELES  
PROXY RANTES

<130> P052165EP

<140> EP07798159.5

<141> 2007-06-06

<150> 60/804468

<151> 2006-06-12

<160> 5

<170> FastSEC para la versión Windows 4.0

<210> 1

<211> 433

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

ES 2 437 315 T3

5  
 145                                    150                                    155                                    160  
 Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val  
 165                                    170                                    175  
 10 Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu  
 180                                    185                                    190  
 Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr  
 195                                    200                                    205  
 15 Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys  
 210                                    215                                    220  
 Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg  
 20 225                                    230                                    235                                    240  
 Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His  
 245                                    250                                    255  
 25 Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu  
 260                                    265                                    270  
 Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn  
 275                                    280                                    285  
 30 Leu Val Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu  
 290                                    295                                    300  
 Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu  
 35 305                                    310                                    315                                    320  
 Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu  
 325                                    330                                    335  
 Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln  
 340                                    345                                    350  
 40 Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro  
 355                                    360                                    365  
 Val Gln Pro Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu  
 370                                    375                                    380  
 45 Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg  
 385                                    390                                    395                                    400  
 50 Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu  
 405                                    410                                    415  
 Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro  
 420                                    425                                    430  
 55 Ile

60 <210> 2  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 65 <213> Homo sapiens

5  
 <400> 2

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

60 Arg Glu Met Val  
 225

65 <210> 3  
 <211> 121  
 <212> PRT

ES 2 437 315 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3

5

Ser Ala Ala Ser Ala Ser Ala Ala Ser Asp Val Ser Val Glu Ser Thr  
 1 5 10 15

10

Ala Glu Ala Thr Val Cys Thr Val Thr Leu Glu Lys Met Ser Ala Gly  
 20 25 30

15

Leu Gly Phe Ser Leu Glu Gly Gly Lys Gly Ser Leu His Gly Asp Lys  
 35 40 45

20

Pro Leu Thr Ile Asn Arg Ile Phe Lys Gly Ala Ala Ser Glu Gln Ser  
 50 55 60

25

Glu Thr Val Gln Pro Gly Asp Glu Ile Leu Gln Leu Gly Gly Thr Ala  
 65 70 75 80

30

Met Gln Gly Leu Thr Arg Phe Glu Ala Trp Asn Ile Ile Lys Ala Leu  
 85 90 95

35

Pro Asp Gly Pro Val Thr Ile Val Ile Arg Arg Lys Ser Leu Gln Ser  
 100 105 110

40

Lys Glu Thr Thr Ala Ala Gly Asp Ser  
 115 120

<210> 4

<211> 68

<212> PRT

45

<213> Homo sapiens

<400> 4

50

Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala  
 1 5 10 15

55

Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly  
 20 25 30

60

Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln  
 35 40 45

65

Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser  
 50 55 60

Leu Glu Met Ser

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

70

<213> Homo sapiens

ES 2 437 315 T3

<400> 5

5

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1

5

10

15

10

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala

20

25

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de detección de la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) proporcionar una primera población de células eucariotas que rodean el medio y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una primera muestra de ensayo;
- b) proporcionar una segunda población de células eucariotas que rodean el medio y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una muestra de control negativo;
- 10 c) medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de células eucariotas; y
- d) comparar la cantidad del proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de células eucariotas, en las que una cantidad más pequeña de proxy de RANTES producido por una primera población de células eucariotas en relación al nivel de proxy de RANTES producido por una segunda población de células eucariotas indica la detección de la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo,
- 15 en el que el proxy de RANTES es una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4 o un ácido nucleico que codifica una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las células eucariotas se seleccionan del grupo formado por las células mononucleares de sangre periférica, las células HuT – 78 y células THP – 1.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2 en el que se proporciona una primera muestra de ensayo que produce una concentración de IL – 16 final en el medio rodeado por una primera población de células eucariotas que oscila entre 100 ng/ ml y 1.000 ng/ ml.
- 25 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 en el que el proxy de RANTES se secreta al medio.
- 30 5. Un procedimiento de detección de una molécula que incrementa la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra que comprende las siguientes etapas:
- 35 a) proporcionar una primera población de células eucariotas que rodean el medio y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una primera muestra de ensayo;
- b) proporcionar una segunda población de células eucariotas que rodean el medio y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una muestra de control positivo que contiene IL – 16 activa biológicamente;
- 40 c) medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de células eucariotas; y
- d) comparar la cantidad del proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de células eucariotas, en las que una cantidad más pequeña de proxy de RANTES producido por una primera población de células eucariotas en relación al nivel de proxy de RANTES producido por una segunda población de células eucariotas indica la presencia de una molécula que incrementa la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo,
- 45 en el que el proxy de RANTES es una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4 o un ácido nucleico que codifica una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4.
- 50 6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que las células eucariotas se seleccionan del grupo formado por las células mononucleares de sangre periférica, las células HuT – 78 y células THP – 1.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 en el que una primera muestra de ensayo comprende una molécula de anticuerpos.
- 55 8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 o 7 en el que el proxy de RANTES se secreta al medio.
9. Un procedimiento para detectar una moléculas que disminuye la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra que comprende las siguientes etapas:
- 60 a) proporcionar una primera población de células eucariotas que rodean el medio y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una primera muestra de ensayo;
- b) proporcionar una segunda población de células eucariotas que rodean el medio y receptivas a la actividad biológica de la IL – 16 con una muestra de control positivo que contiene IL – 16 activa biológicamente;
- 65 c) medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de células eucariotas; y

- 5
- d) comparar la cantidad del proxy de RANTES producido por las primeras y segundas poblaciones de células eucariotas, en las que una cantidad más grande de proxy de RANTES producido por una primera población de células eucariotas en relación al nivel de proxy de RANTES producido por una segunda población de células eucariotas indica la presencia de una molécula que disminuye la actividad biológica de la IL – 16 en una muestra de ensayo,  
 en el que el proxy de RANTES es una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4 o un ácido nucleico que codifica una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4.
- 10
10. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que las células eucariotas se seleccionan del grupo formado por las células mononucleares de sangre periférica, las células HuT – 78 y células THP – 1.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 en el que una primera muestra de ensayo comprende una molécula de anticuerpos.
- 15
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 u 11 en el que el proxy de RANTES se secreta al medio.
- 20
13. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar la presencia o la susceptibilidad de un trastorno relacionado a la IL – 16 en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:
- 25
- a) proporcionar una muestra de células eucariotas rodeadas del sujeto;  
 b) medir la cantidad de un proxy de RANTES producido por la muestra de células eucariotas; y  
 c) comparar la cantidad del proxy de RANTES producido por una muestra contra una referencia estándar, en la que una cantidad menor de proxy de RANTES producido por una muestra de sujeto en relación al nivel de proxy de RANTES producido en la referencia estándar indica la presencia o susceptibilidad de un trastorno relacionado a la IL – 16,  
 en el que el proxy de RANTES es una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4 o un ácido nucleico que codifica una cadena peptídica con al menos un 75 % de identidad en los residuos de los aminoácidos 1 a 68 de la SEC ID N° 4.
- 30
14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que las células eucariotas son células mononucleares de sangre periférica.
- 35
15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 en el que la referencia estándar comprende células de un sujeto no susceptible a un trastorno relacionado a la IL – 16, células de un sujeto que no padece trastorno relacionado a la IL – 16 o células que no se **caracterizan por** el incremento de la IL – 16 o la actividad relacionada a la IL – 16.
- 40
16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y 13-15 en el que una cantidad menor del proxy de RANTES producido por una primera población en relación a la segunda población es de al menos una disminución de 1,5 veces.
- 45
17. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-12 en el que una cantidad mayor del proxy de RANTES producido por una primera población en relación a la segunda población es de al menos un incremento de 1,5 veces.
- 50
18. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las células eucariotas expresan una cadena peptídica CD4 o una cadena peptídica CD9.

50

55

60

65

Fig. 1

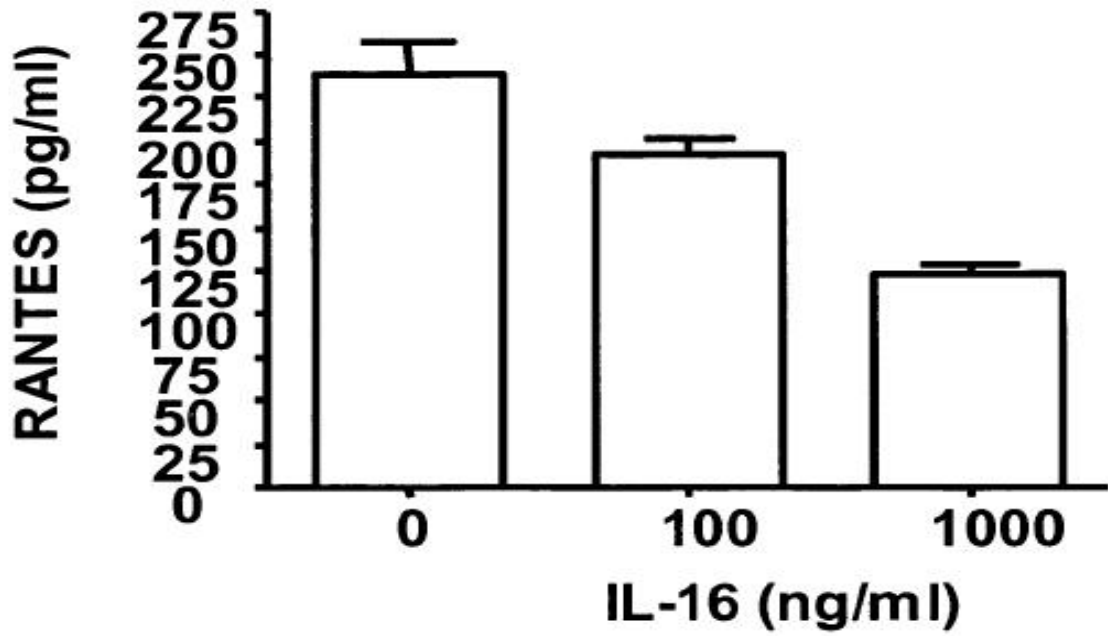


Fig. 2

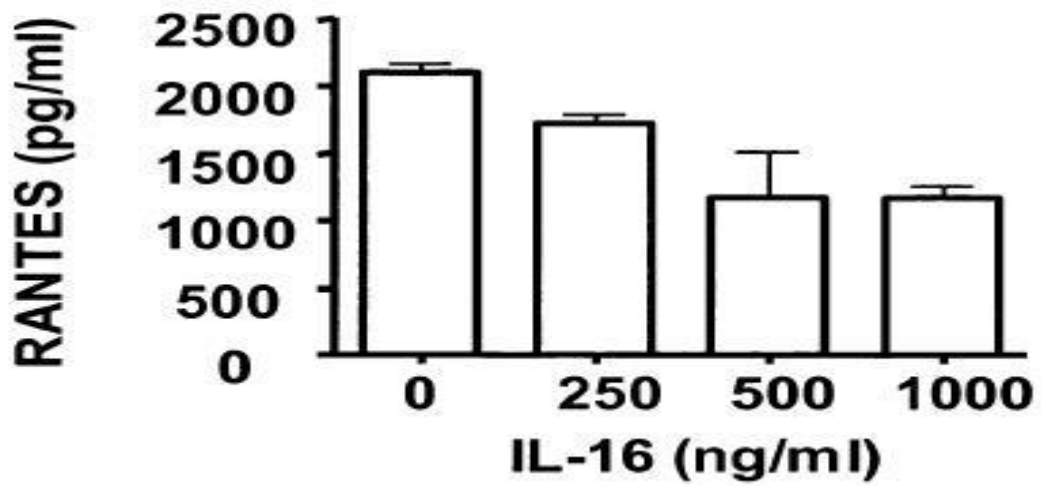




Fig. 3

