



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 073**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04018812 .0**

96 Fecha de presentación : **28.02.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1482042**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

54

Título: **Receptores activos e inactivos de quimiocinas CC y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos receptores.**

30

Prioridad: **01.03.1996 EP 96870021**
06.08.1996 EP 96870102

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.08.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.08.2009

73

Titular/es: **Euroscreen S.A.**
Route de Lennik 802
1070 Brussels, BE

72

Inventor/es: **Samson, Michel;**
Vassart, Gilbert;
Parmentier, Marc y
Libert, Frédérique

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 325 073 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

Receptores activos e inactivos de quimiocinas CC y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos receptores.

5 **Campo de la presente invención**

La presente invención se refiere a nuevos péptidos y las moléculas de ácido nucleico que codifican dichos péptidos, el vector que comprende dichas moléculas de ácido nucleico, las células transformadas por dicho vector, inhibidores dirigidos contra dichos péptidos o dichas moléculas de ácido nucleico, una composición farmacéutica y un dispositivo de diagnóstico y/o dosificación que comprende dichos productos, y animales transgénicos no humanos que expresan los péptidos según la invención o las moléculas de ácido nucleico que codifican dichos péptidos.

La invención se refiere a un método para determinar la unión de ligando, detectar la expresión, cribado para fármacos que se unen específicamente a dichos péptidos y tratamientos que implican los péptidos o moléculas de ácido nucleico según la invención.

La invención proporciona métodos para determinar si un ligando es un agonista o antagonista de dichos péptidos.

20 **Antecedentes tecnológicos y estado de la técnica**

Las citocinas quimiotácticas, o quimiocinas, son pequeñas proteínas de señalización que pueden dividirse en dos subfamilias (quimiocinas CC y CXC) dependiendo de la posición relativa de las dos primeras cisteínas conservadas. La interleucina 8 (IL-8) es la más estudiada de estas proteínas, pero ahora se han descrito un gran número de quimiocinas (regulada en la activación, expresada y secretada por linfocitos T normales (RANTES), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), proteína quimioatrayente de monocitos 2 (MCP-2), proteína quimioatrayente de monocitos 3 (MCP-3), producto génico α relacionado con el crecimiento (GRO α), producto génico β relacionado con el crecimiento (GRO β), producto génico γ relacionado con el crecimiento (GRO γ), proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α) y β , etc.) [4]. Las quimiocinas desempeñan papeles fundamentales en la fisiología de procesos inflamatorios agudos y crónicos así como en las desregulaciones patológicas de estos procesos, atrayendo y simulando subconjuntos específicos de leucocitos [32]. RANTES, por ejemplo, es un quimioatrayente para monocitos, células T de memoria y eosinófilos, e induce la liberación de histamina por basófilos. MCP-1, liberada por células del músculo liso en lesiones arterioscleróticas, se considera como el factor (o uno de los factores) responsable de la atracción de macrófagos y, por tanto, del empeoramiento progresivo de las lesiones [4].

Las quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES se han descrito recientemente como los principales factores supresores del VIH producidos por células T CD8⁺ [9]. Las quimiocinas CC también están implicadas en la regulación de la proliferación de células progenitoras mieloides humanas [6, 7].

Estudios recientes han demostrado que las acciones de las quimiocinas CC y CXC están mediadas por subfamilias de receptores acoplados a proteínas G. Hasta la fecha, a pesar de las numerosas funciones atribuidas a las quimiocinas y al número creciente de ligandos biológicamente activos, sólo se han identificado seis receptores funcionales en el ser humano. Se han descrito dos receptores para la interleucina-8 (IL-8) [20, 29]. Uno (IL-8RA) une IL-8 específicamente, mientras que el otro (IL-8RB) une IL-8 y otras quimiocinas CXC, como GRO. Entre los receptores que unen quimiocinas CC, un receptor, designado como receptor de quimiocinas CC 1 (CCR-1) une tanto RANTES como MIP-1 α [31] y el receptor de quimiocinas CC 2 (CCR2) une MCP-1 y MCP-3 [8, 44, 15]. Recientemente, se clonaron dos receptores adicionales de quimiocinas CC: se encontró que el receptor de quimiocinas CC 3 (CCR3) se activaba por RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β [10]; el receptor de quimiocinas CC 4 (CCR4) responde a MIP-1, RANTES, y MCP-1 [37]. Además de estos seis receptores funcionales, se han clonado varios receptores huérfanos de seres humanos y otras especies, que están estructuralmente relacionados con los receptores de quimiocinas CC o CXC. Éstos incluyen los receptores humanos BLR1 [13], EB11 [5], LCR1 [21], los de ratón MIP-1 RL1 y MIP-1 RL2 [17] y el bovino PPR1 [25]. Su(s) respectivo(s) ligando(s) y función(es) se desconocen actualmente.

50 **Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a un péptido que tiene al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 1 mostrada en la figura 1.

La presente invención también se refiere a un péptido como se menciona anteriormente, que tiene al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 90% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 1 mostrada en la figura 1.

La presente invención se refiere además al péptido mencionado anteriormente, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 o una parte de la misma.

La presente invención también se refiere al péptido mencionado anteriormente, que tiene al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 2 mostrada en la figura 1.

ES 2 325 073 T3

La presente invención se refiere además a un péptido como se menciona anteriormente, que tiene al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 90% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 2 mostrada en la figura 1.

5 La presente invención también se refiere al péptido mencionado anteriormente, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 o una parte de la misma.

La presente invención se refiere además al péptido mencionado anteriormente, que tiene al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 3 mostrada en la figura 1.

Además, la presente invención también se refiere a un péptido como se menciona anteriormente, que tiene al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 90% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 3 mostrada en la figura 1.

15 La presente invención también se refiere al péptido mencionado anteriormente, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 3 o una parte de la misma.

La presente invención se refiere además al péptido mencionado anteriormente, caracterizado en que es un receptor de quimiocina CC.

La presente invención también se refiere a un péptido mencionado anteriormente, caracterizado en que el receptor de quimiocina CC se estimula por la quimiocina MIP-1 β a una concentración menor o igual a 10 nM.

25 La presente invención se refiere además a un péptido mencionado anteriormente, caracterizado en que el receptor de quimiocina CC se estimula por las quimiocinas MIP-1 α o RANTES.

La presente invención se refiere además a un péptido mencionado anteriormente, caracterizado en que el receptor de quimiocina CC no se estimula por las quimiocinas MCP-1, MCP-2, MCP-3, IL-8 y GRO α .

30 La presente invención se refiere además a un péptido mencionado anteriormente, caracterizado en que es un receptor de virus VIH-1 y/o VIH-2 o una parte de dichos virus VIH.

La presente invención también se refiere a un péptido mencionado anteriormente, caracterizado en que es un receptor de quimiocina CC inactivo.

La presente invención también se refiere a un péptido mencionado anteriormente, caracterizado en que es un receptor inactivo, que no es un receptor de virus VIH-1 y/o VIH-2 o una parte de dichos virus.

40 La presente invención también se refiere a un péptido como se ha mencionado anteriormente, que es un receptor humano.

La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene más del 80%, preferiblemente más del 90% de homología con una de las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO.1, SEQ ID NO. 2 y SEQ ID NO. 3, mostradas en la figura 1.

La presente invención se refiere además a un ácido nucleico como se ha mencionado anteriormente, que tiene al menos la secuencia del ácido nucleico SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 ó SEQ ID NO. 3, mostradas en la figura 1 o una parte (tal como una sonda o un cebador) de las mismas.

50 La presente invención se refiere además a un ácido nucleico que codifica un péptido como se menciona anteriormente.

La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico como se menciona anteriormente, que es una molécula de ADNc o una molécula de ADN genómico.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico mencionada anteriormente.

60 La presente invención se refiere además a un vector como se menciona anteriormente, adaptado para la expresión en una célula, que comprende los elementos reguladores necesarios para la expresión de la molécula de ácido nucleico en dicha célula, operativamente unidos a la molécula de ácido nucleico como se menciona anteriormente para permitir la expresión de la misma.

65 La presente invención también se refiere a un vector como se menciona anteriormente, en donde la célula se elige entre el grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células de insecto o células de mamífero.

ES 2 325 073 T3

La presente invención se refiere además a un vector como se menciona anteriormente, en donde el vector es un plásmido o un virus.

5 La presente invención también se refiere al vector mencionado anteriormente que es un virus, elegido entre el grupo que consiste en baculovirus, adenovirus o virus del bosque de Semliki.

La presente invención además se refiere a un vector como se menciona anteriormente, que es el plásmido pcDNA3.

10 La presente invención también se refiere a una célula, preferiblemente una célula humana, que comprende el vector mencionado anteriormente.

15 La presente invención se refiere además a la célula mencionada anteriormente, caracterizada en que también está transformada por otro vector que codifica una proteína que aumenta la respuesta funcional en dicha célula, siendo preferiblemente dicha proteína la proteína $G\alpha 15$ o $G\alpha 16$.

La presente invención también se refiere a una célula como se menciona anteriormente, en donde la célula es una célula de mamífero, tal como un célula de origen no neuronal, que se elige preferiblemente entre el grupo que consiste en células CHO-K1, HEK293, BHK21, COS-7.

20 La presente invención se refiere además a una célula como se menciona anteriormente, que es la célula CHO-K1-pEFIN hCCR5-1/16.

25 La presente invención se refiere además a una sonda de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos capaz de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la molécula de ácido nucleico como se menciona anteriormente.

30 La presente invención se refiere además a un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia capaz de hibridar específicamente con una molécula de ácido nucleico como se menciona anteriormente, de modo que previene la traducción de dicha molécula de ácido nucleico.

La presente invención también se refiere a un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia capaz de hibridar específicamente con la molécula de ADN como se menciona anteriormente o una parte de la misma.

35 La presente invención se refiere además a un oligonucleótido antisentido como se menciona anteriormente, que comprende análogos químicos de nucleótidos.

40 La presente invención también se refiere a un ligando capaz de unirse al péptido como se menciona anteriormente siempre que no sea un "ligando natural" conocido de dicho péptido, que se elige preferiblemente entre el grupo que consiste en las quimiocinas CC MIP-1 β , MIP-1 α o RANTES, virus VIH o una parte de dichos virus VIH.

La presente invención también se refiere a un anti-ligando capaz de inhibir competitivamente la unión del "ligando natural" conocido al péptido como se menciona anteriormente.

45 La presente invención se refiere además a un ligando como se menciona anteriormente, que es un anticuerpo.

La presente invención también se refiere a un ligando como se menciona anteriormente, que es un anticuerpo.

50 La presente invención se refiere además a un anticuerpo como se menciona anteriormente, que es un anticuerpo monoclonal.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo monoclonal como se menciona anteriormente, dirigido a un epítipo del péptido como se menciona anteriormente, presente en la superficie de una célula que expresa dicho péptido.

55 La presente invención también se refiere a una célula que produce dicho anticuerpo monoclonal como se menciona anteriormente que es la célula AchCC5-SAB1A7.

60 La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una cantidad del oligonucleótido mencionado anteriormente, eficaz para disminuir la actividad del péptido como se menciona anteriormente pasando a través de una membrana celular y uniéndose específicamente con el ARNm que codifica dicho péptido en la célula de modo que se prevenga su traducción, y un soporte farmacéuticamente aceptable capaz de pasar a través de una membrana celular.

65 La presente invención se refiere además a la composición farmacéutica anteriormente mencionada, en donde el oligonucleótido está acoplado a una sustancia que inactiva el ARNm.

La presente invención también se refiere a la composición farmacéutica anteriormente mencionada, en donde la sustancia que inactiva el ARNm es una ribozima.

ES 2 325 073 T3

Además, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica anteriormente mencionada, en donde el soporte farmacéuticamente aceptable comprende una estructura que se une a un receptor en una célula capaz de ser captado por la célula después se unirse a la estructura.

5 La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anti-ligando como se menciona anteriormente, eficaz para bloquear la unión de un ligando al péptido anteriormente mencionado y un soporte farmacéuticamente aceptable.

10 La presente invención se refiere además a un mamífero transgénico no humano que expresa la molécula de ácido nucleico como se menciona anteriormente.

La presente invención también se refiere a un mamífero transgénico no humano que comprende una deficiencia por recombinación homóloga del péptido nativo como se menciona anteriormente.

15 Además, la invención se refiere a un mamífero transgénico no humano cuyo genoma comprende ácido nucleico antisentido complementario a la molécula de ácido nucleico como se menciona anteriormente colocado de tal manera que se transcribe en ARNm antisentido que es complementario a la molécula de ácido nucleico como se menciona anteriormente y que hibrida con dicha molécula de ácido nucleico reduciendo por lo tanto su traducción.

20 La invención también se refiere a un mamífero transgénico no humano como se menciona anteriormente, en donde el ácido nucleico anteriormente mencionado comprende además un promotor inducible.

Además, la invención se refiere a un mamífero transgénico no humano como se menciona anteriormente, en donde el ácido nucleico anteriormente mencionado comprende además elementos reguladores específicos de tejido.

25 La presente invención también se refiere a un mamífero transgénico no humano como se menciona anteriormente, que es un ratón.

30 La presente invención también se refiere a un método para determinar si un ligando se puede unir específicamente a un péptido como se ha mencionado anteriormente, que comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con el ligando en condiciones que permiten la unión del ligando a tal péptido y detectar la presencia de cualquier ligando unido específicamente a dicho péptido, determinando por lo tanto si el ligando se une específicamente a dicho péptido.

35 La presente invención también se refiere a un método para determinar si un ligando se puede unir específicamente a un péptido como se menciona anteriormente, que comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner en contacto el ligando con la fracción de membrana en condiciones que permiten la unión del ligando a tal péptido y detectar la presencia de cualquier ligando unido a dicho péptido, determinando por lo tanto si el compuesto es capaz de unirse específicamente a dicho péptido.

45 La presente invención proporciona un método para determinar si un ligando es un agonista del péptido como se menciona anteriormente, como se define en la reivindicación 1 que comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con el ligando en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del receptor de la célula y detectar por medio de un bioensayo, tal como una respuesta de segundo mensajero, un aumento en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un agonista del péptido.

50 La presente invención también proporciona un método para determinar si un ligando es un agonista del péptido como se menciona anteriormente, como se define en la reivindicación 2 que comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner en contacto la fracción de membrana con el ligando en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido y detectar por medio de un bioensayo, tal como una respuesta de segundo mensajero, un aumento en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un agonista del péptido.

60 La presente invención también proporciona un método para determinar si un ligando es un antagonista del péptido como se menciona anteriormente, como se define en la reivindicación 3 que comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con el ligando en presencia de un agonista conocido del péptido, en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido y detectar por medio de bioensayo, tal como una respuesta de segundo mensajero, un descenso en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un antagonista del péptido.

65 La presente invención proporciona además un método para determinar si un ligando es un antagonista del péptido como se menciona anteriormente, como se define en la reivindicación 4 que comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner en contacto la fracción de membrana con el ligando en presencia de un agonista conocido del péptido, en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido

ES 2 325 073 T3

y detectar por medio de un bioensayo, tal como una respuesta de segundo mensajero, un descenso en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un antagonista del péptido.

5 La presente invención proporciona un método como se menciona anteriormente, en donde el ensayo de segundo mensajero comprende medida de iones de calcio (Ca^{2+}), inositol fosfatos (tal como IP_3), diacilglicerol (DAG) o AMPc, como se define en las reivindicaciones 1-4.

10 La presente invención proporciona un método como se menciona anteriormente, en donde la célula es una célula de mamífero, preferiblemente de origen no neuronal, y elegida entre el grupo que consiste en células CHO-K1, HEK293, BHK21 y COS-7, como se define en la reivindicación 5.

La presente invención se refiere además a un método como se menciona anteriormente, en donde el ligando no es previamente conocido.

15 Además, la presente invención se refiere a un ligando detectado mediante el método mencionado anteriormente.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el ligando anteriormente mencionado y un soporte farmacéuticamente aceptable.

20 La presente invención se refiere a un método de cribado de fármacos para identificar fármacos que específicamente se unen al péptido como se menciona anteriormente en la superficie de la célula, que comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con una pluralidad de fármacos en condiciones que permiten la unión de dichos fármacos al péptido, y determinar aquellos fármacos que se unen específicamente a la célula transfectada, identificando por lo tanto fármacos que específicamente se unen al péptido.

30 La presente invención se refiere además a un método de cribado de fármacos para identificar fármacos que se unen específicamente al péptido como se menciona anteriormente en la superficie de la célula, que comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner en contacto la fracción de membrana con una pluralidad de fármacos y determinar esos fármacos que se unen a la célula transfectada, identificando por lo tanto fármacos que se unen específicamente a dicho péptido.

35 La presente invención se refiere además a un método de cribado de fármacos para identificar fármacos que actúan como agonistas del péptido mencionado anteriormente, que comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con una pluralidad de fármacos en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido, y determinar esos fármacos que activan tal péptido usando un bioensayo, tal como una respuesta de segundo mensajero, identificando por lo tanto fármacos que actúan como agonistas del péptido.

40 La presente invención se refiere además a un método de cribado de fármacos para identificar fármacos que actúan como agonistas del péptido mencionado anteriormente, que comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner en contacto la fracción de membrana con una pluralidad de fármacos en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido, y determinar esos fármacos que activan tal péptido usando un bioensayo, tal como una respuesta de segundo mensajero, identificando por lo tanto fármacos que actúan como agonistas del péptido.

45 Además, la presente invención se refiere a un método de cribado de fármacos para identificar fármacos que actúan como antagonistas del péptido mencionado anteriormente, que comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con una pluralidad de fármacos en presencia de un agonista conocido del péptido, en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido, y determinar esos fármacos que inhiben la activación del péptido usando un bioensayo, tal como una respuesta de segundo mensajero, identificando por lo tanto fármacos que actúan como antagonistas del péptido.

55 La presente invención también se refiere a un método de cribado de fármacos para identificar fármacos que actúan como antagonistas del péptido mencionado anteriormente, que comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner en contacto la fracción de membrana con una pluralidad de fármacos en presencia de un agonista conocido del péptido, en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido, y determinar esos fármacos que inhiben la activación del péptido usando un bioensayo, tal como una respuesta de segundo mensajero, identificando por lo tanto fármacos que actúan como antagonistas del péptido. La presente invención también se refiere a un método como se menciona anteriormente, en donde la respuesta funcional detectada por medio de un bioensayo se detecta y mide mediante un microfisiómetro.

65 Además, la presente invención se refiere a un fármaco detectado mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente.

ES 2 325 073 T3

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el fármaco mencionado anteriormente y un soporte farmacéuticamente aceptable.

5 La presente invención se refiere además a un método de detectar la expresión del péptido como se menciona anteriormente, detectando la presencia del ARNm que codifica dicho receptor, que comprende obtener el ARNm total de la célula y poner en contacto el ARNm así obtenido con la sonda de ácido nucleico como se menciona anteriormente en condiciones de hibridación y detectar la presencia del ARNm hibridado con la sonda, detectando por lo tanto la expresión del péptido por la célula.

10 La presente invención también se refiere a un método de detectar la presencia del péptido como se menciona anteriormente en la superficie de una célula, que comprende poner en contacto la célula con el anti-ligando como se menciona anteriormente en condiciones que permiten la unión del anticuerpo al péptido, y detectar la presencia del anticuerpo unido a la célula, detectando por lo tanto la presencia del péptido en la superficie de la célula.

15 La presente invención se refiere además a un método de determinar los efectos fisiológicos de expresar niveles variables del péptido mencionado anteriormente, que comprende producir un mamífero transgénico no humano como se menciona anteriormente cuyos niveles de expresión de péptido varían mediante el uso de un promotor inducible que regula la regulación del péptido.

20 Además, la presente invención se refiere a un método de determinar los efectos fisiológicos de expresar niveles variables del péptido como se menciona anteriormente, que comprende producir un panel de mamíferos transgénicos no humanos como se menciona anteriormente, expresando cada uno una cantidad diferente de dicho péptido.

25 La presente invención se refiere además a un método para identificar un antagonista del péptido como se menciona anteriormente capaz de aliviar una anomalía en un sujeto en donde la anomalía se alivia disminuyendo la actividad del péptido, que comprende administrar el antagonista a un mamífero transgénico no humano como se menciona anteriormente y determinar si el antagonista alivia las anomalías físicas y de comportamiento mostradas por el mamífero transgénico no humano como resultado de la actividad del péptido, identificando por lo tanto el antagonista.

30 La presente se refiere además a un antagonista identificado mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente.

35 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un antagonista como se menciona anteriormente y un soporte farmacéuticamente aceptable.

40 La presente invención se refiere además a un método para identificar un agonista del péptido como se menciona anteriormente capaz de aliviar una anomalía en un sujeto en donde la anomalía se alivia mediante la activación de dicho péptido, que comprende administrar el agonista a un mamífero transgénico no humano como se menciona anteriormente y determinar si el antagonista alivia las anomalías físicas y de comportamiento mostradas por el mamífero transgénico no humano, indicando el alivio de las anomalías la identificación del agonista. La presente invención se refiere además a un agonista identificado por el método anteriormente mencionado.

45 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el agonista anteriormente mencionado y un soporte farmacéuticamente aceptable.

50 La presente invención se refiere además a un método para diagnosticar una predisposición o una resistencia a un trastorno asociado con la actividad de un alelo específico del péptido como se ha mencionado anteriormente, y/o asociado con agentes infecciosos, preferiblemente los virus VIH-1 y/o VIH-2, presentes en un sujeto, que comprende:

- 55 a) obtener moléculas de ácido nucleico que codifican dicho péptido de las células del sujeto,
- b) realizar posiblemente una digestión de restricción de dichas moléculas de ácido nucleico con un panel de enzimas de restricción,
- 60 c) separar posiblemente electroforéticamente los fragmentos de ácido nucleico resultantes en un gel de tamaños,
- d) poner en contacto el gel resultante o las moléculas de ácido nucleico obtenidas marcadas con una sonda de ácido nucleico con un marcador detectable y capaz de hibridar específicamente con dicha molécula de ácido nucleico,
- 65 e) detectar las bandas marcadas o moléculas de ácido nucleico *in situ* que han hibridado con dicha molécula de ácido nucleico marcada con un marcador detectable para crear un patrón de bandas único o marcaje *in situ* específico del sujeto,
- f) preparar otras moléculas de ácido nucleico que codifican dicho péptido obtenidas de células de otros sujetos para el diagnóstico mediante los pasos a-e, y

ES 2 325 073 T3

- g) comparar el patrón de bandas único específico para la molécula de ácido nucleico de sujetos que padecen el trastorno del paso e y la molécula de ácido nucleico obtenida para diagnóstico del paso f para determinar si los patrones son iguales o diferentes y diagnosticar por lo tanto la predisposición o resistencia al trastorno si los patrones son iguales o diferentes.

5

La presente invención se refiere además a un método para diagnosticar una predisposición o una resistencia a un trastorno asociado con la actividad de un alelo específico del péptido como se menciona anteriormente o la presencia de dicho péptido en la superficie de células, y/o asociado con agentes infecciosos, preferiblemente los virus VIH-1 y/o VIH-2, presente en un sujeto, que comprende:

10

- a) obtener una muestra de un líquido corporal, preferiblemente una muestra de sangre que comprende células presentadoras de antígeno, de un sujeto,
- b) añadir a dicha muestra un ligando y/o un anti-ligando como se menciona anteriormente,
- c) detectar la reacción cruzada entre dicho ligando y/o dicho anti-ligando y el péptido específico, y
- d) determinar si el péptido corresponde a un receptor o un receptor inactivo y diagnosticar por lo tanto una predisposición o una resistencia al trastorno según el tipo del péptido presente en el líquido corporal del sujeto.

15

20

La presente invención se refiere además a un dispositivo de diagnóstico y/o dosificación que comprende el péptido, la molécula de ácido nucleico, la sonda de ácido nucleico, el ligando y anti-ligando como se menciona anteriormente, los "ligandos naturales" conocidos sus partes (tales como cebadores, sondas, epítomos,...) y/o una mezcla de los mismos, estando posiblemente marcados con un marcador detectable.

25

Además, la presente invención se refiere a un dispositivo de diagnóstico y/o dosificación como se menciona anteriormente, caracterizado en que comprende los reactivos para la detección y/o dosificación de antígenos, anticuerpos o secuencias de ácido nucleico mediante un método seleccionado del grupo que consiste en hibridación *in situ*, hibridación o reconocimiento por anticuerpos específicos marcados, especialmente ELISA[®] (enzimoinmunoanálisis de adsorción) o RIA[®] (radioinmunoensayo), métodos en filtro, sobre un soporte sólido, en solución, en "sándwich", en gel, mediante hibridación en mancha, mediante hibridación tipo Northern, mediante hibridación tipo Southern, mediante marcaje isotópico o no isotópico (tal como inmunofluorescencia o biotinylación), mediante una técnica de sondas frías, mediante amplificación genética, particularmente PCR, LCR, NASBA ó CPR, mediante una inmunodifusión doble, mediante contra-inmunolectroforesis, mediante hemaglutinación y/o una mezcla de las mismas.

30

35

La presente invención se refiere además a un método de preparar péptidos como se menciona anteriormente, que comprende:

40

- a) construir un vector adaptado para la expresión en una célula que comprende los elementos reguladores necesarios para la expresión de moléculas de ácido nucleico en la célula operativamente unidos a la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido de modo que se permita la expresión de la misma, en donde la célula se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células de insecto y células de mamífero,
- b) insertar el vector del paso a) en una célula huésped adecuada,
- c) incubar la célula del paso b) en condiciones que permitan la expresión del péptido según la invención,
- d) recuperar el péptido así obtenido, y posiblemente
- e) purificar el péptido así recuperado.

45

50

La presente invención también se refiere al uso de la composición farmacéutica como se menciona anteriormente, para la preparación de un medicamento en el tratamiento de una enfermedad elegida del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide, glomerulonefritis, asma, fibrosis pulmonar idiopática y psoriasis, infecciones víricas incluyendo infecciones por los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH-1 y 2), cáncer incluyendo leucemia, aterosclerosis y/o trastornos autoinmunes.

55

La presente invención se refiere a un péptido que tiene al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80%, ventajosamente más del 90%, preferiblemente más del 95% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 1.

60

Preferiblemente, dicho péptido también tiene al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80%, ventajosamente más del 90%, preferiblemente más del 95% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 2.

65

ES 2 325 073 T3

De forma alternativa, dicho péptido tiene al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80%, ventajosamente más del 90%, preferiblemente más del 95% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 3.

5 La presente invención también se refiere a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 o una parte de las mismas (representada en la fig. 1).

Una “parte de la secuencia de aminoácidos” significa uno o más segmentos de aminoácidos que tienen las mismas propiedades de unión o mejoradas del péptido completo según la invención. Dicha parte podría ser un epítipo que se une específicamente mediante un ligando del péptido, que podría ser un “ligando natural” conocido de dicho péptido, un agonista o un análogo de dicho ligando, o un inhibidor que pueda inhibir de manera competitiva la unión de dicho ligando al péptido (incluyendo los antagonistas de dicho ligando con respecto al péptido).

15 Ejemplos específicos de dichas partes de la secuencia de aminoácidos y sus procedimientos de preparación se describen en la publicación de Pucker J. *et al.* (Cell, Vol. 87, págs. 437-446 (1996)) incorporada aquí mediante referencia.

Dicha parte de la secuencia de aminoácidos del péptido según la invención comprende el segmento N-terminal y el primer bucle extracelular del péptido.

20 Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 1 es la secuencia de aminoácidos común de SEQ ID NO. 2 y de SEQ ID NO. 3 (ver también la figura 1). Por lo tanto, una primera aplicación industrial de dicha secuencia de aminoácidos es la identificación de la homología entre dicha secuencia de aminoácidos y el cribado de varios mutantes que codifican una secuencia de aminoácidos diferente que la descrita previamente, y la identificación de varios tipos de paciente que pueden presentar una predisposición o una resistencia a los trastornos descritos en la siguiente especificación.

Preferiblemente, el péptido o una parte del mismo, es un receptor de quimiocinas CC activo.

30 De forma ventajosa, el receptor de quimiocinas CC según la invención se estimula mediante la quimiocina MIP-1 β a una concentración inferior o igual a 10 nM y también se estimula ventajosamente mediante las quimiocinas MIP-1 α o RANTES. Sin embargo, dicho receptor de quimiocinas no se estimula por las quimiocinas MCP-1, MCP-2, MCP-3, IL-8 y GRO α .

Además, el péptido o una parte del mismo, es también un receptor de virus VIH o una parte de dichos virus VIH.

35 Se entiende por los “virus VIH”, VIH-1 o VIH-2 y todas las diversas cepas de virus VIH que están implicadas en el desarrollo de SIDA. Se entiende por “una parte de los virus VIH”, cualquier epítipo de dichos virus que sea capaz de interactuar específicamente con dicho receptor. Entre dichas partes de los virus que pueden estar implicadas en la interacción con el péptido según se define en la invención, están los péptidos codificados por los genes víricos ENV y GAG.

Preferiblemente, dicha parte de los virus VIH es el glicopéptido gp120/160 (gp 160 unido a la membrana o el gp libre derivado del mismo) o una parte del mismo.

45 Se entiende por “una parte del glicopéptido gp120/160” cualquier epítipo, preferiblemente un epítipo inmunodominante, de dicho glicopéptido que puede interactuar específicamente con el péptido según se define en la invención, tal como por ejemplo el bucle V3 (tercer dominio hipervariable).

50 Mediante un “receptor inactivo de quimiocina CC” se quiere decir un receptor que no se estimula por una quimiocina CC conocida, especialmente las quimiocinas MIP-1 β , MIP-1 α y RANTES.

El péptido representado en SEQ ID NO. 3 es un receptor inactivo que no es un receptor de virus VIH o de una parte de dichos virus VIH, lo que significa que dicho receptor inactivo no permite la entrada de dichos virus VIH en una célula que presenta en su superficie dicho receptor inactivo.

55

De forma ventajosa, dicho péptido es un receptor humano.

60 La presente invención se refiere también a la molécula de ácido nucleico que tiene más del 80%, preferiblemente más del 90% de homología con una de las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 y SEQ ID NO. 3 mostradas en la figura 1.

Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico tiene al menos la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 ó SEQ ID NO. 3 de la figura 1 o una parte de la misma.

65 Se entiende por “una parte de dicha molécula de ácido nucleico” cualquier secuencia del ácido nucleico de más de 15 nucleótidos que pudiera utilizarse con el fin de detectar y/o reconstituir dicha molécula de ácido nucleico o su hebra complementaria. Tal parte podría ser una sonda o un cebador que pudiera utilizarse en amplificación genética, utilizando las técnicas PCR, LCR, NASBA o CPR, por ejemplo.

ES 2 325 073 T3

La presente invención se refiere más específicamente a moléculas de ácido nucleico que codifican el péptido según la invención. Dichas moléculas de ácido nucleico son moléculas de ARN o ADN, tales como una molécula de ADNc o una molécula de ADN genómico.

5 La presente invención también se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la invención. Preferiblemente, dicho vector está adaptado para la expresión en una célula y comprende elementos reguladores necesarios para expresar la molécula de aminoácidos en dicha célula, unido operativamente a la secuencia del ácido nucleico según la invención, para permitir la expresión de la misma.

10 Preferiblemente, dicha célula se elige de entre el grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células de insecto o células de mamífero. El vector según la invención es un plásmido, preferiblemente un plásmido pcDNA3, o un virus, preferiblemente un baculovirus, un adenovirus o un virus del bosque Semliki.

15 La presente invención se refiere también a la célula, preferiblemente una célula de mamífero, tal como una célula CHO-K1 o HEK293, transformada mediante el vector según la invención. Ventajosamente, dicha célula no es de origen neuronal y se elige de entre el grupo que consiste en células CHO-K1, HEK293, BHK21, COS-7.

20 La presente invención también se refiere al uso de una célula (preferiblemente, una célula de mamífero tal como una célula CHO-K1) transformada por el vector según la invención y por otro vector que codifica una proteína que potencia la respuesta funcional en dicha célula. Ventajosamente, dicha proteína es la $G\alpha 15$ o $G\alpha 16$ (proteína G, subunidad α). Ventajosamente, dicha célula es la célula CHO-K1-pEFIN hCCR5-1/16.

25 La presente invención también se refiere a una sonda de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos capaz de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la secuencia de la molécula de ácido nucleico según la invención. Dicha sonda de ácido nucleico puede ser un ADN o un ARN.

30 La invención se refiere también a un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia que puede hibridar específicamente con una molécula de ARNm que codifica el péptido, según la invención, de modo que evita la traducción de dicha molécula de ARNm o un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia que puede hibridar específicamente con la molécula de ADNc que codifica el péptido según la invención.

35 Dicho oligonucleótido antisentido puede comprender análogos químicos de nucleótido o sustancias que inactiven el ARNm, o pueden incluirse en una molécula de ARN dotada de actividad ribozima.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un ligando o un anti-ligando (preferiblemente, un anticuerpo) distinto a los "ligandos naturales" conocidos, que se elige de entre el grupo que consiste en las quimiocinas MIP-1 β , MIP-1 α o RANTES, virus VIH o una parte de dichos virus VIH, en donde dicho ligando puede unirse al receptor según la invención y en donde dicho anti-ligando puede inhibir (preferiblemente, de manera competitiva) la unión de dicho "ligando natural" conocido o el ligando según la invención al péptido según la invención.

40 La exclusión en la definición identificada anteriormente de quimiocinas conocidas, virus VIH o una parte de dichos virus VIH, no incluye variantes de dichos virus "naturales" o dicha parte "natural" que pueden obtenerse, por ejemplo, mediante ingeniería genética y que pueden imitar la interacción de dichos virus y parte de dichos virus con el péptido según la invención.

Ventajosamente, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que se dirige preferiblemente a un epítipo del péptido según la invención y está presente sobre la superficie de una célula que expresa dicho péptido.

50 Preferiblemente, dicho anticuerpo se produce por la célula de hibridoma AchCCR5-SAB1A7.

55 La invención también se refiere a la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del péptido según la invención (para engañar al virus VIH del péptido natural presente en la superficie de una célula de mamífero y parar la infección de dicha célula de mamífero por el virus VIH), o una cantidad eficaz del ligando y/o anti-ligando descrito anteriormente identificado, o una cantidad eficaz del oligonucleótido según la invención, eficaz para disminuir la actividad de dicho péptido pasando a través de una membrana celular y uniéndose específicamente al ARNm que codifica el péptido según la invención en la célula de modo que se prevenga su traducción. La composición farmacéutica comprende también un soporte farmacéuticamente aceptable, preferiblemente capaz de pasar a través de dicha membrana celular.

60 Preferiblemente, en dicha composición farmacéutica, el oligonucleótido está acoplado a una sustancia, tal como una ribozima, que inactiva el ARNm que codifica el péptido según la invención.

65 Preferiblemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende una estructura que se une a un receptor en una célula que pueda fijarse por la célula tras la unión a la estructura. La estructura del vehículo farmacéuticamente aceptable en dicha composición farmacéutica puede unirse a un receptor que sea específico para un tipo de célula seleccionado.

ES 2 325 073 T3

La presente invención también se refiere a un mamífero transgénico no humano que sobreexpresa (o expresa ectópicamente) la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido según la invención.

5 La presente invención también se refiere a un mamífero transgénico no humano que contiene una deficiencia por recombinación homóloga del péptido nativo según la invención.

Según un aspecto preferido, la invención se refiere al mamífero transgénico no humano cuyo genoma comprende ácido nucleico antisentido complementario al ácido nucleico según la invención colocado de tal manera que se transcriba a ARNm antisentido que es complementario al ARNm que codifica el péptido según la invención y que hibrida 10 con el ARNm que codifica dicho péptido, reduciendo de esta manera su traducción. Preferiblemente, el mamífero transgénico no humano según la invención comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido según la invención y comprende además un promotor inducible o un elemento regulador específico de tejido.

15 Preferiblemente, el mamífero transgénico no humano es un ratón.

La invención se refiere a un método para determinar si un ligando se puede unir específicamente a un péptido según la invención, que comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con el ligando en condiciones que permiten la unión del ligando a tal péptido y detectar la presencia de cualquier ligando unido específicamente a dicho péptido, determinando por lo tanto 20 si el ligando se une específicamente a dicho péptido.

La invención se refiere a un método para determinar si un ligando se puede unir específicamente a un péptido según la invención, que comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner 25 en contacto el ligando con la fracción de membrana en condiciones que permiten la unión del ligando a tal péptido y detectar la presencia de un ligando unido a dicho péptido, determinando por lo tanto si el compuesto es capaz de unirse específicamente a dicho péptido. Preferiblemente dicho método se usa cuando el ligando no es previamente conocido.

La invención se refiere a un método para determinar si un ligando es un agonista del péptido según la invención, 30 que comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con el ligando en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido de la célula y detectar por medio de bioensayo, tal como una modificación en la concentración de un segundo mensajero (preferiblemente iones de calcio o inositol fosfatos tal como IP_3) o una modificación en el metabolismo celular (preferiblemente determinada por la tasa de acidificación del medio de cultivo), un aumento en la actividad del 35 péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un agonista del péptido.

Como se usa aquí el término agonista se refiere a un ligando que activa una respuesta intracelular cuando se une a un receptor.

40 La invención se refiere a un método para determinar si un ligando es un agonista del péptido según la invención, que comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana con el ligando en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido y detectar por medio de bioensayo, tal como una modificación en la producción de un segundo mensajero (preferiblemente inositol fosfatos tal como IP_3), un aumento en la actividad del 45 péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un antagonista del péptido según la invención, que comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con el ligando en presencia de un agonista conocido del péptido, en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido y detectar por medio de un bioensayo, tal como una modificación en la concentración de un segundo mensajero (preferiblemente iones de calcio o inositol fosfatos tal como IP_3) o una modificación en el 50 metabolismo celular (preferiblemente determinada por la tasa de acidificación del medio de cultivo), un descenso en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un antagonista del péptido.

55 Como se usa aquí, el término antagonista es un ligando que se une competitivamente a un receptor en los mismos sitios que un agonista, pero no activa una respuesta intracelular iniciada por un receptor.

La presente invención se refiere a un método para determinar si un ligando es un antagonista del péptido según la invención, que comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner en contacto la 60 fracción de membrana con el ligando en presencia de un agonista conocido del péptido, en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido y determinar por medio de un bioensayo, tal como una modificación en la producción de un segundo mensajero, un descenso en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un antagonista del péptido.

65 Preferiblemente, el ensayo del segundo mensajero que se va a utilizar según la invención comprende la medida de iones calcio o inositol fosfatos tal como IP_3 .

Preferiblemente, la célula utilizada en los métodos según la invención es una célula de mamífero de origen no neuronal, tal como células CHO-K1, HEK293, BHK21, COS-7.

ES 2 325 073 T3

En dicho método, el ligando no es previamente conocido.

La invención también se refiere al ligando aislado y detectado por cualquiera de los métodos precedentes.

5 La presente invención se refiere también a la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un agonista o antagonista del péptido según la invención, eficaz para reducir la actividad de dicho péptido y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Se entiende por “un agonista o un antagonista del péptido según la invención”, todos los agonistas o antagonistas del “ligando natural” conocido del péptido, según se describió anteriormente.

Por tanto, los métodos descritos previamente pueden utilizarse para el cribado de fármacos, para identificar fármacos que se unan específicamente al péptido según la invención.

15 La invención también se refiere a los fármacos aislados y detectados por cualquiera de estos métodos.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende dichos fármacos y un soporte farmacéuticamente aceptable.

20 La invención también se refiere a un método de detectar la expresión de un péptido según la invención detectando la presencia del ARNm que codifica un péptido, que comprende obtener ARN total o ARNm total de la célula y poner en contacto el ARN o ARNm así obtenido con la sonda de ácido nucleico según la invención en condiciones de hibridación y detectar la presencia de ARNm hibridado a la sonda, detectando por lo tanto la expresión del péptido por la célula.

25 Dichas condiciones de hibridación son condiciones rigurosas.

30 La presente invención también se refiere al uso de la composición farmacéutica según la invención para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide, glomerulonefritis, asma, fibrosis pulmonar idiopática y psoriasis, infecciones víricas, incluyendo virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH-1 y 2), cáncer incluyendo leucemia, aterosclerosis y/o trastornos autoinmunes.

35 La presente invención también se refiere a un método para diagnosticar una predisposición o una resistencia a un trastorno asociado con la actividad del péptido según la invención y/o asociado con agentes infecciosos tales como los virus VIH-1 y/o VIH-2 en un sujeto. Dicho método comprende:

- a) obtener moléculas de ácido nucleico que codifican dicho péptido según la invención de las células del sujeto;
- 40 b) realizar posiblemente una digestión de restricción de dichas moléculas de ácido nucleico con un panel de enzimas de restricción;
- c) separar posiblemente electroforéticamente los fragmentos de ácido nucleico resultantes en un gel de tamaños;
- 45 d) poner en contacto el gel resultante o la molécula de ácido nucleico obtenida con una sonda de ácido nucleico marcada con un marcador detectable y capaz de hibridar específicamente con dicha molécula de ácido nucleico (estando hecha dicha hibridación en condiciones de hibridación rigurosas);
- 50 e) detectar las bandas marcadas o las moléculas de ácido nucleico *in situ* que han hibridado con dicha molécula de ácido nucleico marcada con un marcador detectable para crear un patrón de bandas único o un marcaje *in situ* específico del sujeto;
- 55 f) preparar otras moléculas de ácido nucleico que codifican el péptido según la invención obtenidas de las células de otros pacientes para el diagnóstico mediante los pasos a-e; y
- 60 g) comparar el patrón de bandas único específico para la molécula de ácido nucleico de sujetos que padecen el trastorno del paso e y la molécula de ácido nucleico obtenida para diagnóstico del paso f para determinar si los patrones son iguales o diferentes y diagnosticar de esta manera una predisposición o una resistencia al trastorno si los patrones son iguales o diferentes.

La presente invención también se refiere a un método para diagnosticar una predisposición o una resistencia a un trastorno asociado con la actividad de un alelo específico del péptido según la invención o la presencia de dicho péptido en la superficie de células y/o asociado con agentes infecciosos tales como virus VIH presente en un sujeto. Dicho método comprende:

- a) obtener una muestra de un líquido corporal, preferiblemente una muestra de sangre que comprende células presentadoras de antígeno, de un sujeto;

ES 2 325 073 T3

- b) añadir a dicha muestra un ligando y/o un anti-ligando según la invención;
- c) detectar la reacción cruzada entre dicho ligando y/o dicho anti-ligando y el péptido específico según la invención; y
- d) determinar si el péptido corresponde a un receptor o un receptor inactivo según la invención y diagnosticar de esta manera una predisposición o una resistencia al trastorno según el tipo del péptido presente en el líquido corporal del sujeto.

5

10 La presente invención también se refiere a un dispositivo de diagnóstico y/o dosificación, preferiblemente un kit, que comprende los péptidos, las moléculas de ácido nucleico, las sondas de ácido nucleico, los ligandos y/o los anti-ligandos según la invención, sus partes (tales como cebadores, sondas, epítomos,...) o una mezcla de los mismos, estando posiblemente marcados con un marcador detectable.

15 Dicho dispositivo de diagnóstico y/o dosificación también comprende los reactivos para la detección y/o dosificación de antígenos, anticuerpos o secuencias de ácido nucleico mediante un método seleccionado del grupo que consiste en hibridación *in situ*, hibridación o reconocimiento por anticuerpos específicos marcados, especialmente ELISA® (enzimoinmunoanálisis de adsorción) o RIA® (radioinmunoensayo), métodos en filtro, sobre un soporte sólido, en solución, en “sándwich”, en gel, mediante hibridación en mancha, mediante hibridación tipo Northern, mediante hibridación tipo Southern, mediante marcaje isotópico o no isotópico (tal como inmunofluorescencia o biotilación), mediante una técnica de sondas frías, mediante amplificación genética, particularmente PCR, LCR, NASBA ó CPR, mediante una inmunodifusión doble, mediante contra-inmuno-electroforesis, mediante hemaglutinación y/o una mezcla de las mismas.

25 Un último aspecto de la presente invención se refiere a un método de preparar péptidos según la invención, que comprende:

- a) construir un vector adaptado para la expresión en una célula que comprende los elementos reguladores necesarios para la expresión de moléculas de ácido nucleico en la célula operativamente unidos a la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido de modo que se permita la expresión de la misma, en donde la célula se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células de insecto y células de mamífero;
- b) insertar el vector del paso a en una célula huésped adecuada;
- c) incubar la célula del paso b en condiciones que permitan la expresión del péptido según la invención;
- d) recuperar el péptido así obtenido; y
- e) purificar el péptido así recuperado, preparando de esta manera un péptido aislado según la invención.

30

35

40

Los depósitos de microorganismos AchCCR5-SAB1A7 y CHO-K1-pEFIN hCCR5-1/16 se realizaron según el Tratado de Budapest en la Colección Coordinada Belga de Microorganismos (BCCM), Laboratorium voor Moleculaire Biologie (LMBP), Universiteit Gent, K. L. Ledeganckstraat 35, 3-9000 GANTE, BÉLGICA.

45

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la estructura primaria de los péptidos según la invención.

50 La figura 2 representa la secuencia de aminoácidos del receptor de quimiocinas CCR5 humano, activo según la invención, alineada con la de los receptores CCR1, CCR2b, CCR3 y CCR4 humanos. Se recuadran los aminoácidos idénticos a los de la secuencia de CCR5 activo.

55 La figura 3 muestra la organización cromosómica de los genes de los receptores de quimiocinas CCR2 y CCR5 humanos.

La figura 4 muestra la expresión funcional del receptor CCR5 humano activo en una línea celular CHO-K1.

60 La figura 5 representa la distribución del ARNm que codifica el receptor CCR5 en un panel de líneas celulares humanas de origen hematopoyético.

La figura 6 representa la estructura de la forma mutante del receptor CCR5 humano.

65 La figura 7 representa la cuantificación de la fusión mediada por proteínas ENV mediante ensayos de luciferasa.

La figura 8 representa la obtención del genotipo de individuos mediante PCR y la segregación de los alelos CCR5 en familias del CEPH (Centro de Estudios del Polimorfismo Humano, en París).

La figura 9 representa el análisis por FACS de los sueros anti-CCR5 en una línea celular CCR5-CHO según la invención.

La figura 10 representa la inhibición de la infectividad de VIH con anticuerpos anti-CCR5.

5

Descripción detallada de la invención

1. Experimentos

10 *Materiales*

Se obtuvieron quimiocinas humanas recombinantes, incluyendo MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-8 y GRO α de R & D Systems (Londres, RU). Se obtuvo [¹²⁵I]MIP-1 α (actividad específica, 2200 Ci/mmol) de Dupont NEN (Bruselas, Bélgica). El proveedor notificó que las quimiocinas obtenidas de R & D Systems eran > 97% puras en SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida) y biológicamente activas en un bioensayo específico para cada ligando. Las quimiocinas liofilizadas se disolvieron como una disolución 100 μ g/ml en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y esta disolución madre se almacenó a -20°C en alícuotas. Las quimiocinas se diluyeron a la concentración de trabajo inmediatamente antes de su uso. Todas las líneas celulares utilizadas en el presente estudio se obtuvieron de la ATCC (Rockville, MD, EE.UU.).

20

Clonación y secuenciación

Se obtuvo el clon MOP020 de ratón mediante reacción en cadena de la polimerasa con condiciones poco rigurosas, según se describió previamente [24, 34], utilizando ADN genómico como molde. Se cribó una genoteca de ADN genómico humano (Stratagene, La Jolla, CA) construida en el vector lambda DASH, con condiciones poco rigurosas [39], con la sonda MOP020 (511 pb). Los clones positivos se purificaron hasta homogeneidad y se analizaron mediante transferencia de tipo Southern. Se determinó el mapa de restricción del locus y se subclonó un fragmento XbaI pertinente de 4.400 pb en pBlueScript SK+ (Stratagene). La secuenciación se realizó en ambas hebras tras la subclonación en derivados M13mp, utilizando cebadores fluorescentes y un secuenciador automático de ADN (Applied Biosystem 370A). El manejo de la secuencia y análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software DNASIS/PROSIS (Hitachi) y el paquete de software GCG (Genetics Computer Group, Wisconsin).

30

Expresión en líneas celulares

Se amplificó la región codificante completa mediante PCR como un fragmento de 1056 pb, utilizando cebadores que incluyen, respectivamente, las secuencias de reconocimiento *Bam*HI y *Xba*I y se clonaron tras restricción en los sitios correspondientes del vector de expresión eucariota pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA). La construcción resultante se verificó mediante secuenciación y se transfectó en células CHO-K1, como se describe [35]. Dos días después de la transfección, se inició la selección para líneas celulares transfectadas de manera estable mediante la adición de G418 400 μ g/ml (Gibco) y se aislaron los clones resistentes en el día 10. Las células CHO-K1 se cultivaron utilizando medio F12 de Ham, como se ha descrito previamente [35, 11]. La expresión del receptor CCR5 activo en los diversos clones celulares se evaluó midiendo el nivel específico de transcrito mediante transferencia de tipo Northern, en el ARN total preparado a partir de las células (véase más adelante).

40

45 *Ensayos de unión*

Se hicieron crecer células CHO-K1 transfectadas de manera estable, que expresaban el receptor CCR5, hasta confluencia y se separaron de las placas de cultivo mediante incubación en solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con EDTA 1 mM. Se recogieron las células mediante centrifugación a baja velocidad y se contaron en una cámara de Neubauer. Los ensayos de unión se realizaron en tubos Minisorp (Nunc) de polietileno, en un volumen final de 200 μ l de PBS que contenía seroalbúmina bovina (BSA) al 0,2% y 10⁶ células, en presencia de [¹²⁵I]-MIP-1 α . Se determinó la unión no específica mediante la adición de MIP-1 α no marcada 10 nM. La concentración del ligando marcado fue de 0,4 nM (aproximadamente 100.000 cpm por tubo). La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 4°C y se detuvo mediante la adición rápida de 4 ml de tampón enfriado en hielo y la inmediata recogida de las células mediante filtración a vacío a través de filtros de fibra de vidrio GF/B (Whatmann) empapados previamente con polietilénimina al 0,5% (Sigma). Los filtros se lavaron tres veces con 4 ml de tampón enfriado en hielo y se contaron en un contador gamma.

55

Actividad biológica

Las líneas celulares CHO-K1 transfectadas de manera estable con la construcción pcDNA3/CCR5 o las células CHO-K1 de tipo natural ("wild type", WT) (utilizadas como controles) se sembraron sobre la membrana de cápsulas celulares Transwell (Molecular Devices), a una densidad de 2,5 10⁵ células/pocillo en medio F12 de Ham. Al día siguiente, las cápsulas se transfirieron a un microfisiómetro (Cytosensor, Molecular Devices) y se dejó que las células se equilibraran durante aproximadamente dos horas mediante perfusión de medio RPMI-1640 tamponado con fosfato 1 mM (pH 7,4) que contenía BSA al 0,2%. Las células se expusieron entonces a diversas quimiocinas diluidas en el mismo medio, con una duración de 2 minutos. Se midieron las tasas de acidificación a intervalos de un minuto.

60

65

Transferencia de tipo Northern

Se aisló ARN total de líneas celulares CHO-K1 transfectadas, de un panel de líneas celulares humanas de origen hematopoyético y de un panel de tejidos de perro, utilizando el kit RNeasy (Qiagen). Las muestras de ARN (10 μ g por carril) se desnaturalizaron en presencia de glioxal [26], se fraccionaron en un gel de agarosa al 1% en un tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) y se transfirieron a membranas de nylon (Pall Biodyne A, Glen Cove, NY) según se ha descrito [42]. Tras secar en estufa, las membranas se prehibridaron durante 4 h a 42°C en una disolución que consistía en formamida al 50%, disolución Denhardt 5x (Denhardt 1x: Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, BSA al 0,02%), SSPE 5x (SSPE 1x: NaCl 0,18 M, fosfato de Na 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,3), dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,3%, 250 μ g por ml de ADN desnaturalizado de testículo de arenque. Las sondas de ADN se marcaron con (α -³²P) mediante unión aleatoria [14]. Las hibridaciones se llevaron a cabo durante 12 h a 42°C en la misma disolución, que contenía sulfato de dextrano al 10% (peso/volumen) y la sonda desnaturalizada con calor. Los filtros se lavaron con SSC 1x (SSC 1x: NaCl 150 mM, citrato de Na 15 mM, pH 7,0), SDS al 0,1% a 60°C y se sometieron a autorradiografía a -70°C, utilizando películas β -max de Amersham.

2. Resultados y discusión

Clonación y análisis estructural

La homología de secuencia que caracteriza a los genes que codifican los receptores acoplados a proteínas G ha permitido la clonación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con condiciones poco rigurosas, de nuevos miembros de esta familia de genes [24, 34]. Uno de los clones amplificado a partir de ADN genómico de ratón, denominado MOP020, presentaba fuertes similitudes con receptores de quimiocinas caracterizados, compartiendo el 80% de identidad con el receptor de MCP-1 (CCR2) [8], el 65% de identidad con el receptor de MIP-1 α /RANTES (CCR1) [31], y el 51% de identidad con los receptores de IL-8 [20, 30]. El clon se utilizó como una sonda para cribar una genoteca genómica humana. Se aislaron un total de 16 clones de fago lambda. Se dedujo a partir del patrón de restricción de cada clon y a partir de los datos de secuencia parcial que todos los clones pertenecían a una única secuencia contigua (“cóntigo”), en la que se incluyeron dos secuencias codificantes diferentes. Una de las secuencias codificantes era idéntica al ADNc descrito que codifica el receptor CCR2 [8, 44]. Se subclonó un fragmento *Xba*I de 4.400 pb de un clon representativo que contenía la segunda región de hibridación en pBluescript SK+. La secuenciación reveló un gen novedoso, provisionalmente denominado CCR5, que compartía el 84% de identidad con la sonda MOP020, lo que sugiere que MOP020 es el ortólogo de ratón de CCR5. MOP020 no corresponde a ninguno de los tres genes del receptor de quimiocinas de ratón clonados recientemente [16], lo que demuestra la existencia de un cuarto receptor de quimiocinas murino.

La secuencia de CCR5 reveló un único marco abierto de lectura de 352 codones que codifican una proteína de 40.600 Da. La secuencia que rodea el codón de iniciación propuesto está de acuerdo con el consenso descrito por Kozak [22], puesto que el nucleótido -3 es una purina. El perfil de hidropatía de la secuencia de aminoácidos deducida concuerda con la existencia de 7 segmentos transmembrana. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CCR5 con la de otros receptores de quimiocinas CC humanos, caracterizados funcionalmente, se representa en la figura 2. Se encontró la mayor similitud con el receptor CCR2 [8] que comparte un 75,8% de residuos idénticos. Existe también un 56,3% de identidad con el receptor CCR1 [31], un 58,4% con el CCR3 [10] y un 49,1% con el CCR4 [37]. Por tanto, CCR5 representa un nuevo miembro del grupo de receptores de quimiocinas CC [30]. Como los receptores relacionados CCR1 y de IL-8 [20, 29, 31, 16], la región codificante de CCR5 aparece sin intrones. A partir de los datos de secuenciación parcial, el gen CCR2 también carece de intrón en los primeros dos tercios de su secuencia codificante.

Las similitudes de secuencia dentro de la familia de receptores de quimiocinas son mayores en los dominios que atraviesan la transmembrana y en bucles intracelulares. Como ejemplo, la puntuación de identidad entre CCR5 y CCR2 sube hasta el 92% cuando se consideran sólo los segmentos transmembrana. Se encuentran similitudes menores en el dominio extracelular N-terminal y en los bucles extracelulares. El dominio N-terminal de los receptores de IL-8 y CCR2 ha demostrado ser esencial para la interacción con el ligando [19, 18]. La variabilidad de esta región entre los receptores de quimiocinas CC se supone que contribuye a la especificidad hacia los diversos ligandos de la familia.

Se identificó un único sitio potencial para la glicosilación de unión a N en el tercer bucle extracelular de CCR5 (figura 1). No se encontró ningún sitio de glicosilación en el dominio N-terminal del receptor, en el que se glicosilan la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G. Los otros receptores de quimiocinas CCR1 y CCR2 presentan tal sitio de glicosilación de unión a N en su dominio N-terminal [31, 8]. Por el contrario, el receptor CCR3 [10] no muestra sitios de glicosilación ni en el extremo N-terminal ni en bucles extracelulares. El receptor CCR5 activo tiene cuatro cisteínas en sus segmentos extracelulares y las cuatro se conservan en los demás receptores de quimiocinas CC y CXC (figura 2). Las cisteínas situadas en el primer y segundo bucles extracelulares están presentes en la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G y se cree que forman un puente disulfuro que estabiliza la estructura del receptor [41]. Las otras dos cisteínas, en el segmento N-terminal y en el tercer bucle extracelular podrían formar de manera similar un puente estabilizador específico de la familia de receptores de quimiocinas. Los dominios intracelulares de CCR5 no incluyen sitios potenciales para la fosforilación por la proteína cinasa C (PKC) o proteína cinasa A. Los sitios de PKC, implicados en la desensibilización heteróloga, son frecuentes en el tercer bucle intracelular y el extremo C-terminal de los receptores acoplados a proteínas G. CCR1 también carece de sitios de PKC. Por el contrario, todos los receptores de quimiocinas CC son ricos en residuos de serina y treonina en el dominio C-terminal. Estos residuos

representan sitios de fosforilación potenciales por la familia de cinasas de receptor acoplado a proteínas G, y probablemente están implicados en la desensibilización homóloga [41]. Cinco de estos residuos S/T están perfectamente alineados en los cinco receptores (figura 2).

5 *Ligamiento físico de los genes CCR5 y CCR2*

Tal como se estableció anteriormente, los 16 clones aislados con la sonda MOP020 correspondían a un único cóntigo que contenía los genes CCR5 y CCR2. La organización de este cóntigo se investigó con el fin de caracterizar el ligamiento físico de los dos genes de los receptores en el genoma humano. Una combinación de mapeo de restricción, transferencia de tipo Southern, subclonación de fragmentos y secuenciación parcial permitió determinar los límites y solapamientos respectivos de todos los clones. De los 16 clones, 9 resultaron estar caracterizados por un mapa de restricción específico y su organización se representa en la figura 3. Cuatro de estos clones (# 11, 18, 21, 22) contenían el gen CCR2 solo, cuatro clones (# 7, 13, 15, 16) contenían el gen ChemR13 solo y un clon (# 9) contiene parte de ambas secuencias codificantes. Los genes CCR2 y CCR5 están organizados en tándem, estando situado CCR5 hacia 3' ("downstream") de CCR2. La distancia que separa los marcos abiertos de lectura de CCR2 y CCR5 es de 17,5 kb. La localización cromosómica del tándem es actualmente desconocida. Sin embargo, se han localizado otros receptores de quimiocinas en el genoma humano: el gen CCR1 se localizó mediante hibridación *in situ* con fluorescencia en la región p21 del cromosoma 3 humano [16]. Se ha mostrado que los dos genes de receptores de IL-8 y su pseudogen se agrupan en la región 2q34-q35 humana [1].

20 *Expresión funcional y farmacología del receptor CCR5 activo*

Se establecieron líneas celulares CHO-K1 estables que expresan el receptor CCR5 activo y se cribaron basándose en el nivel de transcritos de CCR5 determinados mediante transferencia tipo Northern. Se seleccionaron tres clones y se probaron para determinar las respuestas biológicas en un microfisiómetro, utilizando diversas quimiocinas CC y CXC como agonistas potenciales. Se utilizaron células CHO-K1 de tipo natural como control para asegurar que las respuestas observadas eran específicas para el receptor transfectado, y que no eran el resultado de la activación de receptores endógenos. El microfisiómetro permite la detección en tiempo real de la activación del receptor, midiendo las modificaciones del metabolismo celular que resultan de la estimulación de cascadas intracelulares [33]. Varios estudios han demostrado ya el potencial del microfisiómetro en el campo de los receptores de quimiocinas. Se registraron las modificaciones de la actividad metabólica en monocitos humanos, en respuesta a quimiocinas CC, utilizando este sistema [43]. De manera similar, se han medido los cambios en la tasa de acidificación de células THP-1 (una línea celular monocítica humana) en respuesta a MCP-1 y MCP-3 [36]. La estimación de la CE_{50} para ambas proteínas, utilizando este procedimiento, estuvo de acuerdo con los valores obtenidos registrando el calcio intracelular en otros estudios [8, 15].

Los ligandos que pertenecen a las clases de quimiocinas CC y CXC se probaron en las células CHO-K1 transfectadas con CCR5. Mientras que se encontró que MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES eran potentes activadores del nuevo receptor (figura 4), las quimiocinas CC, MCP-1, MCP-2 y MCP-3, y las quimiocinas CXC, GRO α e IL-8, no tuvieron efecto sobre la actividad metabólica, ni siquiera en las mayores concentraciones probadas (30 nM). La actividad biológica de una de las quimiocinas que no induce respuesta sobre CCR5 (IL-8) se pudo demostrar en una línea celular CHO-K1 transfectada con el receptor de interleucina IL-8A (Mollereau *et al.*, 1993): IL-8 produjo un aumento del 160% en la actividad metabólica, tal como se determinó utilizando el microfisiómetro. La actividad biológica de las preparaciones de MCP-2 y MCP-3 proporcionadas por J. Van Damme se ha documentado ampliamente [2, 40]. Se probaron MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES en las células CHO-K1 de tipo natural, con una concentración de 30 nM, y ninguna de ellas indujo una respuesta metabólica. En la línea celular CHO-K1 transfectada con CCR5, los tres ligandos activos (MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES) produjeron un rápido aumento en la tasa de acidificación, que alcanzó un máximo en el segundo o tercer minuto tras la perfusión del ligando. La tasa de acidificación volvió al nivel basal en un plazo de diez minutos. El ritmo de la respuesta celular es similar al de la observada para las quimiocinas en sus receptores naturales en monocitos humanos [43]. Cuando se aplicaron agonistas repetidamente a las mismas células, la respuesta se redujo considerablemente comparada con la primera estimulación, lo que sugiere la desensibilización del receptor. Por tanto, todas las medidas se obtuvieron en la primera estimulación de cada cápsula.

Se evaluó la relación concentración-efecto para los tres ligandos activos en el intervalo de 0,3 a 30 nM (figuras 3B y C). El orden de rango de potencia fue MIP-1 α > MIP-1 β = RANTES. A concentraciones de 30 nM, el efecto de MIP-1 α pareció saturarse (al 155% del nivel inicial), mientras que MIP-1 β y RANTES estaban todavía en la fase ascendente. Sin embargo, no pudieron utilizarse concentraciones superiores de quimiocinas. Se estimó que la CE_{50} era de aproximadamente 3 nM para MIP-1 α . Las concentraciones necesarias para obtener una respuesta biológica, determinadas utilizando el microfisiómetro, están en el mismo intervalo que las medidas mediante la movilización de calcio intracelular para los receptores CCR1 [31], los CCR2 y B [8] y el CCR3 [10]. La especificidad del ligando de CCR5 es similar a la descrita para CCR3 [10]. CCR3 se describió como el primer receptor clonado que respondía a MIP-1 β . Sin embargo, MIP-1 β a 10 nM provoca un efecto significativo sobre CCR5, mientras que la misma concentración no tiene efecto sobre las células transfectadas con CCR3 [10]. Estos datos sugieren que CCR5 podría ser un receptor fisiológico para MIP-1 β .

Los experimentos de unión que utilizan [125 I]-MIP-1 α humana como ligando no permitieron demostrar la unión específica a células CHO-K1 que expresan CCR5, utilizando tanto como radioligando 0,4 nM y 1 millón de células

transfectadas por tubo. El fracaso en la obtención de datos de unión podría atribuirse a una afinidad relativamente baja del receptor por MIP-1 α .

Análisis por transferencia de tipo Northern

5 La transferencia de tipo Northern realizada en un panel de tejidos de perro no permitió detectar los transcritos para CCR5. Dado el papel de la familia de receptores de quimiocinas en la mediación de la quimioatracción y la activación de diversas clases de células implicada en las respuestas inflamatorias e inmunes, la sonda también se utilizó para detectar transcritos específicos en un panel de líneas celulares humanas de origen hematopoyético (figura 10 5). El panel incluía líneas celulares linfoblásticas (Raji) y de linfoblastos T (Jurkat), líneas celulares promieloblásticas (KG-1A) y promielocíticas (HL-60), una línea celular monocítica (THP-1) y una línea celular eritroleucémica (HEL 92.1.7), una línea celular megacarioblástica (MEG-01) y una línea celular de leucemia mielógena (K-562). También se probaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), incluyendo monocitos y linfocitos maduros. Los transcritos de CCR5 (4,4 kb) sólo pudieron detectarse en la línea celular promieloblástica KG-1A, pero no se 15 encontraron en la línea celular promielocítica HL-60, en PBMC, ni en ninguna de las demás líneas celulares probadas. Estos resultados sugieren que el receptor CCR5 activo podría expresarse en precursores del linaje granulocítico. Se ha descrito que las quimiocinas CC estimulan granulocitos maduros [27, 38, 23, 2]. Sin embargo, datos recientes han demostrado también un papel de las quimiocinas CC y CXCL en la regulación de la proliferación de células progenitoras mieloides de ratón y ser humano [6, 7].

20 Se mostró que CCR5 responde a MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES, las tres quimiocinas identificadas como los principales factores supresores de VIH producidos por las células T CD8⁺ [9] y liberadas en cantidades superiores por los linfocitos T CD4⁺ de individuos no infectados pero expuestos múltiples veces [51]. CCR5 representa un correceptor principal para las cepas y aislados primarios de VIH-1 macrofagotrópico (M-trópico) [45, 50]. Las cepas M-trópicas predominan durante la fase asintomática de la enfermedad en individuos infectados, y se consideran responsables de la transmisión del VIH-1. Las cepas adaptadas para el crecimiento en líneas de células T transformadas (cepas T-trópicas) usan como correceptor LESTR (o fusina) [50], un receptor huérfano que también pertenece a la familia de receptores de quimiocinas, pero todavía no caracterizado funcionalmente [21, 52, 53]. Se ha mostrado que los virus con tropismo dual, que pueden representar formas de transición del virus en fases tardías de la infección [54] usan tanto CCR5 como LESTR como correceptores, así como los receptores CCR2b y CCR3 de quimiocinas CC [47]. El amplio espectro de uso de correceptores de los virus con tropismo dual sugiere que en individuos infectados, el virus puede evolucionar al menos en parte a partir de la selección de una variedad de correceptores expresados en diferentes tipos celulares.

Identificación de un receptor Δ CCR5 inactivo

35 Se sabe que algunos individuos permanecen sin infectarse a pesar de la exposición repetida al VIH-1 [55, 56, 51]. Una proporción de estos individuos expuestos y no infectados resulta del riesgo relativamente bajo de contaminación tras un único contacto con el virus, pero se ha postulado que existen individuos verdaderamente resistentes. De hecho, 40 los linfocitos CD4⁺ aislados de individuos expuestos y no infectados son sumamente resistentes a la infección por cepas primarias de VIH-1 M-trópico, pero no a T-trópico. Además, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de diferentes donantes no se infectan de la misma manera con diversas cepas de VIH-1 [57-59]. Dado el papel clave desempeñado por CCR5 en el acontecimiento de fusión que media la infección por virus M-trópicos, se postula que variantes de CCR5 podrían ser responsables de la resistencia relativa o absoluta frente a la infección por 45 VIH-1 mostrada por algunos individuos, y posiblemente, de la variabilidad de evolución de la enfermedad en pacientes infectados [66]. Los inventores seleccionaron tres pacientes infectados por VIH-1 que se sabía que evolucionaban lentamente y cuatro individuos seronegativos como controles; se amplificó la región codificante completa de su gen CCR5 mediante PCR y se secuenció. De manera inesperada, uno de los de evolución lenta, pero también dos de los controles no infectados, mostraron heterocigosidad en el locus CCR5 para un polimorfismo bialélico. El alelo frecuente correspondía a la secuencia de CCR5 publicada, mientras que el minoritario mostró una delección de 32 pb dentro de 50 la secuencia codificante, en una región correspondiente al segundo bucle extracelular del receptor (figura 6). La figura 6 es la estructura de la forma mutante del receptor 5 de quimiocinas CC humano. *a*, Se representa la secuencia de aminoácidos de la proteína Δ CCR5 no funcional. Se facilita la organización transmembrana por analogía con la estructura transmembrana pronosticada de CCR5 de tipo natural. Los aminoácidos representados en negro corresponden a los residuos no naturales que resultan del desplazamiento del marco de lectura producido por la delección. La proteína mutante carece de los tres últimos segmentos transmembrana de CCR5, así como de las regiones implicadas en el acoplamiento con proteínas G. *b*, Secuencia de nucleótidos del gen CCR5 que rodea la región con delección y la traducción para dar el receptor normal (parte superior) o el mutante truncado (*ccr5*, parte inferior). La repetición directa de 10 pb se representa en cursiva. La región codificante de tamaño completo del gen CCR5 se amplificó mediante PCR, utilizando 5'-TCGAGGATCCAAGATGGATTATCAAGT-3' y 5'-CTGATCTAGAGCCATGTGCACAACACTCT-3' como cebadores directo e inverso, respectivamente. Los productos de PCR se secuenciaron en ambas hebras utilizando los mismos oligonucleótidos como cebadores, así como cebadores internos, y didesoxinucleótidos marcados con fluorocromo como terminadores. Los productos de secuenciación se aplicaron a un secuenciador de Applied Biosystem y se buscaron posiciones ambiguas a lo largo de la secuencia codificante. Cuando se sospechaba de la presencia de una 65 delección de la secuenciación directa, se clonaron los productos de PCR tras restricción con las endonucleasas *Bam*HI y *Xba*I en pcDNA3. Se secuenciaron varios clones para confirmar la delección. La delección fue idéntica en tres individuos no relacionados entre sí investigados mediante secuenciación.

La clonación del producto de PCR y la secuenciación de varios clones confirmó la delección. La delección produce un desplazamiento del marco de lectura, que se espera que dé como resultado una terminación prematura de la traducción. La proteína codificada por este alelo mutante (Δ CCR5) carece, por tanto, de los tres últimos segmentos transmembrana del receptor. Se espera que una repetición directa de 10 pb que flanquea la región con delección (Figura 6b) en ambos lados, haya promovido el acontecimiento de recombinación que conduce a la delección. Numerosos estudios de mutagénesis realizados con diversas clases de receptores acoplados a proteínas G, incluyendo receptores de quimiocinas, dejan claro que tal proteína truncada es desde luego no funcional en cuanto a la transducción de señales inducida por quimiocinas: carece de los dominios del tercer bucle intracelular y citoplásmicos del extremo C-terminal, las dos regiones implicadas principalmente en el acoplamiento a proteínas G [41]. Con el fin de probar si la proteína truncada podía funcionar como un correceptor de VIH-1, los inventores probaron su capacidad para soportar la fusión de membrana por proteínas ENV de virus tanto primarios M-trópicos como dual-trópicos. La proteína recombinante se expresó en células QT6 de codorniz junto con CD4 humano. Las células QT6 se mezclaron entonces con células HeLa, que expresaban la proteína ENV vírica indicada y se midió el grado de fusión célula-célula utilizando un ensayo de gen-indicador sensible y cuantitativo. Al contrario que CCR5 de tipo natural, el receptor truncado no permitió la fusión con células que expresan la proteína ENV de los virus M-trópicos o dual-trópicos (figura 7). La figura 7 representa la cuantificación de la fusión mediada por la proteína ENV mediante el ensayo de luciferasa. Para cuantificar los acontecimientos de fusión célula-célula, se transfectaron o se contransfectaron células de fibrosarcoma QT6 de codorniz japonesa, tal como se indicó con el vector pcDNA3 (Invitrogen) que contenía la secuencia codificante de CCR5 de tipo natural, el mutante Δ CCR5 truncado, los receptores de quimiocinas CCR2b o Duffy, o con el vector pcDNA3 solo. Las células diana también se transfectaron con CD4 humano expresado desde el promotor CMV y el gen de la luciferasa bajo el control del promotor T7. Las células efectoras HeLa se infectaron (MOI (multiplicidad de infección) = 10) con vectores del virus de la vacuna que expresaban T7-polimerasa (vTF1.1) y, o bien proteínas de la envoltura JR-FL (vCB28) o bien 89.6 (vBD3).

La actividad luciferasa que resulta de la fusión celular se expresa como el porcentaje de la actividad (en unidades luminosas relativas) obtenida para CCR5 de tipo natural. Todas las transfecciones se realizaron con una cantidad idéntica de ADN del plásmido, utilizando pcDNA3 como portador, cuando era necesario. Para iniciar la fusión, se mezclaron las células diana y efectoras en placas de 24 pocillos a 37°C, en presencia de ara-C (arabinósido de citosina) y rifampicina y se permitió que se fusionaran durante 8 horas. Las células se lisaron en 150 μ l de tampón de lisis indicador (Promega) y se sometieron a ensayo para determinar la actividad luciferasa según las instrucciones del fabricante (Promega).

La coexpresión de Δ CCR5 con CCR5 de tipo natural redujo sistemáticamente la eficacia de fusión tanto para envolturas JR-FL como 89.6, comparado con CCR5 solo. No se sabe actualmente si este efecto inhibitorio *in vitro* (no compartido por el receptor de quimiocinas Duffy, utilizado como control) también se produce *in vivo*. La coexpresión con el receptor CCR2b [31], que es el receptor de quimiocinas CC más estrechamente relacionado con CCR5 pero que no promueve la fusión por cepas de VIH-1 M-trópico [48], no salvó la mutación mediante la formación de una molécula híbrida (Figura 7).

La figura 8 representa la obtención del genotipo de individuos mediante PCR y la segregación de alelos CCR5 en familias del CEPH. *a*, Autorradiografía que ilustra el patrón resultante de la amplificación por PCR y la escisión con *Eco*RI para individuos homocigóticos para el alelo CCR5 de tipo natural (CCR5/CCR5), el alelo Δ CCR5 nulo (Δ CCR5/ Δ CCR5) y para los heterocigotos (CCR5/ Δ CCR5). Un producto de PCR de 735 pb se escinde en una banda común de 332 pb para ambos alelos y en bandas de 403 y 371 pb para los alelos de tipo natural y mutante, respectivamente. *b*, Segregación de los alelos CCR5 en dos familias informativas del CEPH. Los símbolos medio negros y blancos representan heterocigotos y homocigotos de tipo natural, respectivamente. Para unos cuantos individuos de los linajes, no había ADN disponible (ND: no determinado). Se realizaron las PCR con muestras de ADN genómico, utilizando 5'-CCTGGCTGTCGTCATGCTG-3' y 5'-CTGATCTAGAGCCATGTGCACAACCTCT-3' como cebadores directo e inverso, respectivamente. Las mezclas de reacción consistieron en 30 μ l de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, que contenía KCl 50 mM, MgCl₂ 0,75 mM, dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM, dATP 0,1 mM, 0,5 μ l de [α -³²P]-dATP, gelatina al 0,01%, DMSO al 5%, 200 ng de ADN diana, 60 ng de cada uno de los cebadores y 1,5 U de Taq polimerasa. Las condiciones de PCR fueron: 93°C durante 2 min 30; 93°C durante 1 min; 60°C durante 1 min, 72°C durante 1 min, 30 ciclos; 72°C durante 6 min. Tras la reacción de PCR, las muestras se incubaron durante 60 min a 37°C con 10 U de *Eco*RI y se aplicaron 2 μ l de la mezcla de reacción desnaturalizada sobre un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 5% que contenía formamida al 35% y urea 5,6 M. Se detectaron las bandas mediante autorradiografía.

Basándose en los 14 cromosomas probados en el primer experimento, el alelo Δ CCR5 con delección pareció ser bastante frecuente en la población blanca. La frecuencia exacta se estimó adicionalmente probando (figura 8) una gran cohorte de individuos blancos, incluyendo miembros no relacionados entre sí de las familias del CEPH (Centre d'Etudes des Polymorphismes Humains), parte del personal del IRIBHN (Instituto de Investigación Multidisciplinar en Biología Humana Y Molecular, de Bruselas) y un banco de muestras de ADN anónimas procedentes de individuos sanos recogidas por el Departamento de Genética del Hospital Erasme de Bruselas. De un total de más de 700 individuos sanos, se encontró que las frecuencias alélicas eran de 0,908 para el alelo de tipo natural y 0,092 para el alelo mutante (tabla I). Las frecuencias genotípicas observadas en la población no eran significativamente diferentes de la distribución de Hardy-Weinberg esperada (CCR5/CCR5: 0,327 frente a 0,324; CCR5/ Δ CCR5: 0,162 frente a 0,167; Δ CCR5/ Δ CCR5: 0,011 frente a 0,008, $p > 0,999$), lo que sugiere que el alelo nulo no tuvo un efecto drástico sobre el estado físico. Utilizando dos familias informativas del CEPH, se confirmó que el gen CCR5 de tipo natural y su variante Δ CCR5 eran alélicos y se segregaban de una forma mendeliana normal (figura 8b). De manera interesante, una

cohorte de 124 muestras de ADN procedentes de África central (recogidas en Zaire, Burkina Faso, Camerún, Senegal y Benín) y Japón no reveló un solo alelo mutante $\Delta ccr5$, lo que sugiere que este alelo está ausente o es muy raro en las poblaciones negra africana y asiática (tabla I).

5 Las consecuencias de la existencia de un alelo nulo de CCR5 en la población blanca normal se consideraron entonces en cuanto a la susceptibilidad a la infección por VIH-1. Si, tal como se pronostica, CCR5 desempeña un papel principal (no redundante) en la entrada de la mayoría de las cepas primarias de virus al interior de las células, entonces los individuos $\Delta ccr5/\Delta ccr5$ deben ser particularmente resistentes a la exposición con VIH-1, tanto *in vitro* como *in vivo*. La frecuencia del genotipo $\Delta ccr5/\Delta ccr5$ debe ser, por tanto, significativamente inferior en pacientes infectados por VIH-1 y aumentar en individuos expuestos y no infectados. Además, si los heterocigotos tienen una ventaja estadística debido al menor número de receptores funcionales en sus glóbulos blancos, o a las posibles propiedades negativas dominantes del alelo mutante, la frecuencia de heterocigotos (y alelos mutantes) debe disminuir en poblaciones infectadas por VIH. Se probaron estas hipótesis obteniendo el genotipo de un gran número de individuos blancos seropositivos (n = 645) que pertenecían a cohortes procedentes de diversos hospitales de Bruselas, Lieja y París (tabla I). De hecho, se encontró que dentro de esta gran serie, la frecuencia del alelo nulo $\Delta ccr5$ se redujo significativamente desde 0,092 hasta 0,053 ($p < 10^{-5}$). La frecuencia de heterocigotos también se redujo desde 0,162 hasta 0,106 ($p < 0,001$) y no pudo encontrarse un solo individuo $\Delta ccr5/\Delta ccr5$ ($p < 0,01$).

En conjunto, los datos estadísticos y funcionales sugieren que CCR5 es efectivamente el principal correceptor responsable de la infección natural por cepas de VIH-1 M-tropical. Los individuos homocigóticos para el alelo $\Delta ccr5$ nulo (aproximadamente el 1% de la población blanca) tienen aparentemente una fuerte resistencia a la infección. No está claro en ese punto si la resistencia al VIH-1 es absoluta o relativa y si la resistencia variará dependiendo del modo de contaminación vírica. Se deberán probar cohortes más grandes de individuos seropositivos con el fin de clarificar este punto. Los heterocigotos tienen una ventaja más leve aunque significativa: suponiendo una igual probabilidad de contacto con VIH, puede deducirse de la tabla I que los heterocigotos tienen una reducción del 39% en su posibilidad de llegar a ser seropositivos, comparado con los individuos homocigóticos para el alelo CCR5 de tipo natural. Tanto una disminución en el número de receptores CCR5 funcionales como un efecto dominante negativo de $\Delta ccr5$ *in vivo*, comparable al que se observa en los experimentos *in vitro* (figura 7) son posibles explicaciones de esta protección relativa. El alelo mutante, que puede considerarse como una deficiencia natural en el ser humano, no va acompañado por un fenotipo obvio en los individuos homocigóticos. Sin embargo, la falta de fenotipo manifiesto, tomado junto con la protección relativa que caracteriza a los sujetos heterocigóticos, sugiere que los agentes farmacológicos que bloquean selectivamente la capacidad del VIH-1 para utilizar CCR5 como un cofactor, podrían ser eficaces en la prevención de la infección por VIH-1 y se pronosticaría que no estarán asociados con efectos secundarios importantes resultantes de la inactivación de CCR5. Estos agentes farmacéuticos podrían utilizarse, con otros compuestos que pueden bloquear otros receptores de quimiocinas utilizados como correceptores, por algunos aislados primarios de VIH con el fin de infectar otras células [47]. La prevalencia del alelo nulo en la población blanca plantea la pregunta de si la pandemia de VIH (o virus relacionados que utilizan el mismo correceptor) ha contribuido durante la evolución de la humanidad a estabilizarse mediante selección del alelo *ccr5* mutante a una frecuencia tan elevada.

Producción de anticuerpos anti-CCR5

Los anticuerpos se produjeron mediante inmunización genética. Se utilizaron ratones balb/c hembra de seis semanas de edad. Se insertó el ADN que codifica para el receptor CCR5 humano en el vector de expresión pcDNA3 bajo el control del promotor CMV y se inyectaron 100 μ g de ADN en el músculo tibial anterior, cinco días después del pretratamiento de este músculo con cardiotoxina (del veneno de Naja Nigriculis). Las inyecciones se repitieron dos veces a intervalos de tres semanas. Quince días después de la última inyección, se extrajo sangre de cada animal y se probaron los sueros para determinar la presencia de anticuerpos anti-CCR5.

Prueba de los sueros utilizando separación de células activada por fluorescencia (FACS)

Los sueros se probaron mediante separación de células activada por fluorescencia, utilizando células CHO recombinantes que expresaban el receptor CCR5. Brevemente, se separaron las células utilizando una disolución de PBS-EDTA-EGTA y se incubaron en medio PBS-BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente con 5 μ l de suero, sobre la base de 100.000 células por tubo. Después, las células se lavaron y se incubaron durante 30 minutos en hielo junto con anticuerpo anti-ratón marcado con fluoresceína. Las células se lavaron, se recogieron en 200 μ l de una disolución de PBS-BSA y se analizó la fluorescencia mediante FACS (FACSCAN, Becton-Dickinson). Se contaron 10.000 células. Se utilizaron células CHO de tipo natural o CHO recombinantes que expresan el receptor CCR2 humano como controles.

Cuando se probaron mediante análisis por FACS 2 semanas después de la última inyección (figura 9), todos los sueros procedentes de ratones inmunizados con ADNc de CCR5, reconocieron claramente el receptor nativo expresado en las células CHO (media de fluorescencia = 200), sin una reacción cruzada significativa con las células control que expresaban CCR2b (media de fluorescencia = 20).

ES 2 325 073 T3

Los sueros se probaron en una línea celular CHO que expresa un nivel elevado de receptor CCR5 (histograma negro) o una línea celular CHO que expresa el receptor CCR2b (histograma blanco) como control negativo. Cada suero se probó por separado.

5

Anticuerpos anti-CCR5 e infectividad por VIH

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante homocigótico del gen CCR5 de tipo natural y se cultivaron 3 días en presencia de PHA (fitohemaglutinina).

10

En el día 4, se incubaron 800 μ l de células (10^5 células/ml) con 8 μ l de sueros procedentes de ratones inmunizados con ADNc de CCR5, 30 minutos a 37°C. Después, se añadió 1 ml de disolución vírica (cepa de VIH JRCSF) y se incubó durante 2 horas. Después, se lavaron las células dos veces y se cultivaron durante 15 días.

15

Se toma una alícuota del medio en los días 0, 4, 7, 10 y 14 y se realiza la determinación de la dosis del antígeno p24.

20

14 días después del comienzo del experimento, un suero (suero B0) bloquea totalmente la producción de p24, lo que indica su capacidad para bloquear la infección de los linfocitos por esta cepa de VIH (figura 10). Otros sueros también muestran un efecto parcial o total sobre esta infección (suero A2 y B1). Todos los demás sueros no mostraron ningún efecto sobre esta infección.

25

Producción de anticuerpos monoclonales

Se seleccionaron los ratones con el mayor título de anticuerpos CCR5 para la producción de anticuerpos monoclonales y se inyectaron por vía intravenosa con 10^7 células CHO-K1 recombinantes, que expresan receptores CCR5 humanos. Tres días después, se sacrificaron los animales y se realizó la fusión de células esplénicas o células de los ganglios linfáticos próximas al sitio de la inyección con células de mieloma SP2/0. El protocolo de fusión utilizado fue el de Galfre *et al.* (Nature 266, 550 (1977)). Se utiliza un medio selectivo HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina) para seleccionar hibridomas y sus sobrenadantes se prueban mediante FACS utilizando células CHO recombinantes, que expresan el receptor CCR5 humano, tal como se hizo para los sueros. Se clonaron después los hibridomas positivos mediante dilución limitada. Los clones que se muestran positivos mediante análisis por FACS se expandieron después y se producen en ascitis en ratones balb/c.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

Tabla I

	Seronegativo			Seropositivo			Ji-cuadrado
	Número	Frecuencia	Error estándar	Número	Frecuencia	Error estándar	
Genotipos:							
CCR5/CCR5	582	0,827	0,014	645	0,892	0,012	2 grados de libertad 17,7 p < 0,0005
CCR5/ΔCCR5	114	0,162	0,014	78	0,108	0,012	
CCR5/ΔCCR5	8	0,011	0,004	0	0,000	< 0,001	
Total:	704	1,000		723	1,000		
Alelos:							
CCR5	1278	0,908	0,008	1368	0,946	0,006	1 grado de libertad p < 0,0005
ΔCCR5	130	0,092	0,008	78	0,054	0,006	
Total:	1408	1,000		1446	1,000		

Bibliografia

1. **Ahuja et al.** (1992) *Nature Genetics* 2, 31-36.
- 5 2. **Alam et al.** (1994) *J. Immunol.* 153, 3155-3159.
3. **Alam et al.** (1992) *J. Exp. Med.* 176, 781-786.
- 10 4. **Baggiolini et al.** (1994) *Advances in immunology, Academic press.* Ed. Dixon, F.J. 55, 97-179.
5. **Birkenbach et al.** (1993) *J. Virol.* 67, 2209-2220.
6. **Broxmeyer et al.** (1990) *Blood* 76, 1110-1116.
- 15 7. **Broxmeyer et al.** (1993) *J. Immunol.* 150, 3448-3458.
8. **Charo et al.** (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2752-2756.
9. **Cocci et al.** (1995) *Science* 270, 1811-1815.
- 20 10. **Combadiere et al.** (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 16491-16494.
11. **Desarnaud et al.** (1994) *Biochem. J.* 299, 367-373.
- 25 12. **Devereux et al.** (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
13. **Dobner et al.** (1992) *Eur. J. Immunol.* 22, 2795-2799.
14. **Feinberg et al.** (1983) *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- 30 15. **Franci et al.** (1995) *J. Immunol.* 154, 6511-6517.
16. **Gao et al.** (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 17494-17501.
- 35 17. **Gao et al.** (1993) *J. Exp. Med.* 177, 1421-1427.
18. **Gong et al.** (1995) *J. Exp. Med.* 181, 631-640.
19. **Hébert et al.** (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 18549-18533.
- 40 20. **Holmes et al.** (1991) *Science* 253, 1278-1283.
21. **Jazin et al.** (1993) *Regul. Peptides* 47, 247-258.
- 45 22. **Kozak, M.** (1989) *J. Cell. Biol.* 108, 229-241.
23. **Kuna et al.** (1992) *J. Immunol.* 149, 636-642.
24. **Libert et al.** (1989) *Science* 244, 569-572.
- 50 25. **Matsuoka et al.** (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 504-511.
26. **Mc Master et al.** (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4835-4838.
- 55 27. **McColl et al.** (1993) *J. Immunol.* 150, 4550-4560.
28. **Mollereau et al.** (1993) *Genomics* 16, 248-251.
29. **Murphy, P.M.** (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12, 593-633.
- 60 30. **Murphy et al.** (1991) *Science* 253, 1280-1283.
31. **Neote et al.** (1993) *Cell* 72, 415-425.
- 65 32. **Oppenheim et al.** (1991) *Ann. Rev. Immunol.* 9, 617-648.
33. **Owicki et al.** (1992) *Biosensors Bioelectronics* 7, 255-272.

ES 2 325 073 T3

34. **Parmentier et al.** (1989) *Science* 246, 1620-1622.

35. **Perret et al.** (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 1044-1050.

5 36. **Pleass et al.** (1995) *Fourth International Chemokine Symposium*, Bath (UK), 27-30 June, P47.

37. **Power et al.** (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 19495-19500.

38. **Rot et al.** (1992) *J. Exp. Med.* 176, 1489-1495.

10

39. **Sambrook et al.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.*

40. **Sozzani et al.** (1994) *J. Immunol.* 152, 3615-3622.

15

41. **Strader et al.** (1994) *Annu. Rev. Biochem. Ed. Dixon, R.A.F.* 63, 101-132.

42. **Thomas, P. S.** (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201-5205.

20

43. **Vaddi et al.** (1994) *The FASEB Journal* 8, A502.

44. **Yamagami et al.** (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1156-1162.

45. **Deng et al.** (1996) *Nature* 381, 661-666.

25

46. **Drajic et al.** (1996) *Nature* 381, 667-673.

47. **Doranz et al.** (1996) *Cell* 85, 1149-1158.

30

48. **Choe et al.** (1996) *Cell* 85, 1135-1148.

49. **Alkhatib et al.** (1996) *Science* 272, 1955-1958.

50. **Feng et al.** (1996) *Science* 272, 872-877.

35

51. **Paxton et al.** (1996) *Nat. Med.* 2, 412-417.

52. **Nomura et al.** (1993) *Int. Immunol.* 5, 1239-1249.

40

53. **Loetscher et al.** (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 232-237.

54. **Coltman et al.** (1992) *J. Virol.* 66, 7517-7521.

55. **Detels et al.** (1994) *J. Acquir. Immun. Defic. Sindr.* 7, 1263-1269.

45

56. **Taylor R. J.** (1994) *J. NIH Res.* 6, 29-31.

57. **Wainberg et al.** (1987) *Clin. Exp. Immunol.* 1987, 136-142.

50

58. **Williams et al.** (1991) *Virology* 184, 723-728.

59. **Spria et al.** (1995) *J. Virol.* 69, 422-429.

60. **Haynes et al.** (1996) *Science* 271, 324-328.

55

61. **Ben-Baruch et al.** (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 11703-11706.

62. **Nussbaum et al.** (1994) *J. Virol.* 68, 5411-5422.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un ligando es un agonista de un péptido, en donde dicho método comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con el ligando en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido de la célula y detectar por medio de un bioensayo, en donde dicho bioensayo detecta la modificación de inositol fosfato, tal como IP3, o diacilglicerol o detecta una modificación en el metabolismo celular, un aumento en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un agonista del péptido, y en donde dicho péptido se elige del grupo que consiste en:

- (a) péptidos que tienen al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80%, y preferiblemente más del 90%, de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 mostrada en la figura 1;
- (b) péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 mostrada en la figura 1, o una parte de la misma;
- (c) péptidos según (a) ó (b) **caracterizados** en que son un receptor de quimiocinas CC;
- (d) péptidos según (c), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC es estimulado por la quimiocina MIP-1 β a una concentración igual o menor de 10 nM;
- (e) péptidos según (c) ó (d), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC es estimulado por las quimiocinas MIP-1 α o RANTES;
- (f) péptidos según cualquiera de (c) a (e), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC no es estimulado por las quimiocinas MCP-1, MCP-3, IL-8 y GRO α ;
- (g) péptidos según cualquiera de (a) a (f), **caracterizados** en que son un receptor de virus VIH-1 y/o VIH-2 o una parte de dichos virus;
- (h) péptidos según cualquiera de (a) ó (b), que es un receptor humano.

2. Método para determinar si un ligando es un agonista de un péptido, en donde dicho método comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner en contacto la fracción de membrana con el ligando en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido y detectar por medio de un bioensayo, en donde dicho bioensayo detecta la modificación de inositol fosfato, tal como IP3, o diacilglicerol o mide iones de calcio o AMPc, un aumento en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un agonista del péptido, y en donde dicho péptido se elige del grupo que consiste en:

- (a) péptidos que tienen al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80%, y preferiblemente más del 90%, de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 mostrada en la figura 1;
- (b) péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 mostrada en la figura 1, o una parte de la misma;
- (c) péptidos según (a) ó (b) **caracterizados** en que son un receptor de quimiocinas CC;
- (d) péptidos según (c), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC es estimulado por la quimiocina MIP-1 β a una concentración igual o menor de 10 nM;
- (e) péptidos según (c) ó (d), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC es estimulado por las quimiocinas MIP-1 α o RANTES;
- (f) péptidos según cualquiera de (c) a (e), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC no es estimulado por las quimiocinas MCP-1, MCP-3, IL-8 y GRO α ;
- (g) péptidos según cualquiera de (a) a (f), **caracterizados** en que son un receptor de virus VIH-1 y/o VIH-2 o una parte de dichos virus;
- (h) péptidos según cualquiera de (a) ó (b), que es un receptor humano.

3. Método para determinar si un ligando es un antagonista de un péptido, en donde dicho método comprende poner en contacto una célula transfectada con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido con el ligando en presencia de un agonista conocido del péptido, en condiciones que permiten la activación

ES 2 325 073 T3

de una respuesta funcional del péptido y detectar por medio de un bioensayo, en donde dicho bioensayo detecta la modificación de inositol fosfato, tal como IP3, o diacilglicerol, o detecta una modificación en el metabolismo celular, un descenso en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un antagonista del péptido, y en donde dicho péptido se elige del grupo que consiste en:

- 5
- (a) péptidos que tienen al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80%, y preferiblemente más del 90%, de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 mostrada en la figura 1;
 - 10 (b) péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 mostrada en la figura 1, o una parte de la misma;
 - (c) péptidos según (a) ó (b) **caracterizados** en que son un receptor de quimiocinas CC;
 - 15 (d) péptidos según (c), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC es estimulado por la quimiocina MIP-1 β a una concentración igual o menor de 10 nM;
 - (e) péptidos según (c) ó (d), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC es estimulado por las quimiocinas MIP-1 α o RANTES;
 - 20 (f) péptidos según cualquiera de (c) a (e), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC no es estimulado por las quimiocinas MCP-1, MCP-3, IL-8 y GRO α ;
 - (g) péptidos según cualquiera de (a) a (f), **caracterizados** en que son un receptor de virus VIH-1 y/o VIH-2 o una parte de dichos virus;
 - 25 (h) péptidos según cualquiera de (a) ó (b), que es un receptor humano.

4. Método para determinar si un ligando es un antagonista de un péptido, en donde dicho método comprende preparar un extracto celular de células transfectadas con un vector que expresa la molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido, aislar una fracción de membrana del extracto celular, poner en contacto la fracción de membrana con el ligando en presencia de un agonista conocido del péptido, en condiciones que permiten la activación de una respuesta funcional del péptido y detectar por medio de un bioensayo, en donde dicho bioensayo detecta la modificación de inositol fosfatos, tal como IP3, o diacilglicerol o mide iones de calcio o AMPc, un descenso en la actividad del péptido, determinando por lo tanto si el ligando es un antagonista del péptido, y en donde dicho péptido se elige del grupo que consiste en:

- 30
- (a) péptidos que tienen al menos una secuencia de aminoácidos que presenta más del 80%, y preferiblemente más del 90%, de homología con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 mostrada en la figura 1;
 - 40 (b) péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 mostrada en la figura 1, o una parte de la misma;
 - 45 (c) péptidos según (a) ó (b) **caracterizados** en que son un receptor de quimiocinas CC;
 - (d) péptidos según (c), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC es estimulado por la quimiocina MIP-1 β a una concentración igual o menor de 10 nM;
 - 50 (e) péptidos según (c) ó (d), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC es estimulado por las quimiocinas MIP-1 α o RANTES;
 - (f) péptidos según cualquiera de (c) a (e), **caracterizados** en que el receptor de quimiocinas CC no es estimulado por las quimiocinas MCP-1, MCP-3, IL-8 y GRO α ;
 - 55 (g) péptidos según cualquiera de (a) a (f), **caracterizados** en que son un receptor de virus VIH-1 y/o VIH-2 o una parte de dichos virus;
 - 60 (h) péptidos según cualquiera de (a) ó (b), que es un receptor humano.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la célula es una célula de mamífero, preferiblemente de origen no neuronal, y elegida entre el grupo que consiste en células CHO-K1, HEK293, BHK21, COS-7, KG-1A y HeLa o células QT6 de codorniz.

65

SEQ ID NO.1

FIG.1 a

GAATTC	CCCCAACAGAGCCAAGCTCTCCATCTAGTGGACAGGGAAGCTAGCAGCAAACC	59
		19
TTCCCTTCACTACAAA	ACTTCATGCTTGGCCAAAAAGAGAGTTAATTC	119
		39
CTATGTAGGCAATT	AAAAACCTATGATGTATAAAACAGTTTGCAATTCATGGAGGGCAAC	179
		59
TAAATACATTCTAGGACTTTATA	AAAAGATCACTTTTATTATGACAGGGTGGAAAC	239
		79
ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTATACATCGGAGCCCTGC		299
M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C		99
CAAAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCGCTCCTACTCACTGGTG		359
Q K I N V K Q I A A R L L P P L Y S L V		119
TTCACTCTTGGTTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCACTCTCCTGATAAACTGCAAAGG		419
F I F G F V G N M L V I L I L I N C K R		139
CTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCCTT		479
L K S M T D I Y L L N L A I S D L P F L		159
CTTACTGTCCCCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATG		539
L T V P F W A H Y A A A Q W D F G N T M		179
TGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCATC		599
C Q L L T G L Y F I G F P S G I F F I I		199
CTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGG		659
L L T I D R Y L A V V H A V P A L K A R		219
ACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGGGTCT		719
T V T F G V V T S V I T W V V A V P A S		239
CTCCCAGGAATCATCTTACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCT		779
L P G I I P T R S Q K E G L H Y T C S S		259
CATTTCCATACA		
H P P Y		

GAATTCCTCCCAACAGAGCCAAGCTCTCCATCTAGTGGACAGGGAAGCTAGCAGCAAACC	59
	19
TTCCCTTCACTACAAAACCTTCATTGCTTGGCCAAAAAGAGGTTAATTCATGTAGACAT	119
	39
CTATGTAGGCAATTA AAAACCTATTGATGTATAAAAACAGTTTGCA TTCATGGAGGGCAAC	179
	59
TAAATACATTC TAGGACTTTATAAAAAGATCACTTTTATTATGCACAGGGTGGAAACAAG	239
	79
ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTATACATCGGAGCCCTGC	299
M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C	99
CAAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCCTCCGCTCTACTCCTGGTG	359
Q K I N V K Q I A A R L L P P L Y S L V	119
TTCACTCTTGGTTTTGTGGGCAACA TGCTGGTCA TCCTCATCCTGATAAACTGCCAAAGG	419
F I F G F V G N M L V I L I L I N C K R	139
CTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCTGTTTTCCCT	479
L K S M T D I Y L L N L A I S D L P F L	159
CTTACTGTCCCCTTCGGGCTCACTATGCTGCCGCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATG	539
L T V P F W A H Y A A A Q W D F G N T M	179
TGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCATC	599
C Q L L T G L Y F I G F F S G I P F I I	199
CTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTGCTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGG	659
L L T I D R Y L A V V H A V F A L K A R	219
ACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGGCTCT	719
T V T F G V V T S V I T W V V A V F A S	239
CTCCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCT	779
L P G I I P T R S Q K E G L H Y T C S S	259
CATTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATC	839
H F P Y S Q Y Q F W K N P Q T L K I V I	279

SEQ ID NO.2 FIG.1b

TTGGGGCTGGTCCCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAACT	899
L G L V L P L L V M V I C Y S G I L K T	299
CTGCTTCGGTGTGCGAAATGAGAAGAAGAGGCACAGGGCTGTGAGGCTTATCTTCACCATC	959
L L R C R N E K K R H R A V R L I P T I	319
ATGATTGTTTATTTCTCTCTGCGGCTCCCTACAACATGTCTCTCTCCTGAACACCTTC	1019
M I V Y F L F W A P Y N I V L L L N T P	339
CAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAGCTCTAACAGGTTGGACCAAGCTATGCAG	1079
Q E F F G L N N C S S S N R L D Q A M Q	359
GTGACAGAGACTCTTGGGATGACGCACGTGCTGCATCAACCCCATCATCTATGCCCTTTGTC	1139
V T E T L G M T H C C I N P I I Y A F V	379
GGGGAGAAGTTCAGAACTACCTCTTAGTCTCTCTCCAAAAGCACATTGCCAAACGCTTC	1199
G E K F R N Y L L V P F Q K H I A K R P	399
TGCAAAATGCTGTTCTATTTTCCAGCAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACACC	1259
C K C C S I F Q Q E A P E R A S S V Y T	419
CGATCCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTTGTGACACGGACTCAAGTGGGCTGGT	1319
R S T G E Q E I S V G L *	439
GACCCAGTCAGAGTTGTGCACATGGCTTAGTTTTATACACAGCCTGGGCTGGGGGTTGG	1379
	459
TTGGGNGAGGTCTTTTTTAAAAGGAAGTTACTGTTATAGAGGGTCTAAGATTATCCATT	1439
	479
TATTTGGCATCTGTTTAAAGTAGATTAGATCCGAATTC	

SEQ ID NO.2 (SUITE)

FIG.1c

ES 2 325 073 T3

GAATTCCCCCAACAGAGCCAGCTCTCCATCTAGTGGACAGGGAAGCTAGCAGCAAACC	59
	19
TTCCCTTCACTACAAAACCTTCATGTGCTTGGCCAAAAGAGAGTTAATTCATGTAGACAT	119
	39
CTATGTAGGCAATTA AAAACCTATTGATGTATAAAAACAGTTTGCAITCATGGAGGGCAAC	179
	59
TAAATACATTCTAGGACTTTATAAAAGATCACTTTTATTATGACAGGGTGGAAACAG	239
	79
ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAAATCTATGACATCAATTTATAACATCGGAGCCCTGC	299
M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P C	99
CAAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCCCTCCTGCCTCGCTCTACTCACTGGTG	359
Q K I N V K Q I A A R L L P P L Y S L V	119
TTCACTCTTTGGTTTTGTGGGCCAACATGCTGGTCACTCTCATCTGATAAAGTGC AAAAGG	419
F I P G P V G N M L V I L I L I N C K R	139
CTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCTGTTTTCTCT	479
L K S M T D I Y L L N L A I S D L F F L	159
CTTACTGTCCCCTTCTGGGCTCACTATGCTGCGCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATG	539
L T V P P W A H Y A A A Q W D P G N T M	179
TGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTATAAGGCTTCTCTCTGGAATCTTCTTCATCATC	599
C Q L L T G L Y F I G F P S G I F F I I	199
CTCCTGACAAATCGATAGGTACCTGGCTGTCTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAGCCAGG	659
L L T I D R Y L A V V H A V P A L K A R	219
ACGGTCACTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTTCGCTCT	719
T V T F G V V T S V I T W V V A V P A S	239
CTCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCT	779
L P G I I F T R S Q X E G L E Y T C S S	259
CATTTTCCATACATTAAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCTCTGCGCTGCTGTGATGGT	839
H F P Y I K D S H L G A G P A A A C H G	279

SEQ ID NO.3

FIG.1d

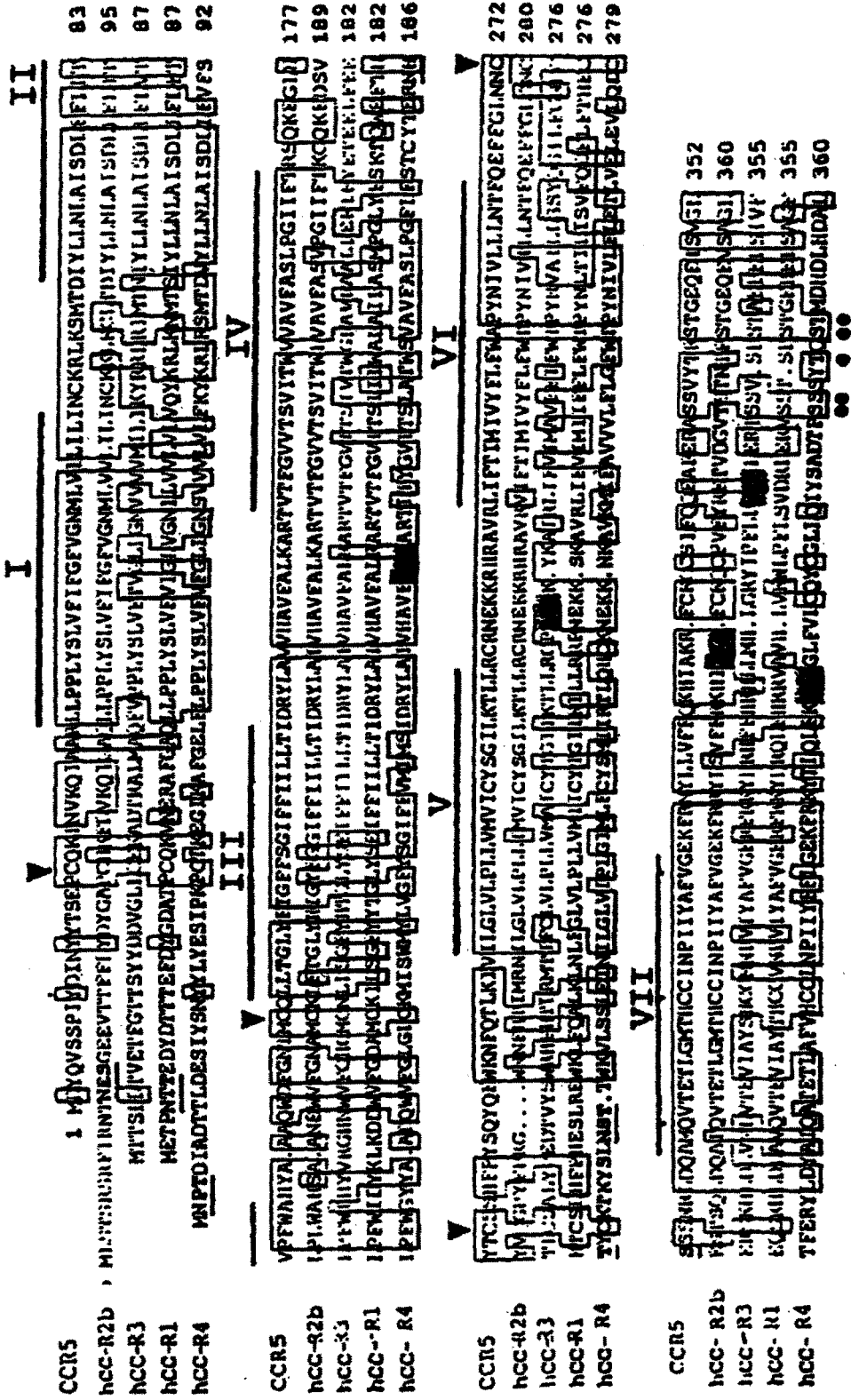
ES 2 325 073 T3

CATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAACTCTGCTTCGGTGTGAAATGAGAAGAGAGGGCA	899
H L L L G N P K N S A S V S K *	299
CAGGGCTGTGAGGCTTATCTTCACCATCATGATTGTTATTTTCTCTTCGGGGCTCCCTA	959
	319
CAACATTGTTCCTTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAG	1019
	339
CTCTAACAGGTTGGACCAAGCTATGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGACGCACCTGCTG	1079
	359
CATCAACCCCATCATCTATGCCTTTGTGGGGAGAAGTTCAGAACTACCTCTTAGTCTT	1139
	379
CTTCCAAAAGCACAATTGCCAAACGCTTCTGCAATGCTGTTCTATTTTCCAGCAAGAGGC	1199
	399
TCCCGAGCGAGCAAGCTCAFTTTACACCCGATCCACTGGGGAGCAGGAATATCTGTGGG	1259
	419
CTTGTGACACGGACTCAAGTGGGCTGGTGACCCAGTCAGAGTTGTGCACATGGCTTAGTT	1319
	439
TTCAIACAAGCCTGGGCTGGGGGTGGTTGGNNGAGGTCTTTTTTAAAAGGAAGTACT	1379
	459
GTEATAGAGGGTCTAAGATTCATCCATTAATTGGCATCTGTTTAAAGTAGATTAGATCC	1439
	479
GAATTC	

SEQ ID NO.3 (SUITE)

FIG.1e

FIG. 2



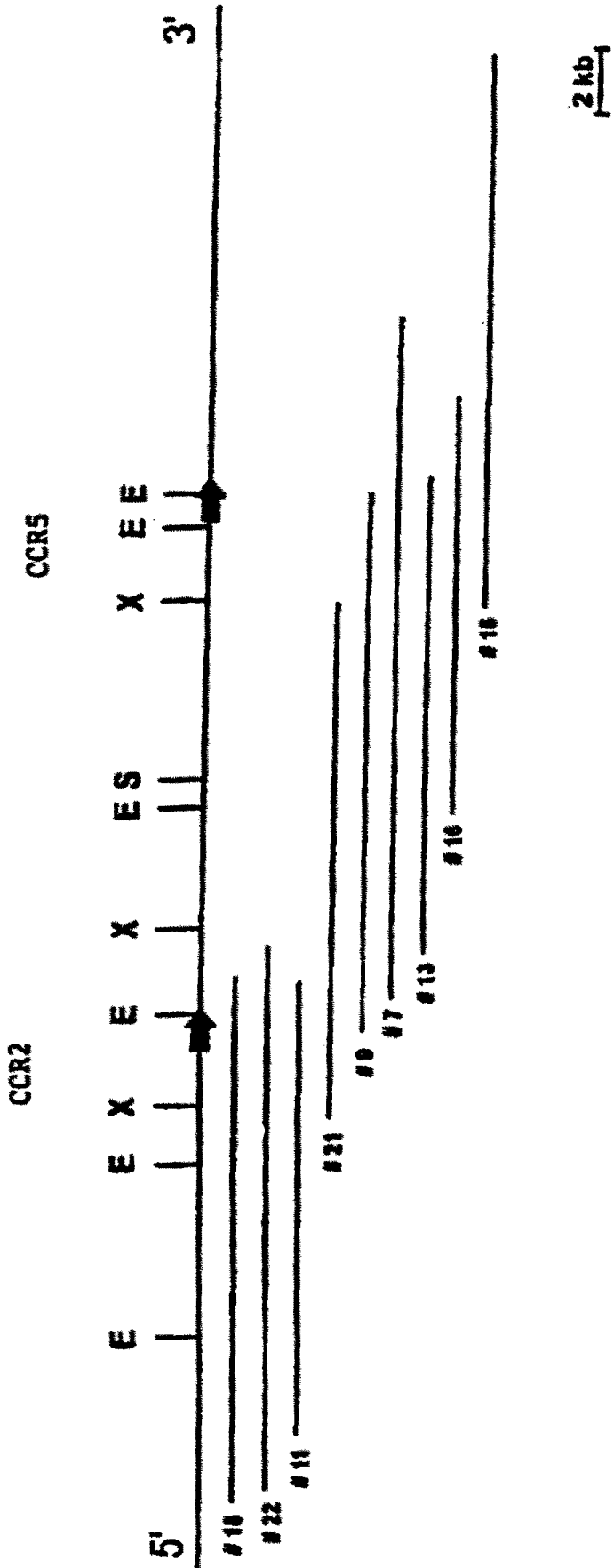


FIG. 3

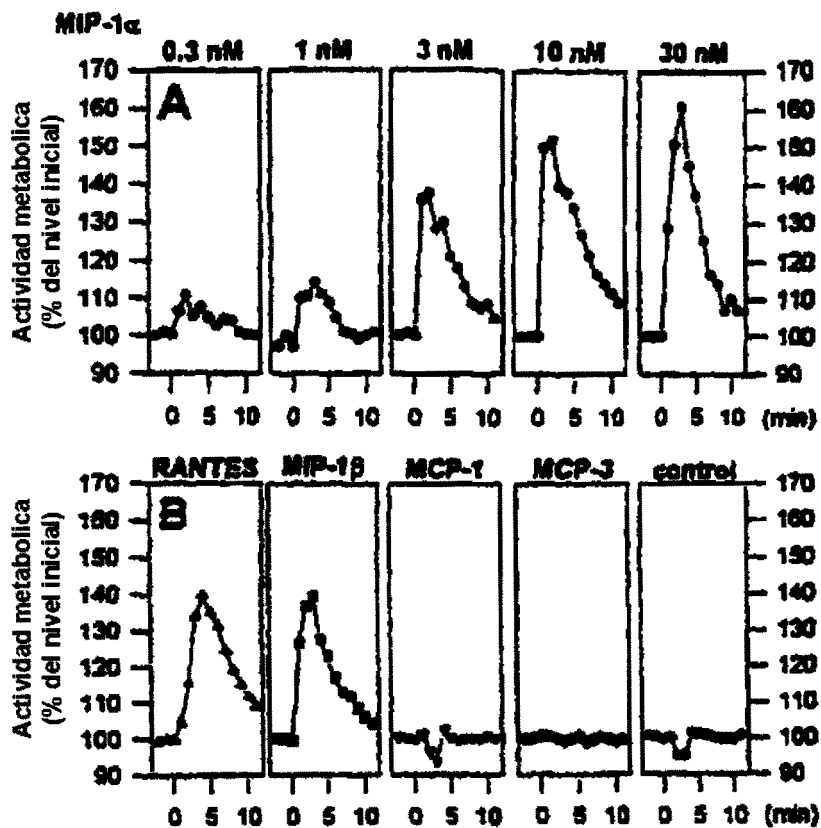


FIG. 4a

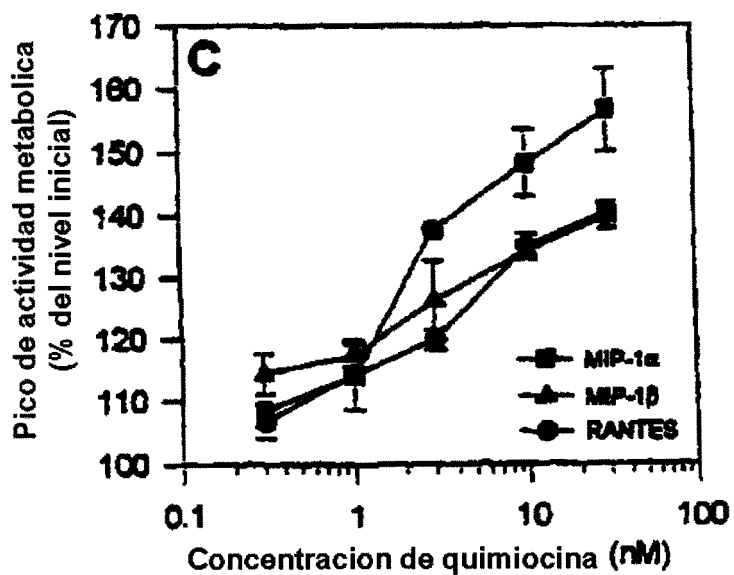


FIG. 4b

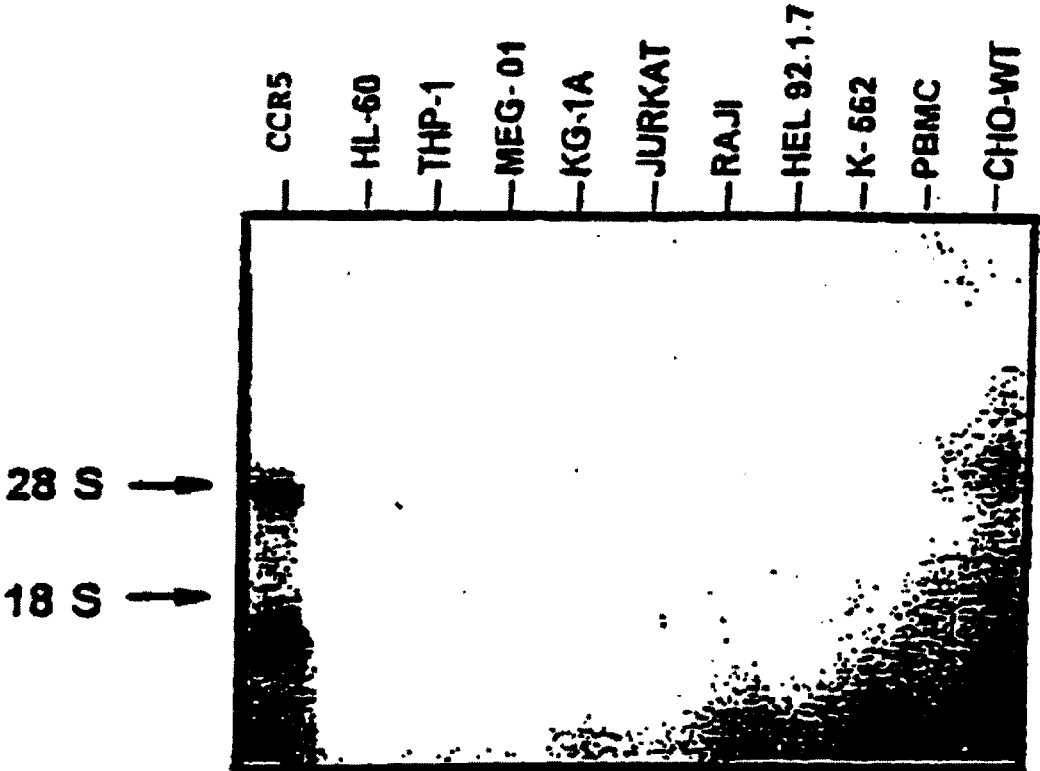
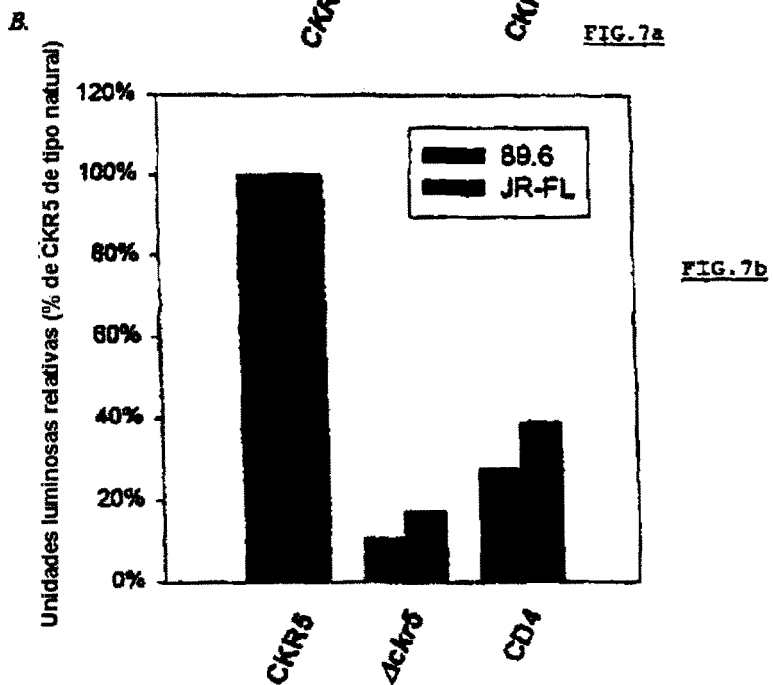
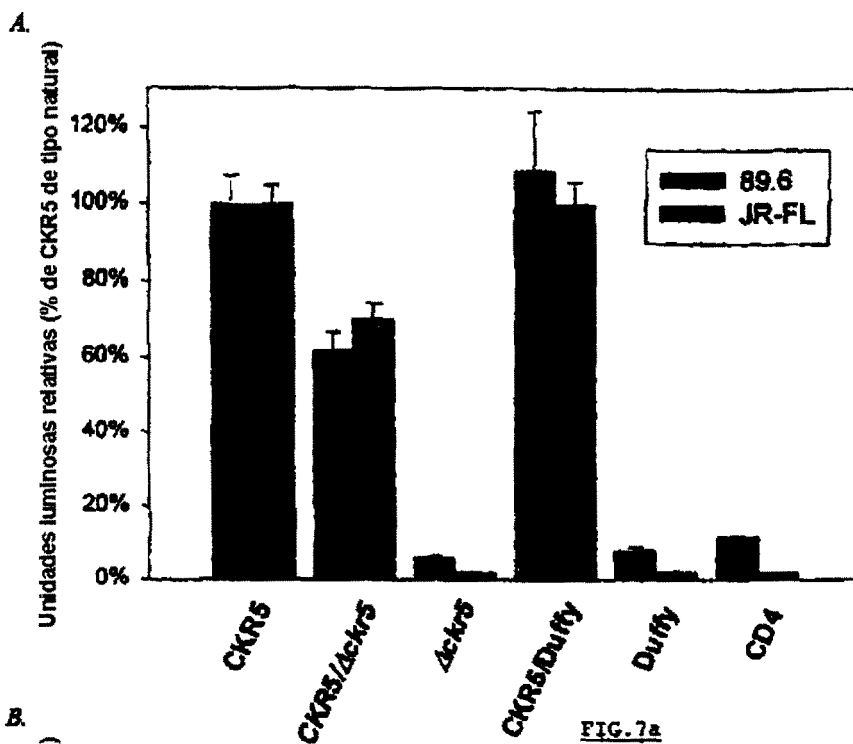


FIG. 5



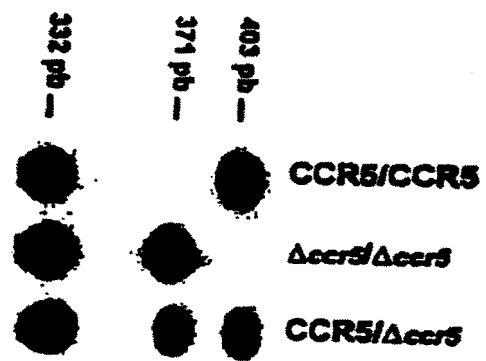


FIG. 8

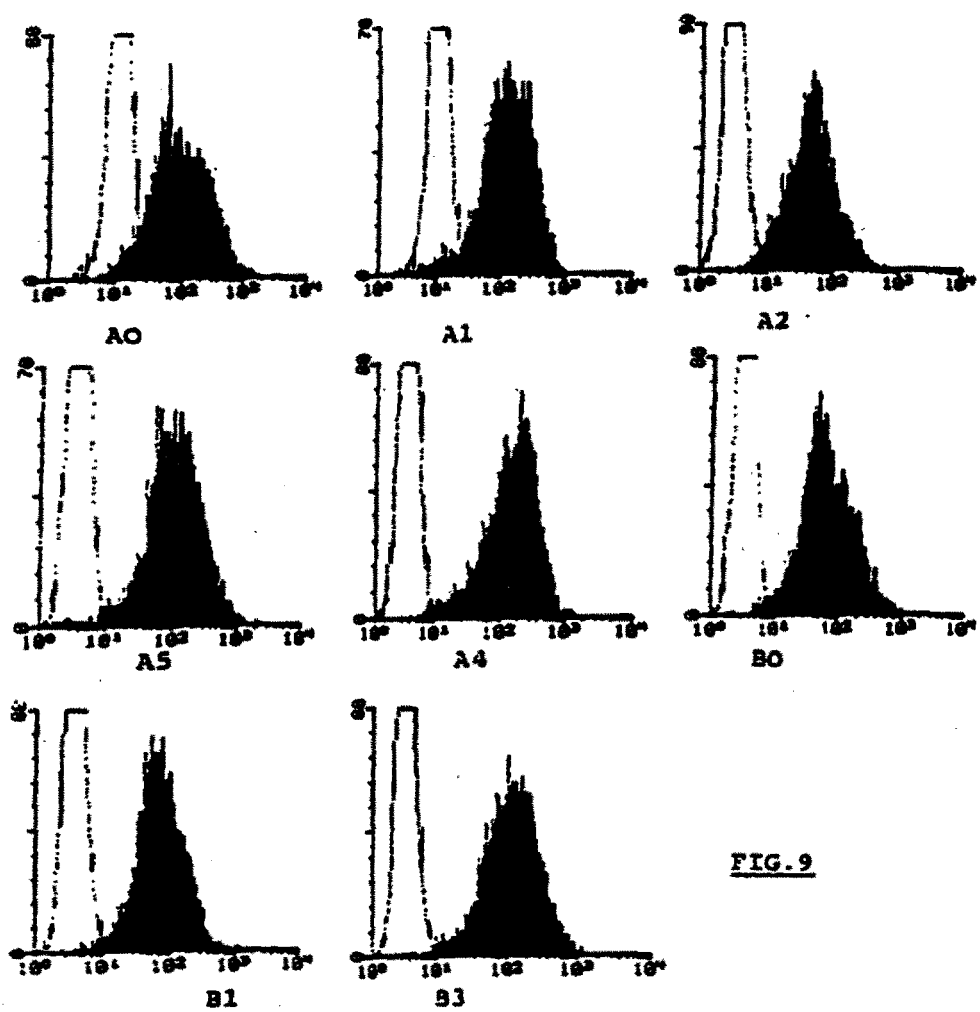


FIG. 9

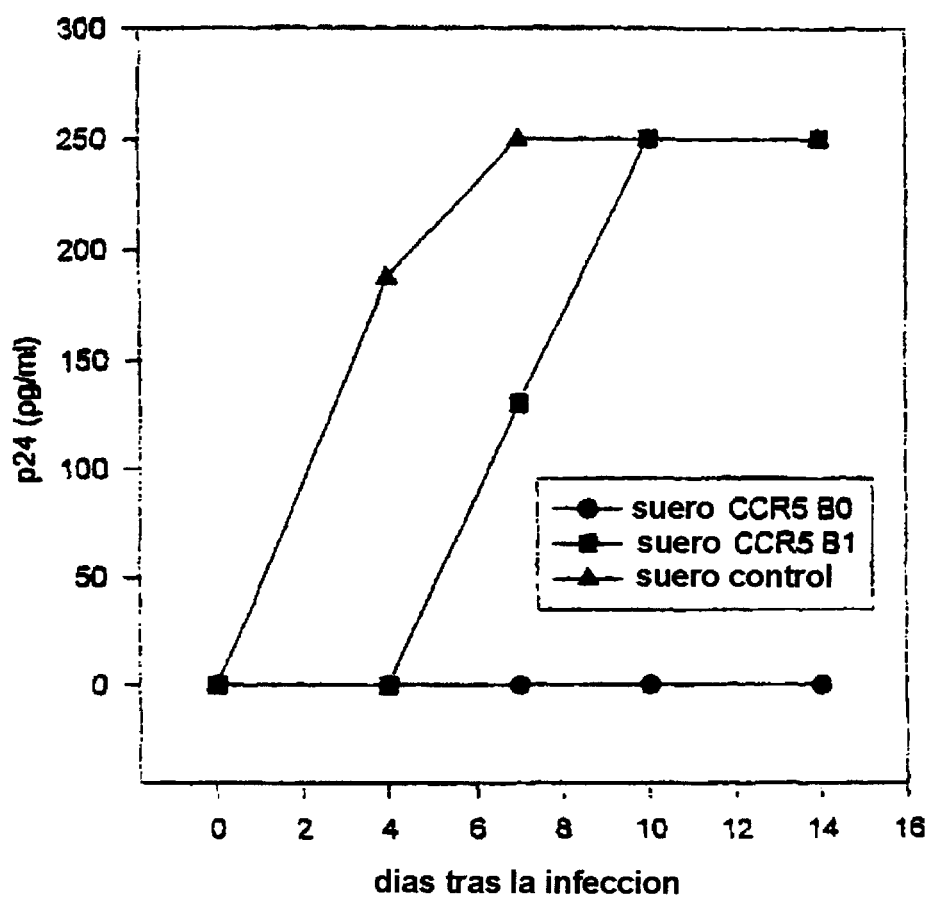


FIG.10

ES 2 325 073 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Euroscreen SA
- 5 <120> C-C CRK-5, receptor de quimiocinas CC, derivados del mismo y sus usos
- <130> EUR-014-EP-DIV2
- 10 <150> 97904948.3
<151> 08-02-1997
- <160> 18
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 792
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1
- ```
gaattccccc aacagagcca agctctccat ctagtggaca gggagctag cagcaaacct 60
tcccttcaact acaaaacttc attgcttggc caaaaagaga gttaattcaa tgtagacatc 120
tatgtaggca attaaaaacc tattgatgta taaaacagtt tgcattcatg gagggcaact 180
aaatacattc taggacttta taaaagatca ctttttattt atgcacaggg tggacaaga 240
tggattatca agtgtcaagt ccaatctatg acatcaatta ttatacatcg gagccctgcc 300
aaaaaatcaa tgtgaagcaa atcgcagccc gcctcctgcc tccgctctac tcaactggtg 360
tcactcttgg ttttgtgggc aacatgctgg tcctcctcat cctgataaac tgcaaaaggc 420
tgaagagcat gactgacatc tacctgctca acctggccat ctctgacctg ttttcccttc 480
ttactgtccc cttctgggct cactatgctg ccgccagtg ggactttgga aatacaatgt 540
gtcaactctt gacagggtc tatttatag gcttctctc tggaatcttc tcatcatcc 600
tcctgacaat cgataggtac ctggctgtcg tccatgctgt gtttgcctta aaagccagga 660
cggtcacctt tggggtggtg acaagtgtga tcacttgggt ggtggctgtg tttgcgtctc 720
tcccaggaat catctttacc agatctcaa aagaaggctc tcattacacc tgcagctctc 780
atcttcata ca 792
```
- <210> 2
- <211> 1477
- 55 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- <220>
- 60 <221> característica miscelánea  
<222> (1377)...(1377)  
<223> Cualquier nucleótido
- 65 <220>  
<221> característica miscelánea

## ES 2 325 073 T3

<222> (1384)...(1385)

<223> Cualquier nucleótido

5 <400> 2

```

gaattcccc aacagagcca agctctccat ctagtggaca gggaaagctag cagcaaacct 60
tcccttcact acaaaacttc attgcttggc caaaaagaga gttaattcaa tgtagacatc 120
10 tatgtaggca attaaaaacc tattgatgta taaaacagtt tgcattcatg gagggcaact 180
aaatacattc taggacttta taaaagatca ctttttattt atgcacaggg tggaaacaaga 240
tggattatca agtgtcaagt ccaatctatg acatcaatta ttatacatcg gagccctgcc 300
15 aaaaaatcaa tgtgaagcaa atcgcagccc gcctcctgcc tccgctctac tactggtgt 360
tcactcttgg ttttgtgggc aacatgctgg tcactcctcat cctgataaac tgcaaaaggc 420
tgaagagcat gactgacatc tacctgctca acctggccat ctctgacctg ttttctctc 480
20 ttactgtccc cttctgggct cactatgctg ccgcccagtg ggactttgga aatacaatgt 540
gtcaactctt gacagggctc tattttatag gcttctctc tggaatcttc ttcatcatcc 600
tcctgacaat cgataggtac ctggctgctg tccatgctgt gtttgctta aaagccagga 660
25 cggtcacctt tgggggtggg acaagtgtga tcacttgggt ggtggctgtg tttgcgtctc 720
tcccaggaat catctttacc agatctcaa aagaaggtct tcattacacc tgcagctctc 780
attttccata cagtcagtat caattctgga agaatttcca gacattaaag atagtcatct 840
30 tggggctggg cctgcccgtg cttgtcatgg tcactctgcta ctgggaatc ctaaaaactc 900
tgcttcggtg tcgaaatgag aagaagaggc acagggctgt gaggcttatc ttcaccatca 960
tgattgttta ttttctcttc tgggctccct acaacattgt ctttctctg aacaccttc 1020
35 aggaattctt tggcctgaat aattgcagta gctctaacag gttggaccaa gctatgcagg 1080
tgacagagac tcttgggatg acgcactgct gcatcaacc catcatctat gcctttgtcg 1140
gggagaagtt cagaaactac ctcttagtct tcttccaaa gcacattgcc aaacgcttct 1200
40 gcaaatgctg ttctattttc cagcaagagg ctcccagcg agcaagctca gtttacacc 1260
gatccactgg ggagcaggaa atatctgtgg gcttgtgaca cggactcaag tgggctggg 1320
accagtcag agttgtgcac atggcttagt tttcatacac agcctgggct gggggtnngt 1380
45 tgnngagggt cttttttaa aggaagttac tgttatagag ggtctaagat tcatccattt 1440
atttggcatc tgtttaaagt agattagatc cgaattc 1477

```

50 <210> 3

<211> 1475

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

55

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1345)...(1345)

60

<223> Cualquier nucleótido

<220>

<221> característica miscelánea

65

<222> (1352)...(1353)

<223> Cualquier nucleótido



ES 2 325 073 T3

<400> 4

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

45 <210> 5

<211> 352

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 325 073 T3

<400> 5

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

55

60

65

ES 2 325 073 T3

Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile  
 225 230 235 240  
 5 Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu  
 245 250 255  
 10 Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser  
 260 265 270  
 15 Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr  
 275 280 285  
 20 His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe  
 290 295 300  
 25 Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe  
 305 310 315 320  
 30 Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser  
 325 330 335  
 35 Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu  
 340 345 350  
 <210> 6  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6  
 40 Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr  
 1 5 10 15  
 45 Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu  
 20 25 30  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 325 073 T3

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

<210> 7

45 <211> 360

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 7

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

ES 2 325 073 T3

Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr  
 65 70 75 80  
 5 Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro  
 85 90 95  
 Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met  
 100 105 110  
 10 Cys Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile  
 115 120 125  
 15 Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His  
 130 135 140  
 Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr  
 145 150 155 160  
 20 Ser Val Ile Thr Trp Leu Val Ala Val Phe Ala Ser Val Pro Gly Ile  
 165 170 175  
 25 Ile Phe Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro  
 180 185 190  
 Tyr Phe Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg Asn Ile  
 195 200 205  
 30 Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly  
 210 215 220  
 35 Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg  
 225 230 235 240  
 40 Ala Val Arg Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp  
 245 250 255  
 45 Thr Pro Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe  
 260 265 270  
 50 Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln  
 275 280 285  
 Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile  
 290 295 300  
 55 Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu Ser Val Phe Phe  
 305 310 315 320  
 60 Arg Lys His Ile Thr Lys Arg Phe Cys Lys Gln Cys Pro Val Phe Tyr  
 325 330 335  
 Arg Glu Thr Val Asp Gly Val Thr Ser Thr Asn Ile Pro Ser Thr Gly  
 340 345 350  
 65 Glu Gln Glu Val Ser Ala Gly Leu  
 355 360

ES 2 325 073 T3

<210> 8

<211> 355

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

10 Met Thr Thr Ser Leu Asp Thr Val Glu Thr Phe Gly Thr Thr Ser Tyr  
1 5 10 15

15 Tyr Asp Asp Val Gly Leu Leu Cys Glu Lys Ala Asp Thr Arg Ala Leu  
20 25 30

20 Met Ala Gln Phe Val Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Thr Val Gly  
35 40 45

25 Leu Ile Gly Asn Val Val Val Val Met Ile Leu Ile Lys Tyr Arg Arg  
50 55 60

30 Leu Arg Ile Met Thr Asn Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp  
65 70 75 80

35 Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly  
85 90 95

40 His Asn Trp Val Phe Gly His Gly Met Cys Asn Leu Leu Ser Gly Phe  
100 105 110

45 Tyr His Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr  
115 120 125

50 Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala  
130 135 140

55 Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Val Thr Trp Gly Leu  
145 150 155 160

60 Ala Val Leu Ala Ala Leu Pro Glu Phe Ile Phe Tyr Glu Thr Glu Glu  
165 170 175

65 Leu Phe Glu Glu Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Pro Glu Asp Thr Val  
180 185 190

70 Tyr Ser Trp Arg His Phe His Thr Leu Arg Met Thr Ile Phe Cys Leu  
195 200 205

75 Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys  
210 215 220

80 Thr Leu Leu Arg Cys Pro Ser Lys Lys Lys Tyr Lys Ala Ile Arg Leu  
225 230 235 240

85 Ile Phe Val Ile Met Ala Val Phe Phe Ile Phe Trp Thr Pro Tyr Asn  
245 250 255

ES 2 325 073 T3

Val Ala Ile Leu Leu Ser Ser Tyr Gln Ser Ile Leu Phe Gly Asn Asp  
 260 265 270  
 5 Cys Glu Arg Ser Lys His Leu Asp Leu Val Met Leu Val Thr Glu Val  
 275 280 285  
 10 Ile Ala Tyr Ser His Cys Cys Met Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val  
 290 295 300  
 15 Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg His Phe Phe His Arg His Leu  
 305 310 315 320  
 20 Leu Met His Leu Gly Arg Tyr Ile Pro Phe Leu Pro Ser Glu Lys Leu  
 325 330 335  
 25 Glu Arg Thr Ser Ser Val Ser Pro Ser Thr Ala Glu Pro Glu Leu Ser  
 340 345 350  
 Ile Val Phe  
 355  
 <210> 9  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 30 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 9  
 35 Met Glu Thr Pro Asn Thr Thr Glu Asp Tyr Asp Thr Thr Thr Glu Phe  
 1 5 10  
 Asp Tyr Gly Asp Ala Thr Pro Cys Gln Lys Val Asn Glu Arg Ala Phe  
 20 25 30  
 40 Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Val Ile Gly  
 35 40 45  
 Leu Val Gly Asn Ile Leu Val Val Leu Val Leu Val Gln Tyr Lys Arg  
 50 55 60  
 Leu Lys Asn Met Thr Ser Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp  
 65 70 75 80  
 50 Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro Phe Trp Ile Asp Tyr Lys Leu Lys  
 85 90 95  
 55 Asp Asp Trp Val Phe Gly Asp Ala Met Cys Lys Ile Leu Ser Gly Phe  
 100 105 110  
 60 Tyr Tyr Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr  
 115 120 125  
 65 Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala  
 130 135 140  
 Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Ile Ile Trp Ala Leu  
 145 150 155 160

ES 2 325 073 T3

Ala Ile Leu Ala Ser Met Pro Gly Leu Tyr Phe Ser Lys Thr Gln Trp  
 165 170 175

5 Glu Phe Thr His His Thr Cys Ser Leu His Phe Pro His Glu Ser Leu  
 180 185 190

10 Arg Glu Trp Lys Leu Phe Gln Ala Leu Lys Leu Asn Leu Phe Gly Leu  
 195 200 205

15 Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ile Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys  
 210 215 220

20 Ile Leu Leu Arg Arg Pro Asn Glu Lys Lys Ser Lys Ala Val Arg Leu  
 225 230 235 240

25 Ile Phe Val Ile Met Ile Ile Phe Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn  
 245 250 255

30 Leu Thr Ile Leu Ile Ser Val Phe Gln Asp Phe Leu Phe Thr His Glu  
 260 265 270

35 Cys Glu Gln Ser Arg His Leu Asp Leu Ala Val Gln Val Thr Glu Val  
 275 280 285

40 Ile Ala Tyr Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val  
 290 295 300

45 Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe His Arg Arg Val  
 305 310 315 320

50 Ala Val His Leu Val Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp Arg Leu  
 325 330 335

55 Glu Arg Val Ser Ser Thr Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu Leu Ser  
 340 345 350

Ala Gly Phe  
 355

<210> 10  
 <211> 360  
 50 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

55 Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr  
 1 5 10 15

60 Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu  
 20 25 30

65 Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu  
 35 40 45

ES 2 325 073 T3

Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu  
 50 55 60  
 5 Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn  
 65 70 75 80  
 10 Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly  
 85 90 95  
 15 Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Ile Cys Lys Met  
 100 105 110  
 20 Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val  
 115 120 125  
 25 Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe  
 130 135 140  
 30 Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala  
 145 150 155 160  
 35 Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser  
 165 170 175  
 40 Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser  
 180 185 190  
 45 Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile  
 195 200 205  
 50 Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met  
 210 215 220  
 55 Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala  
 225 230 235 240  
 60 Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr  
 245 250 255  
 65 Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val  
 260 265 270  
 70 Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala  
 275 280 285  
 75 Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr  
 290 295 300  
 80 Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys  
 305 310 315 320  
 85 Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln  
 325 330 335

ES 2 325 073 T3

Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met  
 340 345 350

5 Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu  
 355 360

<210> 11

<211> 49

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

15 Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn Phe Gln Thr Leu Lys  
 1 5 10 15

20 Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu Val Met Val Ile Cys  
 20 25 30

Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys  
 35 40 45

25

Arg

<210> 12

<211> 147

30 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

35 tttccataca gtcagtatca attctggaag aatttccaga cattaagat agtcatcttg 60  
 gggctgggcc tgccgctgct tgatcatggc atctgctact cgggaatcct aaaaactctg 120  
 40 cttcgggtgc gaaatgagaa gaagagg 147

<210> 13

<211> 34

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

50 Phe Pro Tyr Ile Lys Asp Ser His Leu Gly Ala Gly Pro Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Cys His Gly His Leu Leu Leu Gly Asn Pro Lys Asn Ser Ala Ser Val  
 20 25 30

55

Ser Lys

<210> 14

60 <211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

65 <220>

<213> Secuencia artificial

ES 2 325 073 T3

<400> 14

**tcgaggatcc aagatggatt atcaagt 27**

5 <210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<213> Secuencia artificial

15 <400> 15

**ctgatctaga gccatgtgca caactct 27**

<210> 16

20

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<213> Secuencia artificial

30 <400> 16

**cctggctgtc gtccatgctg 20**

<210> 17

35

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<213> Secuencia artificial

<400> 17

45

**ctgatctaga gccatgtgca caactct 27**

<210> 18

<211> 215

50

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

55

**Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr**  
**1 5 10 15**

60

**Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu**  
**20 25 30**

65

ES 2 325 073 T3

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