



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 335**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04802145 .5**

96 Fecha de presentación : **24.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1701611**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2006**

54 Título: **Mamífero no humano transgénico que comprende un polinucleótido que codifica el C5aR humano o humanizado.**

30 Prioridad: **24.12.2003 AU 2003907150**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.08.2011

73 Titular/es: **G2 INFLAMMATION Pty. Ltd.**
Level 10, 384 Victoria Street
Darlinghurst NSW 2010, AU

72 Inventor/es: **Mackay, Charles, Reay**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Mamífero no humano transgénico que comprende un polinucleótido que codifica el C5aR humano o humanizado.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a mamíferos no humanos transgénicos que comprenden un polinucleótido que codifica un C5aR humano o humanizado. La invención también se refiere al uso de los mamíferos no humanos transgénicos en métodos de cribado de agonistas, agonistas inversos y antagonistas del C5aR humano y para analizar la eficacia de agonistas, agonistas inversos y antagonistas del C5aR en diversos modelos de enfermedad en animales.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

La proteólisis de cada una de las proteínas del complemento C3-C5 da lugar a fragmentos catiónicos aminoterminales con moléculas de señalización denominadas anafilatoxinas. La más potente de estas, la C5a, provoca las respuestas más amplias. Considerando los componentes de la respuesta inflamatoria como marginación e infiltración de leucocitos, liberación de enzimas proteolíticas unidas a gránulos, producción de radicales activados derivados de oxígeno y nitrógeno, cambios en el flujo sanguíneo y fugas por capilares, junto con la capacidad para contraer la musculatura lisa, la molécula C5a es el mediador pro-inflamatorio "completo". A niveles sub-nanomolares a nanomolares, la molécula C5a provoca quimiotaxis de todos los linajes mieloides (neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos y monocitos), y causa permeabilidad vascular que está potenciada marcadamente por las prostaglandinas y los leucocitos circulantes. Las concentraciones nanomolares superiores provocan la desgranulación y activación de la NADPH-oxidas. Esta amplitud de bioactividad contrasta con otros mediadores inflamatorios. La C5a ha sido implicada en la patogénesis de artritis reumatoide, psoriasis, septicemia, lesión por repercusión y síndrome de dificultad respiratoria en adultos.

Las actividades de la C5a están mediadas por la unión de la C5a a su receptor (C5aR). El C5aR pertenece a la familia de siete receptores transmembranales acoplados a la proteína G. El C5aR es un receptor de alta afinidad para la C5a, con un Kd de ~1 nM, y está situado en varios tipos diferentes de células incluyendo los leucocitos. El número de receptores por célula es extremadamente alto, hasta 200.000 sitios por leucocito. La activación biológica del receptor ocurre en todo el intervalo que satura la unión.

El C5aR comprende un dominio extracelular N-terminal extendido. Este dominio N-terminal grande es típico de los receptores acoplados a la proteína G que se unen a péptidos incluyendo las familias de receptores de la IL-8 y fMet-Leu-Phe (FMLP). La estructura del C5aR se ajusta a la familia de los siete receptores transmembranales, estando seguido el término N extracelular por siete hélices transmembranales conectadas por dominios interhelicoidales que alternan como bucles intracelulares y extracelulares y terminan con un dominio intracelular C-terminal.

Los agonistas del C5aR son útiles para fines terapéuticos, por ejemplo, en defensa contra infecciones bacterianas para estimular los efectos inmunorreguladores de la C5a, y para tratar cánceres, enfermedades de inmunodeficiencia e infecciones graves.

Los antagonistas del C5aR también son agentes terapéuticos útiles, por ejemplo, para tratar enfermedades inflamatorias y trastornos autoinmunitarios. Por ejemplo, los antagonistas del C5aR son útiles en el tratamiento de asma, bronquitis alérgica, inflamación crónica, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, artritis reumatoide, osteoartritis, gota, algunas enfermedades autoalérgicas, rechazo de trasplantes, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, colitis ulcerosa), en ciertos estados de choque, infarto de miocardio y encefalopatías pos-virales. Para este fin, se han descrito previamente antagonistas del péptido C5aR y anticuerpos anti-receptor de la C5a. Por ejemplo, el documento WO95/00164 describe anticuerpos dirigidos contra un péptido N-terminal (residuos 9-29) del receptor de la C5a.

Actualmente, son deseables agonistas y antagonistas del C5aR alternativos y/o mejorados, puesto que son métodos mejorados de cribados para agonistas y antagonistas del C5aR.

Se conocen en la técnica métodos de cribado *in vitro* para la detección de agonistas/antagonistas del C5aR. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de quimiotaxis para determinar la capacidad de un anticuerpo o su fragmento funcional de bloquear la unión de un ligando al C5aR y/o inhibir la función asociada con la unión del ligando al receptor. Estos ensayos están basados en la migración funcional de células *in vitro* inducida por un compuesto. La quimiotaxis se puede determinar por un medio adecuado, tal como en un ensayo que utiliza una placa de quimiotaxis de 96 pocillos o que usa otros métodos reconocidos en la técnica para determinar la quimiotaxis. Por ejemplo, el uso de un ensayo de quimiotaxis transendotelial *in vitro* está descrito por Springer et al., (Springer et al., documento WO 94/20142, publicado el 15 de septiembre de 1994; véase también Berman et al., *Immunol. Invest.* 17: 625-677 (1988)). También se ha descrito la migración a través del endotelio en geles de colágeno (Kavanaugh et al., *J. Immunol.*, 146: 4149-4156 (1991)).

MUKHERJEE P. ET AL: JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, 2000, vol. 105, n° 2, páginas 124-130, y MUKHERJEE P. ET AL: ABSTRACTS OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 26, n° 1/02, 4 November 2000, página 859.14, describen ratones con el gen C5aR desactivado.

GERARD N. P. ET AL: BIOCHEMISTRY, 1993, vol. 32, 1993, páginas 1243-1250, informan de la caracterización detallada del C5aR humano. Las construcciones recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica un C5aR humano y sus delecciones progresivas se transfectaron en diferentes cultivos de células de mamíferos humanos y no humanos, que expresan o no un C5aR endógeno, y proporcionan un sistema modelo *in vitro* para análisis del funcionamiento del gen del receptor de la C5a humana.

SUMICHIKA H: CURRENT OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS, 2004, vol. 5, n°. 5, páginas 505-510, describe el cribado farmacéutico de antagonistas del receptor C5aR humano para el tratamiento de inflamación usando un método de ensayo de unión a la C5a humana en membranas de neutrófilos humanos (es decir, *in vitro*). Se expone la selectividad para especies de los ligandos del C5aR.

Un requisito crítico en el proceso de descubrimiento de fármacos es la demostración en modelos relevantes en animales que los nuevos agentes terapéuticos identificados por métodos de cribado *in vitro* sean seguros y eficaces. Además, frecuentemente es deseable comparar la eficacia *in vivo* de numerosos agentes para seleccionar las propiedades deseables incluyendo las propiedades farmacocinéticas, la eficacia en afectar al resultado de la enfermedad y la falta de efectos secundarios adversos. Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de fármacos es pasar los fármacos candidatos desde los ensayos *in vitro* a la demostración de la eficacia *in vivo*. Frecuentemente esto se debe a que muchos fármacos candidatos son específicos de especies. Por ejemplo, un antagonista desarrollado para un receptor quimioatrayente humano, tal como el C5aR, podría antagonizar solamente al C5aR humano y no al C5aR de ratón, conejos o incluso primates superiores. La incapacidad de muchos fármacos candidatos de "trabajar" a través de especies es una razón principal para el desgaste en la fase preclínica.

Por tanto, son deseables métodos mejorados de cribado que permitan la identificación y/o el análisis de agonistas, agonistas inversos y antagonistas del C5aR humano en un ambiente *in vivo*.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han encontrado que cierto número de antagonistas del C5aR reaccionan con el C5aR humano, pero no lo hacen con el C5aR de otras especies. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales MAb 7F3, MAb 6C12 y MAb 12D4 (descritos en la solicitud de patente PCT/AU03/00084) se unen al C5aR humano pero no se unen al C5aR de ratón o babuino. Esto implica la necesidad de un sistema de cribado y validación *in vivo* que sea capaz de detectar y/o validar agonistas/antagonistas que sean específicos para el C5aR humano.

Los autores de la presente invención también han encontrado que la quimiotaxis de células de mórvidos manipuladas por ingeniería genética para expresar el C5aR humano es inhibida por anticuerpos anti-C5aR humano. Este hallazgo, asociado con el conocimiento de que la C5a de mórvidos se une al C5aR humano con alta afinidad, indica que el C5aR humano es compatible con la maquinaria de señalización del C5aR en otros sistemas de mamíferos. Los autores de la presente invención han desarrollado por tanto un mamífero no humano transgénico que expresa un C5aR humano y es útil para cribar o analizar agonistas/antagonistas del C5aR, particularmente los agonistas/antagonistas específicos para el C5aR humano.

En consecuencia en la presente memoria se describe un mamífero transgénico no humano que comprende un polinucleótido que codifica un C5aR humano o un C5aR humanizado.

En una realización, el polinucleótido codifica el C5aR humano. Preferiblemente, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia como la mostrada en la SEQ ID NO: 3 o una de sus variantes alélicas.

En otra realización, el polinucleótido comprende una secuencia como la mostrada en la SEQ ID NO: 2 o una de sus variantes alélicas.

En otra realización, el polinucleótido codifica C5aR humanizado. Por "C5aR humanizado" queremos significar un C5aR no humano que ha sido modificado para introducir o potenciar al menos una característica funcional del C5aR humano natural. Preferiblemente, el C5aR no humano es el C5aR endógeno para el mamífero transgénico.

Por ejemplo, la modificación puede alterar la especificidad de unión del C5aR no humano, de tal modo que el C5aR humanizado se una a uno o más ligandos, agonistas, agonistas inversos o antagonistas del C5aR humano. Alternativamente, la modificación puede potenciar la afinidad de unión del C5aR no humano a uno o más ligandos, agonistas, agonistas inversos o antagonistas del C5aR humano. En una realización preferida, la modificación potencia la afinidad de unión del C5aR no humano a uno o más ligandos, agonistas, agonistas inversos o antagonistas del C5aR humano al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces.

La modificación implica preferiblemente la sustitución de al menos un aminoácido del C5aR no humano por el correspondiente aminoácido del C5aR humano.

Preferiblemente, la modificación comprende reemplazar al menos un dominio o una parte sustancial del mismo por el correspondiente dominio del C5aR humano o una parte sustancial del mismo. Por ejemplo, la modificación puede comprender reemplazar al menos un dominio extracelular del C5aR endógeno por el correspondiente dominio extracelular del C5aR humano. El C5aR humanizado puede comprender por tanto al menos un dominio extracelular del

C5aR humano. En un ejemplo, el C5aR humanizado comprende dominios intracelulares del C5aR endógeno y dominio extracelulares del C5aR humano.

5 En una realización preferida el mamífero transgénico tiene células somáticas y de líneas germinales que contienen, en una forma establemente integrada, un polinucleótido que codifica el C5aR humano o humanizado. En otras palabras, se prefiere que el mamífero transgénico sea uno "con el gen activado" para el C5aR humano o humanizado. Se apreciará que esto se puede conseguir, por ejemplo, introduciendo una construcción de polinucleótido que codifica el C5aR humano o una construcción de polinucleótido que codifica el C5aR humanizado en el genoma de un mamífero por integración dirigida a la diana en el genoma del mamífero.

10 Alternativamente, una construcción de polinucleótido que codifica un fragmento del C5aR humano puede ser integrado dentro de la secuencia del C5aR endógeno, de tal modo que después de la integración, el sitio del C5aR endógeno comprenda el polinucleótido que codifica el C5aR humanizado.

En otra realización preferida, el mamífero transgénico es homocigótico para el C5aR humano o humanizado.

15 En una realización preferida adicional, la expresión del C5aR endógeno en el animal transgénico es indetectable o insignificante. La reducción en la expresión del C5aR endógeno se puede conseguir por un medio adecuado. Por ejemplo, las células del mamífero transgénico pueden ser modificadas de modo que expresen un ácido nucleico antisentido complementario a los ácidos nucleicos que codifican el C5aR endógeno. Alternativamente, el gen del C5aR endógeno puede estar interrumpido por recombinación homóloga. Preferiblemente, el mamífero transgénico es un mamífero homocigótico con el gen desactivado ("*knock-out*") para el C5aR endógeno.

20 En una realización preferida, la "desactivación" del C5aR endógeno ocurre simultáneamente con la introducción del C5aR humano o humanizado. Esto se consigue preferiblemente reemplazando la secuencia que codifica el C5aR endógeno o uno de sus fragmentos por una secuencia correspondiente que codifica el C5aR humano o uno de sus fragmentos por medio de recombinación homóloga dirigida a la diana. En una realización particular, uno o más de los dominios del C5aR endógeno es reemplazado por el(los) correspondiente(s) dominio(s) humano(s).

25 Los animales transgénicos descritos en la presente memoria pueden comprender otras alteraciones genéticas además de la presencia de una secuencia que codifica el C5aR humano. Por ejemplo, el genoma del animal transgénico puede ser alterado para afectar a la función de genes endógenos, contener genes marcadores u otras alteraciones genéticas específicas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

30 En otra realización preferida, el mamífero transgénico no humano se selecciona del grupo que comprende vaca, cerdo, cabra, oveja, camello, caballo, gato, perro, mono, babuino, conejo, cobaya, rata, hámster y ratón. Los roedores tales como ratas, ratones y hámsteres son los mamíferos preferidos. Preferiblemente, el mamífero transgénico es un ratón.

También se describen un tejido aislado, órgano aislado, célula(s) aisladas, cultivo celular primario o línea celular establecida obtenidos del mamífero no humano transgénico de la invención. Los órganos o tejidos preferidos incluyen musculatura lisa, tejido endotelial, musculatura contráctil y corazón.

35 También se describe en la presente memoria un método para producir un mamífero no humano transgénico, que comprende introducir en el genoma de un mamífero no humano una construcción de polinucleótido que codifica C5aR humano, C5aR humanizado o un fragmento de C5aR humano, para producir un mamífero no humano transgénico.

40 En una realización, la construcción del polinucleótido codifica C5aR humano. Preferiblemente, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia como la mostrada en la SEQ ID NO:3 o una de sus variantes alélicas.

En otra realización, la construcción del polinucleótido comprende una secuencia como la mostrada en la SEQ ID NO:2 o una de sus variantes alélicas.

En otra realización, la construcción del polinucleótido codifica C5aR humanizado.

45 Otra descripción en la presente memoria es la construcción del polinucleótido que codifica un fragmento de C5aR humano. Preferiblemente, el fragmento abarca al menos un dominio del C5aR humano o una parte del mismo.

En una realización preferida, el fragmento abarca al menos uno de los dominios enumerados en la Tabla 1. En una realización particular, el fragmento abarca al menos un dominio extracelular del C5aR humano. En otra realización, el fragmento abarca dos o más de los dominios enumerados en la Tabla 1.

50 En otra realización preferida, el método comprende además interrumpir el C5aR endógeno del mamífero no humano. Preferiblemente, el mamífero transgénico es un mamífero homocigótico con el gen C5aR endógeno desactivado.

En una realización preferida, el método comprende reemplazar la secuencia que codifica el C5aR endógeno o uno

de sus fragmentos por una secuencia que codifica el C5aR humano correspondiente o uno de sus fragmentos por medio de una recombinación homóloga dirigida. En una realización particular, el método comprende reemplazar uno o más de los dominios del C5aR endógeno por el(los) dominio(s) humano(s) correspondiente(s).

5 En otra realización preferida, la construcción del polinucleótido comprende un marcador seleccionable. Se puede usar cualquier marcador seleccionable, aunque un marcador seleccionable preferido es el gen PGK-neo. Preferiblemente, el marcador seleccionable está flanqueado por sitios loxP de modo que el marcador seleccionable pueda ser eliminado después de su actuación como diana por la expresión transitoria de la Cre-recombinasa.

10 En otra realización preferida, la construcción del polinucleótido comprende regiones homólogas a las secuencias 3' y 5' que flanquean la secuencia codificadora del C5aR endógeno del mamífero no humano. Preferiblemente, la construcción del polinucleótido comprende regiones homólogas en al menos 2 kb, más preferiblemente alrededor de 3 kb, hacia el extremo 5' y hacia el extremo 3' del exón 3 del gen C5aR endógeno.

15 Se apreciará que los mamíferos transgénicos descritos en la presente memoria serán útiles en la identificación, evaluación o validación de nuevos agonistas, agonistas inversos y antagonistas del C5aR. Por ejemplo, los mamíferos transgénicos se pueden usar para cribar cierto número de compuestos candidatos para identificar agonistas, agonistas inversos o antagonistas de la función del C5aR humano. Los mamíferos transgénicos se pueden usar también para evaluar la idoneidad terapéutica de agonistas, agonistas inversos o antagonistas de la función del C5aR humano que previamente han sido identificados en los métodos de cribado.

20 Por consiguiente, también se describe en la presente memoria un método para evaluar al menos un efecto farmacocinético y/o farmacodinámico de un compuesto candidato, que comprende administrar un compuesto candidato a un mamífero transgénico de la presente invención o a un tejido o células aislados del mismo y examinar al menos un

efecto farmacocinético y/o farmacodinámico del compuesto candidato en el mamífero transgénico.

En una realización preferida, al menos uno de los efectos farmacocinéticos examinados es un parámetro de absorción, un parámetro de distribución, un parámetro de metabolismo o un parámetro de excreción.

25 Por ejemplo, al menos uno de los efectos farmacocinéticos examinados puede ser volumen de distribución, depuración total, unión a proteínas, unión a tejidos, depuración metabólica, depuración renal, depuración hepática, depuración biliar, absorción intestinal, biodisponibilidad, biodisponibilidad relativa, depuración intrínseca, tiempo medio de permanencia, tasa máxima de metabolismo, constante de Michaelis-Menten, coeficientes de reparto entre tejidos y sangre o plasma, fracción excretada inalterada en orina, fracción de fármaco convertido sistemáticamente en metabolitos, constante de la velocidad de eliminación, semi-vida o depuración de la secreción.

30 Para mayor claridad y permitir la comprensión del alcance completo de la presente invención, "efectos farmacocinéticos" se refiere al estudio de la cinética asociada a los procesos dinámicos de un parámetro, tal como absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de un compuesto candidato y/o sus metabolitos en un organismo vivo. Como se usa en el contexto de la presente invención, los siguientes términos farmacocinéticos han de ser entendidos en sentido amplio y tendrán sus significados generalmente aceptados tal como se exponen a continuación.

35 "Absorción" se refiere al proceso de captación de un compuesto candidato desde el sitio de administración a la circulación sistémica. La transferencia del compuesto candidato a través del lumen intestinal se denomina generalmente absorción oral, mientras que la transferencia del compuesto candidato a través de la barrera fisiológica externa se denomina absorción general. El parámetro farmacocinético absorción puede ser estimado a partir de datos de biosensores asociados a un chip sensor que tiene, por ejemplo, una pluralidad de liposomas apropiados inmovilizados en él.

40 "Distribución" se refiere a la transferencia de un compuesto candidato desde el sitio de administración a la circulación sistémica total y luego al agua extracelular e intracelular y a los tejidos. La distribución es usualmente un proceso rápido y reversible. El parámetro farmacocinético distribución puede ser estimado a partir de datos de biosensores asociados a un chip sensor que tiene, por ejemplo, una pluralidad de proteínas plasmáticas, liposomas y/o proteínas de transporte apropiadas inmovilizadas en él.

45 "Metabolismo" se refiere a la suma de todas las reacciones químicas para la biotransformación de sustancias endógenas y exógenas que tienen lugar en la célula viva. El parámetro farmacocinético metabolismo puede ser estimado a partir de datos de biosensores asociados con un chip de sensores que tiene, por ejemplo, una pluralidad de enzimas metabólicas apropiadas inmovilizadas en él.

50 "Excreción" se refiere a la eliminación o pérdida final de un fármaco del cuerpo. La excreción incluye tanto difusión pasiva como excreción mediada por un vehículo específico relativo. Los compuestos candidatos pueden ser excretados, inalterados o en forma de metabolitos, en la orina vía los riñones o en las heces vía las bilis y/o el intestino. Los compuestos volátiles se excretan frecuentemente en el aire expirado por los pulmones. El parámetro farmacocinético excreción puede ser estimado a partir de datos de biosensores asociados con un chip de sensores que tiene inmovilizado en él, por ejemplo, un anticuerpo que detecta específicamente el compuesto candidato, así como otros proteínas/receptores que tienen una alta afinidad/especificidad contra el fármaco candidato. Dichos anticuerpos y

proteínas/receptores se pueden usar para cuantificar la concentración/cantidad del fármaco en diferentes fluidos corporales (por ejemplo, orina/heces) y tejidos, usando un ensayo de unión directa.

En otra realización, el método implica examinar al menos un efecto farmacodinámico del compuesto candidato en el mamífero transgénico. Preferiblemente, al menos uno de los efectos farmacodinámicos es la modulación de la actividad del C5aR. Esto se puede determinar monitorizando al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR después de la administración del compuesto candidato.

Por consiguiente, también se describe en la presente memoria un método de identificar un compuesto que modula la actividad del C5aR, que comprende (i) administrar un compuesto candidato a un mamífero transgénico o tejido o células aislados obtenidos del mismo de la presente invención en condiciones en las cuales se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización del C5aR; y (ii) monitorizar el desarrollo de al menos un fenotipo después de la administración del compuesto.

En una realización preferida, el método comprende además (iii) comparar la extensión del fenotipo en el mamífero transgénico o células derivadas del mismo, a los cuales se administró el compuesto, con la de un mamífero de control o células derivadas del mismo, en donde una diferencia en la naturaleza o extensión del fenotipo cuando se compara con el mamífero de control indica el potencial del compuesto para modular la actividad del C5aR.

Una realización particular proporciona un método de identificar un compuesto que inhibe o reduce la actividad del C5aR, que comprende (i) administrar un compuesto candidato a un mamífero transgénico o tejido o células aislados obtenidos del mismo en condiciones en las cuales se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización del C5aR; y (ii) monitorizar el desarrollo de al menos un fenotipo después de la administración del compuesto, en donde una reducción o inhibición en la naturaleza o extensión del fenotipo después de la administración indica el potencial del compuesto para inhibir o reducir la actividad del C5aR. Preferiblemente, el método comprende además (iii) comparar la extensión del fenotipo en el mamífero transgénico, al cual se administró el compuesto, con la de un mamífero de control, en donde una reducción o inhibición en la naturaleza o extensión del fenotipo cuando se compara con el mamífero de control indica el potencial del compuesto para reducir o inhibir la actividad del C5aR.

Otra realización proporciona un método de identificar un compuesto que promueve o potencia la actividad del C5aR, que comprende (i) administrar un compuesto candidato a un mamífero transgénico o tejido o células aislados obtenidos del mismo en condiciones en las cuales se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización del C5aR; y (ii) monitorizar el desarrollo de al menos un fenotipo después de la administración del compuesto, en donde una potenciación en la naturaleza o extensión del fenotipo después de la administración indica el potencial del compuesto para promover o potenciar la actividad del C5aR. Preferiblemente, el método comprende además (iii) comparar la extensión del fenotipo en el mamífero transgénico, al cual se administró el compuesto, con la de un mamífero de control, en donde una potenciación en la naturaleza o extensión del fenotipo cuando se compara con el mamífero de control indica el potencial del compuesto para promover o potenciar la actividad del C5aR.

El animal de "control" empleado en este contexto puede ser cualquier otro mamífero que exprese los mismos indicadores fenotípicos que los expresados en el mamífero en el cual se analizó el compuesto (es decir, el mamífero de "ensayo").

En una realización, los animales de control y de ensayo expresan niveles similares de C5aR humano funcional. Por ejemplo, los animales de control y de ensayo pueden ser isogénicos.

En otra realización, el animal de control es un animal de tipo natural que no expresa el C5aR humano o humanizado.

La frase "fenotipo asociado con la señalización de C5aR" está destinada a abarcar una característica visible y/o un comportamiento (incluyendo un síntoma clínico de una enfermedad) que está asociado con un proceso bioquímico que implica señalización del C5aR. El fenotipo puede estar asociado con una señalización del C5aR normal o anómala. En una realización el fenotipo es un estado que está agravado por la señalización del C5aR, tal como un trastorno complejo inmunitario, una enfermedad inflamatoria o alérgica, rechazo de injerto o cáncer. En otra realización, el fenotipo es un estado que es aliviado o disminuido por el aumento de la señalización del C5aR, tal como un estado asociado a inmunosupresión.

En una realización particular, el fenotipo es inflamación. La inflamación puede ser inducida, por ejemplo, por transferencia de suero desde un mamífero KBxN artrítico a un mamífero transgénico de la descripción.

En otra realización el fenotipo es un daño del tejido inflamatorio, tal como una lesión por isquemia-reperfusión.

En otra realización, el fenotipo es infiltración de leucocitos.

En otra realización, el fenotipo es asma.

En otra realización, el fenotipo es septicemia, ictus o síndrome de dificultad respiratoria.

En otra realización, el fenotipo es un estado seleccionado del grupo que consiste en enfermedades y estados infla-

matorios o alérgicos, incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias, tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares alérgicas, neumonitis alérgica, enfermedades pulmonares intersticiales (ILD) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociadas a artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); respuestas de anafilaxis o alérgicas, alergias a fármacos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), alergias a picaduras de insectos; enfermedad intestinal inflamatoria, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; espondiloartropatías; escleroderma; psoriasis y dermatosis inflamatorias, tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica por contacto, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea y alérgica); enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes de tipo 1, nefritis, tales como glomerulonefritis, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet; rechazo de injerto (por ejemplo, en trasplante), incluyendo rechazo de aloinjerto o enfermedad del injerto contra el hospedante; aterosclerosis; cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos; lesión por reperfusión, ictus, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, ciertas enfermedades malignas hematológicas, toxicidad inducida por citoquinas (por ejemplo, choque séptico, choque endotóxico), polimiositis, dermatomiositis, pénfigo, enfermedad de Alzheimer, enfermedades granulomatosas incluyendo sarcoidosis, síndromes de inmunodeficiencia, tal como SIDA, radioterapia, quimioterapia, terapia para enfermedad autoinmunitaria u otra terapia con fármacos (por ejemplo, terapia con corticoesteroides), que provoca inmunosupresión; e inmunosupresión debida a deficiencia congénita o a enfermedades infecciosas, tales como el síndrome respiratorio agudo grave (abreviadamente SARS, por la expresión inglesa *Severe Acute Respiratory Syndrome*).

La gama de compuestos candidatos contemplados en la presente memoria incluye compuestos inhibidores del C5aR o agonistas inversos o antagonistas de una función biológica del C5aR. En una realización, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en: un péptido, incluyendo un péptido derivado del C5aR o la C5a u otros péptidos que no son del C5aR y capaces de inhibir, reducir o reprimir una función del C5aR, un mutante dominante-negativo del C5aR; un inhibidor no peptídico del C5aR; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al C5aR e inhibe una función del C5aR; una molécula orgánica pequeña y ácido nucleico, incluyendo ácido nucleico que codifica dicho péptido derivado del C5aR o la C5a u otro inhibidor peptídico no del C5aR, un ácido nucleico antisentido dirigido contra el mRNA que codifica el C5aR o una ribozima anti-C5aR o un RNA interferente (RNAi) pequeño que dirige la expresión del gen del C5aR.

También se describe un método de identificar un compuesto que modula la actividad del C5aR, que comprende:

- (a) administrar un compuesto candidato a un ratón con un gen activado de la presente invención o tejidos o células aislados obtenidos del mismo en el cual se expresa al menos un fenotipo asociado con señalización de C5aR; y monitorizar el desarrollo de al menos un fenotipo después de la administración del compuesto
- (b) opcionalmente, determinar la estructura del compuesto candidato; y
- (c) proporcionar el compuesto candidato o el nombre de la estructura del compuesto candidato.

Naturalmente, para agentes que son conocidos aunque no se han analizado previamente en cuanto a su función usando un cribado proporcionado por la presente invención, la determinación de la estructura del compuesto está implícita en la etapa (b). Esto es debido a que el experto estará enterado del nombre y/o la estructura del compuesto en el momento de realizar el cribado.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "proporcionar el agente " será entendida incluyendo un medio sintético químico o recombinante para producir dicho agente o alternativamente, la disposición de un agente que ha sido previamente sintetizado por una persona o medio.

Los compuestos identificados para la administración a un animal no humano o humano como se describe en la presente memoria pueden ser formulados para la administración por inyección mediante una ruta subcutánea, intravenosa, intranasal o intraperitoneal. Alternativamente, pueden ser adecuados para administración oral en la forma de aditivos alimentarios, comprimidos, trociscos, etc.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un ratón con un gen activado como se define en la reivindicaciones 1 a 4, una(s) célula(s) aislada(s), línea celular, tejido u órgano como se define en la reivindicación 5, y un método como se define en la reivindicaciones 6 a 17.

Los diversos aspectos y realizaciones descritos en la presente memoria, a los que se refieren los apartados individuales anteriores, se aplican, cuando sea adecuado, a otros apartados, *mutatis mutandis*. En consecuencia los aspectos especificados en un apartado pueden ser combinados con los aspectos especificados en otros apartados, cuando sea adecuado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Diagrama que muestra el diseño de la construcción con una diana para la generación de ratones con un gen C5aR humano activado.

Figura 2: Diagrama que muestra el *locus* C5aR de un ratón transgénico después de delección del gen PGKneo por Cre-recombinasa.

Figura 3: Diagrama que muestra sitios de restricción seleccionados y los exones del gen C5aR (C5r1) de ratón.

Figura 4: Localización de cebadores oligonucleotídicos usados en el ensayo de genotipado por PCR.

5 Figura 5: Análisis FACS que muestra que el C5aR humano es expresado en neutrófilos en ratones que llevan el gen hC5aR. Se incubó sangre de ratones de tipo natural (+/+); heterocigóticos (H5Rf/+) y homocigóticos (HSRf/HSRf) con un anticuerpo 7F3 específico para el C5aR humano conjugado a FITC. La zona de la derecha de la línea discontinua en el histograma de neutrófilos es la tinción positiva para el 7F3-FITC.

10 Figura 6: Progreso de una enfermedad inflamatoria similar a la artritis reumatoide (AR) en ratones homocigóticos con el gen C5aR humano activado y ratones de tipo natural. El panel de la izquierda muestra el aumento en el grosor de los tobillos después de que se inyectó i.p. suero de K/BxN los días 0 y 2. El panel de la derecha muestra la puntuación clínica. Los ratones nº 10 y nº 25 son homocigóticos para el gen C5aR humano, el ratón nº 38 es un compañero de camada de tipo natural. El engrosamiento de los tobillos y la enfermedad clínica se desarrolló tanto en ratones de tipo natural como homocigóticos con el gen hC5aR en la forma típica descrita para este modelo (Lee et al (2002) *Science*, 297, 1689-1692).

15 Figura 7: Gráficos que muestran el progreso y prevención de una enfermedad inflamatoria similar a la AR en ratones homocigóticos con el gen C5aR humano activado. El panel de la izquierda muestra el aumento en el engrosamiento de los tobillos después de que se inyectó i. p. suero de K/BxN los días 0 y 2. El panel de la derecha muestra la puntuación clínica. Los ratones nº 7, 10, 24 y 25 son homocigóticos para el gen C5aR humano. Los ratones nº 7 y nº 24 fueron inyectados con el anticuerpo neutralizante 7F3 para el gen C5aR humano, mientras que los ratones nº 10 y nº 25 fueron inyectados con un anticuerpo de control isotípico. El ratón compañero de camada (ratón nº 38) también fue tratado con el 7F3. El anticuerpo se inyectó los días -1 y +3. Los ratones inyectados con anticuerpo de control desarrollaron una enfermedad inflamatoria. En contraste los ratones con el gen hC5aR activado inyectados con 7F3 fueron protegidos de la inflamación. Los ratones de tipo natural inyectados con 7F3 no fueron protegidos de la inflamación.

CLAVE PARA EL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1: Secuencia de *locus* del gen C5aR(C5r1) de ratón y DNA flanqueante.

SEQ ID NO:2: Secuencia del cDNA del C5aR humano.

SEQ ID NO:3: Secuencia de aminoácidos del C5aR humano.

30 SEQ ID NO:4: Cebador F1C (específico para el exón 3 del C5aR humano):

SEQ ID NO:5: Cebador R2a (específico para el exón 3 del C5aR humano):

SEQ ID NO:6: Cebador F3C (específico para el gen C5aR de ratón):

SEQ ID NO:7: Cebador R4C (específico para el gen C5aR de ratón):

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 Técnicas generales y definiciones

A no ser que se indique otra cosa, las técnicas de DNA recombinante utilizadas en la presente invención son métodos estándares, bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichas técnicas están descritas y explicadas a través de toda la literatura científica, en fuentes tales como: J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 y 2, IRL Press (1991), D. M. Glover y B.D. Hames (editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al (Editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente) y se incorporan en la presente memoria como referencia. En particular, estos documentos describen en detalle métodos de transcribir o replicar moléculas de ácidos nucleicos y las condiciones requeridas para dicho métodos.

Definiciones

A través de esta memoria se entenderá que la palabra "comprenden" o variaciones, tal como "comprende" o "que comprende(n)", que implica la inclusión de un elemento establecido, número entero o etapa o grupo de elementos, numero enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Como se usa en la presente memoria, un "ligando" de una proteína C5aR se refiere a una clase particular de sustancias que se unen a una proteína C5aR de mamífero, incluyendo ligandos naturales y formas sintéticas y/o recombinantes de los ligandos naturales. En una realización preferida, la unión al ligando de una proteína C5aR ocurre con alta afinidad.

5 Como se usa en la presente memoria, un "antagonista" es una sustancia que inhibe la unión de un agonista o agonista inverso a una proteína C5aR e impide de este modo al menos una función característica de una proteína C5aR, tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión de ligandos, unión de promotores, unión de anticuerpos), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamíferos, inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre en el citosol) y/o la función de respuestas celulares (por ejemplo, estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por los leucocitos). El término antagonista abarca sustancias que se unen al receptor (por ejemplo, un anticuerpo, un mutante de un ligando natural, moléculas orgánicas de bajo peso molecular, otros inhibidores competitivos de la unión de ligandos) y sustancias que bloquean la función de los receptores sin unirse a ellos.

15 Como se usa en la presente memoria, un "agonista" es una sustancia que promueve (induce, causa, potencia o aumenta) al menos una función característica de una proteína C5aR, tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión de ligandos, inhibidores y/o promotores), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamíferos, inducción de aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre en el citosol) y/o la función de respuestas celulares (por ejemplo, estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por los leucocitos). El término agonista abarca sustancias que se unen al receptor (por ejemplo, un anticuerpo, un mutante de un ligando natural de otra especie) y sustancias que promueven la función de los receptores sin unirse a ellos (por ejemplo, activando una proteína asociada). En una realización preferida, el agonista es distinto de un homólogo de un ligando natural.

25 "Agonista inverso" como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula que se une a, o interactúa de otra manera con, el C5aR para inhibir la respuesta intracelular en la línea base iniciada por la forma activa del C5aR por debajo del nivel básico normal de actividad que se observa en ausencia de agonistas.

30 Por "transgénico mamífero" se quiere significar un mamífero (por ejemplo, ratón, rata; hámster, etc.), que tiene una secuencia de ácido nucleico no endógena (es decir, heteróloga) presente como un elemento extracromosómico en una porción de sus células o establemente integrada en su DNA de línea germinal (es decir, en la secuencia genómica de la mayoría de sus células). El ácido nucleico heterólogo se introduce en la línea germinal de dichos animales transgénicos por manipulación genética de, por ejemplo, embriones o células madre embrionarias del animal hospedante.

35 El término "biológicamente activo" o "funcional", cuando se usa en la presente memoria como un modificador del C5aR humano, se refiere a un polipéptido que exhibe al menos una de las características funcionales atribuidas al C5aR humano natural, tal como la capacidad de funcionar como receptor de la C5a o unirse a uno o más ligandos naturales del C5aR humano.

40 Una "desactivación" de un gen (que en lengua inglesa es expresada con el término "knock-out") significa una alteración en la secuencia del gen que da como resultado una disminución de la función del gen diana, preferiblemente tal que la expresión del gen diana es indetectable o insignificante. Una desactivación de un gen endógeno significa que la función del gen ha sido sustancialmente disminuida, de modo que la expresión no es detectable o sólo lo es a niveles insignificantes. Los animales transgénicos con un gen desactivado pueden ser animales transgénicos que tienen una desactivación heterocigótica de un gen o una desactivación homocigótica de un gen. Las "desactivaciones" incluyen también desactivaciones condicionales, en donde la alteración del gen diana puede ocurrir, por ejemplo, por exposición del animal a una sustancia que promueva la alteración del gen diana, introducción de una enzima que promueve la recombinación en el sitio del gen diana (por ejemplo, Cre en el sistema Cre-lox), u otro método para dirigir la alteración del gen diana posnatalmente.

50 Una "activación" de un gen diana (que en lengua inglesa es expresada con el término "knock-in") significa una alteración en un genoma de células hospedantes que da como resultado una expresión alterada (por ejemplo, aumentada (incluyendo ectópica)) del gen diana, por ejemplo, por introducción de una copia adicional del gen diana o por inserción de modo operativo de una secuencia reguladora que proporciona la expresión potenciada de una copia endógena del gen diana. Los animales transgénicos con un gen "activado" de interés para la presente invención son animales transgénicos que tienen un gen C5aR humano o humanizado. Dichos animales transgénicos pueden ser activados heterocigóticos para el gen C5aR humano o humanizado u homocigóticos para la activación del gen C5aR humano o humanizado. Las "activaciones" también abarcan activaciones condicionales.

55 Por "construcción" se quiere decir un ácido nucleico recombinante, generalmente DNA recombinante, que ha sido generado con el fin de la expresión de una secuencia nucleotídica específica o ha de ser usado en la construcción de otras secuencias nucleotídicas recombinantes.

Por "unida operativamente" se quiere significar que una secuencia de DNA y una secuencia reguladora están conectadas de tal modo que permiten la expresión del gen cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, las proteínas

activadoras de la transcripción) esté unidas a la secuencia reguladora.

Por "insertada operativamente" se quiere decir que una secuencia nucleotídica de interés está colocada adyacente a una secuencia nucleotídica que dirige la transcripción y traducción de la secuencia nucleotídica introducida de interés (es decir, facilita la producción de, por ejemplo, un polipéptido codificado por una secuencia del C5aR humano).

El término "corresponde a" o "que corresponde a" significa homólogo a, o sustancialmente equivalente a, o equivalente funcionalmente a la secuencia designada.

El término "construcción de gen transgénico" se refiere a una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un vector, que contiene el polinucleótido objeto, por ejemplo, el polinucleótido C5aR humano o uno de sus fragmentos, unido operativamente de un modo capaz de expresar el polinucleótido en una célula hospedante. Como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido" abarca ácido desoxirribonucleico (DNA), y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (RNA). Como se usa en la presente memoria el término también abarca análogos de RNA o DNA hechos de análogos de nucleótidos, y cuando sea aplicable a la realización que se describe, polinucleótidos monocatenarios (tales como con sentido o antisentido) y bicatenarios.

Animales transgénicos

Los métodos para producir animales transgénicos son bien conocidos en la técnica. Un libro de texto general útil sobre este tema es el de Houdebine, *Transgenic animals - Generation and Use* (Harwood Academic, 1997) que es una revisión amplia de la técnica usada para generar animales transgénicos desde peces hasta ratones y vacas. Son de particular interés en el contexto de la presente invención los mamíferos transgénicos no humanos, tal como vacas, cerdos, cabras, caballos, etc., y particularmente roedores, por ejemplo ratas, ratones, hámsteres, etc. Preferiblemente, el animal transgénico es un ratón.

Los avances en las tecnologías para la micromanipulación de embriones permiten ahora la introducción de DNA heterólogo en, por ejemplo, huevos de mamíferos fertilizados. Por ejemplo, las células madre totipotentes o pluripotentes pueden ser transformadas por microinyección, precipitación mediada por fosfato de calcio, fusión de liposomas, infección retroviral u otros medios. Las células transformadas se introducen luego en el embrión, y el embrión se desarrolla luego hasta un animal transgénico. En un método preferido, los embriones en desarrollo se transfectan con el DNA deseado por electroporación, y los animales transgénicos se producen a partir del embrión infectado. En otro método más preferido, sin embargo, los DNA apropiados se co-inyectan en el pronúcleo o citoplasma de embriones, preferiblemente en la etapa de una sola célula, y se dejan desarrollar los embriones hasta los animales transgénicos maduros. Estas técnicas son bien conocidas. Véanse las revisiones de métodos de laboratorio estándares para microinyección de los DNA heterólogos en huevos fertilizados de mamíferos, incluyendo las de Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Press 1986); Krimpenfort et al., *Bio/Technology* 9:844 (1991); Palmiter et al., *Cell*, 41: 343 (1985); Kraemer et al., *Genetic manipulation of the Mammalian Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1985); Hammer et al., *Nature*, 315: 680 (1985); Wagner et al., Patente de EE.UU. N° 5.175.385; Krimpenfort et al., Patente de EE.UU. N° 5.175.384, cuyos contenidos respectivos se incorporan en la presente memoria como referencia.

Otro método usado para producir un animal transgénico implica microinyectar un ácido nucleico en huevos en la etapa pro-nuclear por métodos estándares. Los huevos inyectados se cultivan luego antes de transferirlos a los oviductos de las receptoras pseudopreñadas.

Los animales transgénicos también pueden ser producidos por la tecnología de transferencia nuclear como la descrita en Schnieke, A.E. et al., 1997, *Science*, 278: 2130 y Cibelli, J.B. et al., 1998, *Science*, 280: 1256. Usando este método, fibroblastos de animales donantes se transfectan establemente con un plásmido que incorpora las secuencias codificadora de un dominio de unión o una pareja de unión de interés bajo el control de secuencias reguladoras. Los transfectantes estables se fusionan luego a los ovocitos enucleados, se cultivan y se transfieren a receptores hembras.

Los análisis de animales que pueden contener secuencias transgénicas serían típicamente realizador por PCR o análisis por transferencia Southern siguiendo métodos estándares.

Como un ejemplo específico para la construcción de mamíferos transgénicos, tal como vacas, se microinyectan construcciones de nucleótidos que comprenden una secuencia que codifica un dominio de unión dominio fusionado a GFP usando, por ejemplo, la técnica descrita en la Patente de EE.UU. N° 4.873.191, en ovocitos que se obtienen de ovarios recientemente retirados del mamífero. Los ovocitos se aspiran de los folículos y se dejan sedimentar antes de la fertilización con espermatozoides congelados capacitados con heparina y prefraccionados por gradiente de Percoll para aislar la fracción móvil.

Los ovocitos fertilizados se centrifugan, por ejemplo, durante ocho minutos a 15.000 g para visualizar los pronúcleos para la inyección y luego se cultivan a partir del cigoto hasta la etapa de mórula o blastocisto en medio acondicionado de tejido de oviducto. Este medio se prepara usando tejidos luminales raspados de los oviductos y se diluye en medio de cultivo. Los cigotos deben colocarse en el medio de cultivo dentro de las dos horas después de la microin-

yección.

Luego se sincroniza el estro en los mamíferos receptores destinados, tal como ganado vacuno, administrando co-prostanol. El estro se produce en los dos días siguientes y los embriones se transfieren a los receptores 5-7 días después del estro. La transferencia con éxito puede ser evaluada en la descendencia por transferencia Southern.

- 5 Alternativamente, las construcciones deseadas se pueden introducir en células madre embrionarias (abreviadamente células ES por la expresión inglesa *Embryonic Stem*) y las células se cultivan para asegurar la modificación por el transgén. Las células modificadas se inyectan luego en la fase embrionaria blástula y las blástulas se reemplazan en las hospedantes pseudopreñadas. La descendencia resultante es quimérica con respecto a las células ES y las células hospedantes y las razas no quiméricas que exclusivamente comprenden la progenie ES se pueden obtener usando reproducción cruzada convencional. Este técnica está descrita, por ejemplo, en el documento WO91/10741.

10 Los animales transgénicos comprenden una secuencia exógena de ácido nucleico presente como un elemento extracromosómico o integrado establemente en todas o partes de sus células, especialmente en las células germinales. Se prefiere que una animal transgénico comprenda cambios estables para la secuencia de la línea germinal. Un cambio estable se consigue generalmente por introducción del DNA en el genoma de la célula. Los vectores para la integración estable incluyen plásmidos, retrovirus y otros virus de animales, cromosomas artificiales de levadura y similares. Durante la construcción inicial del animal se generan "las quimeras" o "animales quiméricos", en los cuales sólo un subconjunto de células tienen el genoma alterado. Las quimeras se usan principalmente para fines de reproducción con objeto de generar el animal transgénico. Los animales que tienen una alteración heterocigótica se generan por reproducción de quimeras. Se crían típicamente heterocigóticos machos y hembras para generar animales homocigóticos.

15 Los mamíferos no humanos transgénicos preferidos se producen introduciendo un transgén C5aR humano en la línea germinal del animal no humano. Las células madre embrionarias (ES) son el tipo primario de célula diana para la introducción del transgén C5aR humano en el animal no humano para conseguir la recombinación homóloga. Las células ES se pueden obtener de embriones de pre-implantación cultivados *in vitro* y fusionados con embriones (Evans, M.J., et al., (1981) *Nature* 292, 154-156; Bradley, M. O., et al., (1984) *Nature* 309, 255-258; Gossler, et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9065-9069; y Robertson, et al., (1986) *Nature* 322, 445-448). Los transgenes se pueden introducir eficazmente en las células ES por transfección de DNA o por transducción mediada por retrovirus. Dichas células ES transformadas se pueden combinar después con blastocistos de un animal no humano. Las células ES después colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante. Para una revisión véase Jaenisch, R. (1988) *Science* 240, 1468-1474. Las células embrionarias transfectadas se pueden incubar *in vitro* durante tiempos variables o ser reimplantadas en el hospedante de alquiler o ambas cosas.

20 La descendencia transgénica del hospedante de alquiler puede ser cribada para la presencia y/o expresión del transgén por un método adecuado. El cribado se realiza frecuentemente por análisis de transferencia Southern o transferencia Northern, usando una sonda que sea complementaria a al menos una porción del transgén. Como método alternativo o adicional se pueden emplear análisis por transferencia Western que usan un anticuerpo contra la proteína codificada por el transgén para cribar (detectar) la presencia del producto del transgén. Típicamente, en ratones transgénicos, el DNA se prepara de tejido de la cola y se analiza por análisis Southern o PCR para el transgén. Alternativamente, se analizan los tejidos o células que se cree que expresan el transgén a los niveles más altos para determinar la presencia y expresión del transgén usando análisis Southern o PCR, aunque algunos tejidos o tipos de células pueden usarse para este análisis. La progenie de los animales transgénicos se puede obtener apareando el animal transgénico con una pareja adecuada o por fertilización *in vitro* de huevos y/o espermatozoides obtenidos del animal transgénico.

25 Los métodos de producir ratones transgénicos por recombinación homóloga entre el gen endógeno y una construcción de transgén están descritos por Hanks, M et al (*Science* 269: 679-682, 1995), que se incorpora específicamente como referencia en la presente memoria.

Construcciones de C5aR humano y humanizado

La construcción de polinucleótido introducida puede codificar una secuencia de C5aR humano de tipo natural como la mostrada en la SEQ ID NO:3 o uno de sus variantes alélicas, derivado biológicamente activo o fragmento.

30 Ejemplos no limitativos de unas variantes alélicas de la SEQ ID NO:3 comprenden una o más de las sustituciones siguientes:

Aminoácido nº 2: Asp>Asn

Aminoácido nº 279: Asn>Lys.

La construcción de polinucleótido puede comprender una secuencia como la mostrada en la SEQ ID NO:2, o una de sus variantes alélicas.

35 Ejemplos no limitativos de unas variantes alélicas de la SEQ ID NO:2 comprenden uno o más de los siguientes cam-

bios de bases:

Base nº 28: g>a

Base nº 474: c>t

Base nº 861: t>g

5 Base nº 1313-1314: inserción de a

Base nº 1447-1448: inserción de a

10 La frase "derivado biológicamente activo" en relación con la secuencia de aminoácidos del C5aR humano incluye una sustitución de, variación de, modificación de, reemplazo de, delección de o adición de uno (o más) aminoácidos desde o a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:3 que proporciona la secuencia de aminoácidos resultante que tiene actividad de C5aR humano, teniendo preferiblemente al menos 25 a 50% de la actividad como la de los polipéptidos presentados en la SEQ ID NO:3, más preferiblemente al menos sustancialmente la misma actividad. Preferiblemente, el C5aR humano incluye regiones suficientes para efectuar la señalización por C5aR.

15 Por tanto, la secuencia del C5aR humano mostrada en la SEQ ID NO:3 puede ser modificada para uso en la presente invención. Típicamente las modificaciones se hacen para mantener la actividad natural de la secuencia. Por tanto, en una realización, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos, por ejemplo desde 1, 2 o 3 hasta 10, 20 o 30 sustituciones siempre que la secuencia modificada retenga al menos aproximadamente 25 a 50% de, o sustancialmente, la misma señalización del C5aR. Sin embargo, en una realización alternativa las modificaciones de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:3 se pueden hacer intencionadamente para reducir la actividad biológica del polipéptido.

20 En general, se alteran preferiblemente menos de 20%, 10% o 5% de los residuos de aminoácidos de un derivado biológicamente activo en comparación con la región correspondiente representada en la SEQ ID NO:3.

Su pueden hacer sustituciones conservadoras, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla siguiente. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden ser sustituidos unos por otros:

ALIFÁTICO		G A P
	No polar	I L V
		C S T M
	Polar – no cargado	N Q
		D E
	Polar - cargado	K R
AROMÁTICO		H F W Y

25 La secuencia que codifica C5aR está preferible y operativamente unida a un promotor, que puede ser endógeno o heterólogo, constitutivo o inducible, y otras secuencias reguladoras requeridas para la expresión en el animal hospedante.

30 Alternativamente, la construcción introducida puede codificar el C5aR humanizado. Preferiblemente, la secuencia del C5aR humanizado es una versión modificada de un C5aR no humano, más preferiblemente es una versión modificada de la secuencia del C5aR endógeno para el mamífero transgénico. La modificación introduce o potencia al menos una característica funcional del C5aR humano natural en el C5aR humanizado cuando se compara con el C5aR no humano o endógeno. Por ejemplo, si el C5aR no humano no se une a un ligando, agonista, agonistas inverso o antagonista particular del C5aR humano, la modificación puede alterar la especificidad de unión, de tal modo que el C5aR humanizado resultante se una a ese ligando, agonista, agonista inverso o antagonista. Alternativamente, si el C5aR no humano exhibe una baja afinidad de unión para un ligando, agonista, agonista inverso o antagonista particular del C5aR humano, la modificación puede dar como resultado un C5aR humanizado que exhibe afinidad de unión potenciada para ese ligando, agonista, agonista inverso o antagonista cuando se compara con el C5aR no humano. En una realización preferida, la modificación potencia la afinidad de unión del C5aR humanizado para uno o más ligandos, agonistas, agonistas inversos o antagonistas del C5aR humano al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 50 veces y más preferiblemente al menos 100 veces, cuando se compara con la secuencia no humana.

45 La modificación implica preferiblemente la sustitución de al menos un aminoácido del C5aR no humano por el correspondiente aminoácido del C5aR humano. Más preferiblemente, la modificación implica la sustitución de al menos dos, más preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10 y más preferiblemente al menos 20 aminoácidos del C5aR no humano por los correspondientes aminoácidos del C5aR humano.

Preferiblemente, la modificación comprende reemplazar al menos un dominio o una parte sustancial del mismo en el C5aR no humano por el correspondiente dominio del C5aR humano o una parte sustancial del mismo. Por ejemplo, la modificación puede comprender reemplazar al menos un dominio extracelular del C5aR endógeno por el correspondiente dominio extracelular del C5aR humano. El C5aR humanizado puede comprender, por tanto, al menos un dominio extracelular del C5aR humano. En un ejemplo, el C5aR humanizado comprende dominios intracelulares del C5aR endógeno y dominios extracelulares de C5aR humano.

Los diversos dominios del C5aR humano que pueden ser introducidos en el C5aR humanizado se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1:	
Aminoácidos 1 - 37	Dominio extracelular – extremo N
Aminoácidos 38 - 60	Dominio transmembranal
Aminoácidos 61 - 71	Dominio intracelular
Aminoácidos 72 - 94	Dominio transmembranal
Aminoácidos 95 - 110	Dominio extracelular – bucle extracelular 1
Aminoácidos 111 - 132	Dominio transmembranal
Aminoácidos 133 - 153	Dominio intracelular
Aminoácidos 154 - 174	Dominio transmembranal
Aminoácidos 175 - 200	Dominio extracelular- bucle extracelular 2
Aminoácidos 201 - 226	Dominio transmembranal
Aminoácidos 227 - 242	Dominio intracelular
Aminoácidos 243 - 265	Dominio transmembranal
Aminoácidos 266 - 282	Dominio extracelular – bucle extracelular 3
Aminoácidos 283 - 303	Dominio transmembranal
Aminoácidos 304 - 350	Dominio intracelular – extremo C

Las construcciones para uso como en la presente memoria incluyen una construcción adecuada para uso en la generación de animales transgénicos que tienen los niveles de expresión deseados de la secuencia que codifica el C5aR humano o humanizado. Estas construcciones pueden contener cDNA, secuencias genómicas o ambos. Los métodos para aislar y clonar una secuencia deseada, así como construcciones adecuadas para la expresión de una secuencia seleccionada en un animal hospedante son bien conocidos en la técnica. La construcción puede incluir secuencias distintas de las secuencias que codifican el C5aR. Por ejemplo, en la construcción se puede incluir un gen marcador, tal como lac Z, en donde el aumento de la regulación de la expresión de la secuencia codificada dará como resultado un cambio en el fenotipo fácilmente detectado.

El término "gen C5aR " se usa generalmente para significar un gen C5aR humano e isoformas, formas alternativas, variantes por empalme, variantes mutadas, etc. de este gen humano. Este término también pretende significar el marco de lectura abierto que codifica polipéptidos específicos, intrones, y secuencias de nucleótidos no codificadas adyacentes a 5' y 3' implicadas en la regulación de la expresión, hasta aproximadamente 1 kb más allá de la región codificadora, pero posiblemente más en cualquier dirección. La secuencia de DNA que codifica el C5aR puede ser cDNA o DNA genómico o uno de sus fragmentos. El gen se puede introducir en un vector apropiado para el mantenimiento extracromosómico o para la integración en el hospedante.

Las secuencias genómicas de particular interés comprenden el ácido nucleico presente entre el codón de iniciación y el codón de parada, incluyendo la totalidad de los intrones que normalmente se encuentran presentes en el cromosoma natural. Estas pueden incluir además regiones no traducidas en 3' y 5' encontradas en el mRNA maduro. Dichas secuencias pueden incluir además secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales específicas, tal como promotores, potenciadores, etc., incluyendo aproximadamente 1 kb, pero posiblemente más de DNA genómico flanqueante en el extremo 5' o 3' de la región transcrita. El DNA genómico puede ser aislado como un fragmento de 100 kb o más pequeño; y sustancialmente exento de secuencias cromosómicas flanqueantes.

Las secuencias de las regiones 5' del gen C5aR humano, y más secuencias de regiones situadas hacia el extremo 5' y secuencias situadas hacia el extremo 3' se pueden utilizar para elementos promotores, incluyendo sitios de unión de potenciadores, que proporcionan la expresión en tejidos en donde se expresa normalmente el C5aR. La expresión específica en tejidos es útil para proporcionar promotores que mimeticen el modelo natural de expresión. Los polimorfismos que se presentan de forma natural en la región del promotor son útiles para determinar variaciones naturales en la expresión, particularmente las asociadas con enfermedad. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones en la región del promotor para determinar el efecto de alterar la expresión en sistemas definidos experimentalmente. Los métodos para la identificación de restos de DNA específicos implicados en la unión de factores transcripcionales son conocidos en la técnica, por ejemplo, la similitud de secuencias para restos de unión conocidos, estudios de retardo en geles, etc. Por ejemplo, véase Blackwell et al., (1995) *Mol. Med.* 1: 194-205; Mortlock et al. (1996) *Genome Res.* 6: 327-33; y Joulin and Richard-Foy (1995) *Eur. J. Biochem.* 232: 620-626.

Los vectores adecuados para uso como en la presente memoria pueden comprender al menos un elemento de con-

trol de expresión unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el C5aR humano. Los elementos de control de la expresión se pueden insertar en el vector para control y regular la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Ejemplos elementos de control de la expresión incluyen, pero sin limitación, el sistema lac, regiones del operador y promotor del fago lambda, promotores de levaduras y promotores derivados de poliovirus, adenovirus, retrovirus o SV40. El vector puede comprender más elementos operacionales incluyendo, pero sin limitación, secuencias de cadenas, codones de terminación, señales de poliadenilación, y otras secuencias necesarias o preferidas para la transcripción y/o traducción apropiadas de la secuencia de ácido nucleico que codifica el C5aR humano.

En otra realización preferida la construcción comprende regiones homólogas a las secuencias de los extremos 3' y 5' que flanquean la secuencia codificadora del C5aR endógeno del mamífero no humano. Se entenderá que estas regiones de homología son útiles para la integración dirigida a diana de la construcción en el *locus* del C5aR endógeno del mamífero transgénico.

Preferiblemente, la construcción del polinucleótido comprende regiones homólogas a al menos 2 kb, más preferiblemente alrededor de 3 kb, situadas en dirección a los extremos 5' y 3' del exón 3 del gen del C5aR endógeno. Por ejemplo, las secuencias situadas en dirección a los extremos 5' y 3' pueden proceder de la secuencia entre los nucleótidos 7377-15045 de la SEQ ID NO: 1.

Los expertos en la técnica entenderán que los vectores son construidos usando una metodología convencional (Véase por ejemplo Sambrook et al., (eds.) (1989) "*Molecular Cloning. A Laboratory Manual*" Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.; Ausubel et al., (eds.) (1987) "*Current Protocols in Molecular Biology*" John Wiley and Sons, New York, N.Y.) o están comercialmente disponibles.

En algunas realizaciones puede ser preferible expresar el C5aR humano en tejidos que mimeticen el modelo natural de expresión en seres humanos. Un modelo específico de expresión se puede conseguir colocando el ácido nucleico que codifica el C5aR humano bajo el control de un promotor inducible o regulado en el desarrollo o bajo el control de promotor específico de tejidos o específico de tipos de célula. Como ejemplo, los modelos específicos de expresión se pueden conseguir mediante el uso de secuencias genómicas para el C5aR humano.

Las técnicas para la mutagénesis *in vitro* de genes clonados son conocidas. Ejemplos de protocolos para escanear mutaciones se pueden encontrar en Gustin et al., 1993 *Biotechniques* 14:22; Barany, 1985 *Gene* 37:111-23; Colicelli et al., 1985 *Mol. Gen. Genet.* 199:537-9; y Prentki et al., 1984 *Gene* 29:303-13. Métodos para mutagénesis específicas de sitios se pueden encontrar en Sambrook et al., 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, pp. 15.3-15.108; Weiner et al., 1993 *Gene* 126:35-41; Sayers et al., 1992 *Biotechniques* 13:592-6; Jones and Winistorfer, 1992 *Biotechniques* 12:528-30; Barton et al., 1990 *Nucleic Acids Res.* 18:7349-55; Marotti and Tomich, 1989 *Gene Anal. Tech.* 6:67-70; y Zhu 1989 *Anal. Biochem.* 177:120-4.

Desactivaciones y activaciones de genes ("Knock-outs" y "Knock-ins")

Aunque no es necesario para la operatividad de la invención, los animales transgénicos descritos en la presente memoria pueden comprender alteraciones de los genes endógenos además de las alteraciones genéticas descritas antes. Por ejemplo, los animales hospedantes pueden comprender "desactivaciones" y/o "activaciones" de un (unos) gen(es) diana de acuerdo con los objetivos de la invención (por ejemplo, el C5aR endógeno del animal hospedante puede ser C5aR humano "desactivado" y/o "activado"). Los desactivados tienen una pérdida parcial o completa de función en uno en ambos alelos de un gen endógeno de interés (por ejemplo, C5aR). Los activados tienen un transgén introducido con la secuencia genética y/o la función alterada del gen endógeno. Los dos pueden estar combinados, por ejemplo, de tal modo que se inutilice el gen que se presenta de modo natural y se introduzca una forma alterada. Por ejemplo, es preferible desactivar el gen C5aR endógeno del hospedante, al mismo tiempo que se introduce un gen C5aR humano.

En una desactivación, preferiblemente la expresión del gen diana es indetectable o insignificante. Por ejemplo, una desactivación de un gen C5aR significa que la función del gen C5aR ha sido sustancialmente disminuida de modo que la expresión no es detectable o solamente está presente a niveles insignificantes. Esto se puede conseguir por una variedad de mecanismos, incluyendo la introducción de una interrupción de la secuencia codificadora, por ejemplo, inserción de uno o más codones de parada, inserción de un fragmento de DNA, etc., delección de la secuencia codificadora, sustitución de codones de parada por secuencias codificadoras, etc. En algunos casos las secuencias del transgén exógeno son delecionadas finalmente del genoma, dejando un cambio neto en la secuencia natural. Para conseguir la "desactivación" se pueden usar diferentes métodos. Se puede inducir una delección cromosómica de todo o parte del gen natural, incluyendo delecciones de las regiones no codificadoras, particularmente la región del promotor, secuencias reguladoras en 3', potenciadores o delecciones de genes que activan la expresión del C5aR. También se puede conseguir una desactivación funcional mediante la introducción de una construcción antisentido que bloquee la expresión de los genes naturales (por ejemplo, véase Li y Cohen (1996) *Cell* 85:319-329). Las "desactivaciones" también incluyen desactivaciones condicionales, por ejemplo cuando ocurre la alteración del gen diana por exposición del animal a una sustancia que promueve la alteración del gen diana, la introducción de una enzima que promueve la recombinación en el sitio del gen diana (por ejemplo, Cre en el sistema Cre-lox) u otro método para dirigir la alteración del gen diana posnatalmente.

Una "activación" de un gen diana significa una alteración en un genoma de la célula hospedante que da como resultado la expresión o función alterada de un gen diana natural. Se puede conseguir una expresión aumentada (incluyendo la ectópica) o disminuida por la introducción de una copia adicional del gen diana o insertando operativamente una secuencia reguladora que proporciona la expresión potenciada de una copia endógena del gen diana. Estos cambios pueden ser constitutivos o condicionales, es decir, dependientes de la presencia de un activador o represor.

Identificación y/o evaluación de ligandos, agonistas, agonistas inversos y/o antagonistas del C5aR

A través del uso de animales transgénicos o células procedentes del mismo, se pueden identificar ligandos o sustratos que modulan los fenómenos asociados con la señalización del C5aR. Dependiendo del ensayo particular, se pueden usar los animales transgénicos completos de la presente invención o tejido, órganos o células procedentes de los mismos. Las células pueden ser recientemente aisladas del animal transgénico o pueden ser inmortalizadas en cultivo. Las células de particular interés proceden de tejidos, tales como musculatura lisa, endotelio, musculatura contráctil o corazón.

El término "compuesto" como se usa en la presente memoria describe una molécula, por ejemplo proteína, molécula pequeña, polinucleótido o producto farmacéutico, con la capacidad de impedir o suprimir los fenómenos moleculares y clínicos asociados con la señalización del C5aR.

Los compuestos candidatos abarcan numerosas clases químicas, aunque en una realización preferida son moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más 50 y menos de aproximadamente 2.500 daltons. Los compuestos candidatos preferiblemente comprenden los grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente unión por puentes de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos comprenden frecuentemente estructuras carbonadas cíclicas o heterocíclicas y/o aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los compuestos candidatos también se encuentran entre las biomoléculas incluyendo, pero sin limitación, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas y sus derivados, análogos estructurales o combinaciones.

Los compuestos candidatos se pueden obtener de una amplia variedad de fuentes incluyendo quimiotecas de compuestos naturales o sintéticos. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis al azar y directa de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, están disponibles quimiotecas de compuestos naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, de vegetales y animales o se producen fácilmente. Adicionalmente, las quimiotecas y los compuestos producidos natural o sintéticamente y compuestos se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales y se pueden usar para producir quimiotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas directas o aleatorias, tal como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc, para producir análogos estructurales.

El cribado también puede ser dirigido a compuestos farmacológicamente activos y sus productos químicos análogos.

El agente candidato puede ser administrado al mamífero transgénico de la invención (o células procedentes del mamífero transgénico) de un modo deseado y/o apropiado para la administración del agente para conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, el agente candidato se puede administrar por inyección (por ejemplo, inyección intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente o directamente en el tejido en el cual se ha de conseguir el efecto deseado), oralmente o por cualquier otro medio deseable. Preferiblemente, el cribado *in vivo* implicará cierto número de animales que reciben cantidades y concentraciones variables del compuesto candidato (desde nada de compuesto hasta una cantidad de compuesto que se aproxima al límite superior de la cantidad que puede ser administrada satisfactoriamente al animal), y puede incluir la administración del agente en diferentes formulaciones. Los compuestos se pueden administrar solos o en combinaciones de dos o más, especialmente cuando la administración de una combinación de agentes puede dar como resultado un efecto sinérgico. El efecto de la administración del agente sobre el roedor transgénico se puede monitorizar por metodología convencional.

La gama de compuestos candidatos contemplados en la presente memoria incluye compuestos inhibidores del C5aR o antagonistas de una función biológica del C5aR. En una realización, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en: un péptido, incluyendo un péptido derivado del C5aR o la C5a u otros péptidos que no son C5aR y capaces de inhibir, reducir o reprimir una función del C5aR, un mutante dominante-negativo del C5aR; un inhibidor no peptídico del C5aR; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al C5aR e inhibe una función del C5aR; una molécula orgánica pequeña, y ácido nucleico, incluyendo ácido nucleico que codifica dicho péptido derivado del C5aR o la C5a u otro inhibidor peptídico que no es C5aR, un ácido nucleico antisentido dirigido contra el mRNA que codifica el C5aR o una ribozima anti-C5aR o un RNA de interferencia pequeño (RNAi) que dirige la expresión del gen C5aR. Cierta número de estos tipos de compuestos se analizan a continuación.

Moléculas pequeñas

Los compuestos candidatos abarcan numerosas clases químicas, aunque preferiblemente son moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproxi-

madamente 2.500 daltons. Los compuestos candidatos comprenden los grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con las proteínas particularmente unión por puentes de hidrógeno y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los compuestos candidatos pueden comprender frecuentemente estructuras carbonadas cíclicas o heterocíclicas y/o aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los compuestos candidatos también se encuentran entre las biomoléculas incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas y sus derivados, análogos estructurales o combinaciones. De hecho, virtualmente cualquier molécula orgánica pequeña que sea potencialmente capaz de unirse a una molécula diana biológica puede encontrar uso en la presente invención siempre que sea suficientemente soluble y estable en soluciones acuosas para ser analizada respecto a su capacidad para unirse a la molécula diana biológica.

Los compuestos candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes incluyendo quimiotecas de compuestos naturales o sintéticos. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis al azar y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos aleatorizados. Alternativamente, están disponibles o se producen fácilmente quimiotecas de compuestos naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, de vegetales y animales. Adicionalmente, las quimiotecas y los compuestos producidos natural o sintéticamente y compuestos se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Los compuestos farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas directas o aleatorias, tal como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc, para producir análogos estructurales.

Inhibidores peptídicos o proteínicos

En otra realización, los compuestos candidatos son proteínas. Por "proteína" en este contexto se quiere significar al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. La proteína puede estar constituida de aminoácidos de origen natural y enlaces peptídicos o estructuras peptidomiméticas. Por tanto "aminoácido" o "residuo de péptido", como se usan en la presente memoria significan tanto los aminoácidos naturales como los sintéticos. Por ejemplo, para los fines de la invención se consideran aminoácidos la homofenilalanina, citrulina y norleucina. "Aminoácido" también incluye los residuos de iminoácidos, tal como prolina e hidroxiprolina. Las cadenas laterales pueden estar de la configuración (R) o (S). En la realización preferida, los aminoácidos están en la configuración (S) o (L). Si se usan cadenas laterales no naturales pueden usarse sustituyentes que no son aminoácidos, por ejemplo para impedir o retardar las degradaciones *in vivo*.

En otra realización preferida, los compuestos candidatos son proteínas naturales o fragmentos de proteínas naturales. Así, por ejemplo, se pueden usar extractos celulares que contienen proteínas o materiales digeridos, aleatoriamente o dirigidos, de extractos celulares proteínicos. De este modo se pueden obtener colecciones de proteínas procariontas y eucariotas. En esta realización son particularmente preferidas las colecciones de proteínas bacterianas, fúngica, virales y de mamíferos, siendo preferidas estas últimas y siendo especialmente preferidas las proteínas humanas.

En otra realización preferida, los compuestos candidatos son péptidos de una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 aminoácidos, siendo preferidos los péptidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, y siendo particularmente preferidos los de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 aminoácidos. Los péptidos pueden ser materiales digeridos de proteínas naturales, péptidos aleatorios o péptidos aleatorios "sesgados". Por "aleatorizados" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se quiere significar que cada péptido consiste esencialmente de aminoácidos al azar. Puesto que generalmente estos péptidos aleatorios se sintetizan químicamente, pueden incorporar un aminoácido en cualquier posición. El proceso sintético puede ser diseñado para generar proteínas aleatorias para permitir la formación de la totalidad o la mayoría de las combinaciones posibles en la longitud de la secuencia, formando de este modo una quimioteca de compuestos bioproteínicos bioactivos candidatos aleatorios.

La preparación y cribado de quimiotecas combinatorias son bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichas quimiotecas combinatorias incluyen, pero sin limitación, colecciones de péptidos (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.010.175, Furka (1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487-493, Houghton et al. (1991) *Nature*, 354: 84-88). La síntesis de péptidos de ningún modo es el único enfoque previsto considerado y destinado para uso con la presente invención. También se pueden usar otros métodos químicos para generar una diversidad de quimiotecas. Tales métodos químicos incluyen pero sin limitación: peptoides (Publicación PCT N° WO 91/19735, 26 Dic. 1991), péptidos codificados (Publicación PCT WO 93/20242, 14 Oct. 1993), bio-oligómeros al azar (Publicación PCT WO 92/00091, 9 enero 1992), benzodiazepinas (Patente de EE.UU. N° 5.288.514), diversómeros, tal como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al. (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568), peptidomiméticos no peptídicos con un andamio de beta-D-glucosa (Hirschmann et al., (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218), síntesis orgánicas análogas de quimiotecas de compuestos pequeños (Chen et al. (1994) *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661), oligocarbamatos (Cho, et al., (1993) *Science* 261:1303), y/o peptidil-fosfonatos (Campbell et al., (1994) *J. Org. Chem.* 59: 658). Véase generalmente, Gordon et al., (1994) *J. Med. Chem.* 37:1385, genotecas de ácidos nucleicos, colecciones de péptidos y ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.539.083), colecciones de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn et al. (1996) *Nature Biotechnology*, 14(3): 309-314), y el documento PCT/US96/10287), colección-

nes de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang et al. (1996) *Science*, 274: 1520-1522, y la Patente de EE.UU. N° 5.593.853), y colecciones de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum (1993) *C&EN*, Jan 18, página 33, isoprenoides Patente de EE.UU. N° 5.569.588, tiazolidinonas y metatiazanonas Patente de EE.UU. N° 5.549.974, pirrolidinas patentes de EE.UU. N° 5.525.735 y 5.519.134, compuestos de morfolino Patente de EE.UU. N° 5.506.337, benzodiazepinas Patente de EE.UU. N° 5.288.514 y similares).

Están comercialmente disponibles dispositivos para la preparación de genotecas combinatorias (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, *Advanced Chem Tech*, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.).

En una realización, los inhibidores peptídicos del C5aR se sintetizan químicamente o recombinantemente como oligopéptidos (usualmente de una longitud de 10-25 aminoácidos) derivados de una secuencia del C5aR o la C5a. Alternativamente, los fragmentos del C5aR o la C5a se producen por digestión del C5aR o C5a naturales o producidos recombinantemente, por ejemplo, usando una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina o pepsina. El análisis por ordenador (usando programas informáticos comercialmente disponibles, por ejemplo MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) se usa para identificar sitios de escisión proteolítica. Los fragmentos proteolíticos o sintéticos pueden comprender tantos residuos de aminoácidos como sean necesarios para inhibir parcial o completamente la función del C5aR. Los fragmentos preferidos tendrán una longitud de menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos.

Los inhibidores proteínicos o peptídicos también pueden ser mutantes dominantes-negativos del C5aR. El término "mutante dominante-negativo" se refiere a un polipéptido del C5aR que ha sido mutado desde su estado natural y que interactúa con una proteína con la que interactúa normalmente el C5aR impidiendo con ello formar interacción con el C5aR endógeno natural.

Anticuerpos anti-C5aR

El término "anticuerpo" como se usa en la presente memoria incluye moléculas intactas, así como sus fragmentos, tal como Fab, F(ab')₂, y Fv que son capaces de unir un determinante epitópico del C5aR. Estos fragmentos de anticuerpo retienen alguna capacidad de unirse selectivamente con su antígeno y se definen como sigue:

(1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo se puede producir por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para proporcionar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;

(2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para proporcionar una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; por cada molécula de anticuerpo se obtiene dos fragmentos Fab';

(3) F(ab')₂, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción subsiguiente; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos unidos por dos puentes desulfuro;

(4) Fv, definido como un fragmento manipulado por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y

(5) Anticuerpo monocatenario (abreviadamente "SCA" por sus iniciales en inglés *Single Chain Antibody*), definido como una molécula manipulada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

Los métodos para preparar estos fragmentos son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988), incorporado en la presente memoria como referencia).

Los anticuerpos se pueden preparar usando C5aR intacto o sus fragmentos como antígeno inmunizante. Un péptido usado para inmunizar un animal puede proceder de cDNA traducido o de síntesis química y se purifica y conjuga a una proteína vehículo, si se desea. Tales vehículos comúnmente usados que se acoplan químicamente al péptido incluyen hemocianina de lapa bocallave (KLH), tiroglobulina, seroalbúmina bovina (BSA) y toxoide de tétanos. El péptido acoplado se puede usar luego para inmunizar el animal (por ejemplo, un ratón o un conejo).

Si se desea, los anticuerpos policlonales se pueden purificar más, por ejemplo, uniéndolos a, y eluyéndolos de, una matriz a la cual se unió el péptido para el cual se produjeron los anticuerpos. Los expertos en la técnica conocerán varios métodos comunes en las técnicas inmunológicas para la purificación y/o concentración de anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales (Véase por ejemplo, Coligan, et al. *Unit 9, Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991, incorporada como referencia).

Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados usando una técnica que proporcione la producción de molé-

culas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo, tal como, por ejemplo, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos, y la técnica del EBV-hibridoma (Kohler et al., *Nature* 256, 495-497, 1975; Kozbor et al., *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026-2030, 1983; Cole et al., *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984).

- 5 Los métodos conocidos en la técnica permiten que los anticuerpos que exhiben unión para el C5aR sean identificados y aislados de las colecciones de expresión de anticuerpos. Por ejemplo, un método para la identificación y aislamiento de un dominio de unión de anticuerpo que exhibe unión a C5aR es un sistema vector de bacteriófago. Este sistema vector se ha usado para expresar una colección combinatoria de fragmentos Fab del repertorio de anticuerpos de ratón en *Escherichia coli* (Huse, et al., *Science*, 246:1275-1281, 1989) y del repertorio de anticuerpos humanos (Mullinax, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 87:8095-8099, 1990). Esta metodología también se puede aplicar a las líneas celulares de hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales con unión para un ligando preseleccionado. Los hibridomas que secretan un anticuerpo monoclonal se pueden producir de varios modos usando técnicas bien comprendidas por los expertos con un conocimiento normal de la técnica y no se repetirán en el presente texto. Los detalles de estas técnicas se describen en dichas referencias tales como *Monoclonal Antibodies - Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis*, Edited by Roger H. Kennett, et al., Plenum Press, 1980; y la patente de EE.UU. N° 4.172.124, incorporado como referencia.

Además son conocidos en la técnica métodos de producir anticuerpos "humanizados" o quiméricos e incluyen combinar regiones variables de muridos con regiones constantes humanas (Cabili, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3273, 1984), o injertar las regiones determinantes de la complementaridad de anticuerpos de muridos (abreviadamente CDR por la expresión inglesa *Complementarity Determining Regions*) en el marco humano (Rieclunann, et al., *Nature* 332:323, 1988).

Compuestos antisentido

El término "compuestos antisentido" abarca moléculas de DNA o RNA que son complementarias a al menos una porción de una molécula de mRNA diana (Izant and Weintraub, 1984; Izant and Weintraub, 1985) y capaces de interferir con un evento pos-transcripcional, tal como la traducción de mRNA. Se prefieren los oligómeros antisentido complementarios a al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos del mRNA que codifica la diana, puesto que se sintetizan fácilmente y tienen menor probabilidad de causar problemas que las moléculas más grande cuando se introducen en las células productoras de mRNA diana. El uso de métodos antisentido es muy conocido en la técnica (Marcus-Sakura, 1988).

Moléculas de RNA catalíticos

El término RNA catalítico se refiere a un RNA o molécula que contiene RNA (también conocida como una "ribozima") que específicamente reconoce un sustrato definido y cataliza la modificación química de este sustrato. Las bases de los ácidos nucleicos en el ácido nucleico catalítico pueden ser las bases A, C, G, T y U, así como sus derivados. Los derivados de estas bases son bien conocidos en la técnica.

35 Típicamente, el ácido nucleico catalítico contiene una secuencia antisentido para el reconocimiento específico de un ácido nucleico diana, y un ácido nucleico que muestra actividad enzimática (también denominado en la presente memoria el "dominio catalítico").

Los tipos de ribozimas que son particularmente útiles son la ribozima cabeza de martillo (Haseloff and Gerlach 1988, Perriman et al, 1992) y la ribozima de tipo horquilla para el cabello (Shippy et al, 1999).

40 Las ribozimas usadas se pueden sintetizar químicamente usando métodos bien conocidos en la técnica. Las ribozimas también se pueden preparar a partir de una molécula de DNA (que por transcripción, proporciona una molécula de RNA) unida operativamente a un promotor de RNA-polimerasa, por ejemplo, el promotor para la RNA-polimerasa de T7 o la RNA-polimerasa SP6. Cuando el vector también contiene un promotor de RNA-polimerasa operativamente unido a la molécula de DNA, la ribozima puede ser producida *in vitro* por incubación con RNA-polimerasa y nucleótidos. En una realización separada el DNA se puede insertar en un casete de expresión o casete de transcripción.

RNA bicatenarios (abreviadamente dsRNA por la expresión inglesa double stranded RNA)

Los dsRNA son particularmente útiles para inhibir específicamente la producción de una proteína particular. Aunque no se desea estar limitados por la teoría, Dougherty and Parks (1995) han proporcionado un modelo para el mecanismo por el cual el dsRNA se puede usar para reducir la producción de proteínas. Este modelo se modificó y expandió por Waterhouse et al., (1998). Esta tecnología se basa en la presencia de las moléculas de dsRNA que contienen una secuencia que es esencialmente idéntica al mRNA del gen de interés. Convenientemente el dsRNA se puede producir en un solo marco de lectura abierto en un vector recombinante o célula hospedante, en donde las secuencias con sentido y anti-sentido están flanqueadas por una secuencia no relacionada que facilita que se hibriden las secuencias con sentido y anti-sentido para formar la molécula de dsRNA formando con la secuencia no relacionada una estructura de bucle. El diseño y producción de moléculas de dsRNA adecuadas dirigidas contra genes de interés está dentro del alcance del conocimiento de los expertos en la técnica, considerando particular-

mente los documentos de Dougherty and Parks (1995), Waterhouse et al., (1998), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029, y WO 01/34815.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "RNA de interferencia pequeño" y "RNAi" se refieren a RNA bicatenarios (dsRNA) homólogos que específicamente se dirigen a un producto génico, dando como resultado un fenotipo nulo o hipomórfico. Específicamente, el dsRNA comprende dos secuencias de nucleótidos procedentes del RNA diana y teniendo tal auto-complementariedad que puedan reasociarse e interferir con la expresión de un gen diana, presumiblemente en el nivel pos-transcripcional. Las moléculas de RNAi esta descritas por Fire et al., (1998) y revisadas por Sharp (1999).

Fenotipos asociados con la señalización de C5aR

En los métodos descritos en la presente memoria, se administra un compuesto propuesto al animal transgénico y se mide la respuesta del animal transgénico a dicho compuesto propuesto. Preferiblemente, la respuesta del mamífero transgénico se compara con la respuesta de un ratón "de tipo normal" o alternativamente se compara con un animal transgénico de control (sin administración del compuesto).

En consecuencia, en un aspecto la presente invención proporciona un método de identificar un compuesto que modula la actividad del C5aR, que comprende (i) administrar un compuesto candidato a un mamífero transgénico de la presente invención en condiciones en las que se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR; y (ii) monitorizar el desarrollo del fenotipo después de la administración del compuesto.

El fenotipo se monitorizó para cualquier indicador de señalización de C5aR, incluyendo los siguientes:

(a) enfermedades y estados inflamatorios y alérgicos, incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias, tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares alérgicas, alveolitis alérgica, enfermedades intersticiales pulmonares (abreviadamente ILD por la expresión inglesa *Interstitial Lung Disease*) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociada a artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); anafilaxis o respuestas alérgicas, alergias a fármacos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), alergias a la picadura de insectos; enfermedades inflamatorias intestinales, tales como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; espondiloartropatías; escleroderma; psoriasis y dermatosis inflamatorias, tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica por contacto, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea y alérgica);

(b) enfermedades auto inmunitarias, tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes de tipo I, nefritis, tal como glomerulonefritis, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet;

(c) rechazo de injerto (por ejemplo, en trasplantes), incluyendo rechazo de aloinjertos o enfermedad del injerto frente al hospedante;

(d) aterosclerosis;

(e) cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos;

(f) enfermedades o estados (incluyendo enfermedades o estados mediados por el C5aR), en los cuales se pueden tratar las respuestas inflamatorias indeseables que han de ser inhibidas, incluyendo, pero sin limitación, lesión por reperusión, ictus, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, ciertas enfermedades malignas hematológicas, toxicidad inducida por citoquinas (por ejemplo, choque septicémico, choque endotóxico), polimiositis, dermatomiositis, pénfigo, enfermedad de Alzheimer y enfermedades granulomatosas incluyendo sarcoidosis.

Otros fenotipos incluyen inmunosupresión, tal como en individuos con síndromes de inmunodeficiencia, tal como SIDA, individuos que reciben radioterapia, quimioterapia, terapia para enfermedades autoinmunitarias u otra terapia con fármacos (por ejemplo, terapia con corticosteroides), que provoca inmunosupresión; e inmunosupresión debida a deficiencia congénita en la función de los receptores u otras causas.

Están disponibles cierto número de modelos de inflamación *in vivo* y se pueden usar para inducir fenotipos adecuados asociados con el C5aR en mamíferos transgénicos de la presente invención. Por ejemplo, la artritis reumatoide se puede evaluar usando un modelo en animales (por ejemplo, ratón) de artritis inducida por colágeno (Trentham et al (1977) *J. Exp. Med.* 146: 857-868), artritis inducida por suero de KJBxN (Kouskoff et al., (1996) *Cell* 187:811-822), artritis inducida por antígenos o artritis inducida por adyuvantes (Pearson CM (1956) *Proc. Soc. Exp. Biblo. Med.* 91:95-101).

Otros ejemplos de modelos en animales adecuados incluyen: modelo de septicemia con punción de ligadura cecal (abreviadamente CLP, por la expresión inglesa *Cecal Ligation Puncture*) (Huber-Lang, M. S., et al. (2002) *Faseb J.* 16(12): 1567-74); modelo de AR en ratas (Woodruff, T. M., et al. (2002) *Arthritis Rheum* 46(9): 2476-85); modelo de septicemia en porcinos (Mohr, M., et al. (1998) *Eur. J. Clin. Invest.* 28(3): 227-34); enfermedad pulmonar inducida por complejos inmunitarios; lesión pulmonar asociada a pancreatitis (Bhatia, M., et al. (2001) *Am. J. Physiol. Gas-*

trointest Liver Physiol. 280(5): G974-8); lesión pulmonar aguda; lesión renal por isquemia-reperusión; artritis inducida por colágeno; y enfermedad experimental de las vías respiratorias (modelo similar al asma).

En otro ejemplo, se puede monitorizar la infiltración de leucocitos por inyección intradérmica de un compuesto candidato (véase, por ejemplo, Van Damme, J. et al., *J. Exp. Med.*, 176: 59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. et al., *J. Exp. Med.*, 171: 2177-2182 (1990); Jose, P. J. et al., *J. Exp. Med.*, 179: 881-887 (1994)). En una realización, se evaluaron histológicamente biopsias de piel para infiltración de leucocitos (por ejemplo, eosinófilos, granulocitos). Una disminución de la extensión de infiltración en presencia del compuesto candidato en comparación con la extensión de infiltración en ausencia del compuesto candidato es indicativa de una inhibición de señalización del C5aR.

Los ejemplos de fenotipos preferidos se exponen brevemente a continuación.

10 Enfermedades autoinmunitarias (incluyendo artritis reumatoide)

Las enfermedades autoinmunitarias afectan al 5-8% de la población. Los complejos inmunitarios (CI) juegan un papel integral en la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunitarias incluyendo artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis y vasculitis inmunitaria. Aunque los CI inician la reacción autoinmunitaria, otros factores importantes que contribuyen a la gravedad de la enfermedad incluyen el sistema complemento, los receptores Fcγ y los neutrófilos. Ahora se reconoce que la contribución principal del complemento a la inflamación por los CI es a través de la señalización del C5aR. Los CI activan tanto la vía clásica como la alternativa del complemento. La C5a, liberada por la escisión de C5 durante la activación del complemento, es un poderoso agente quimioatrayente de neutrófilos, monocitos y macrófagos. La C5a que se une al C5aR inicia una serie de episodios, incluyendo la activación de FcγR en los macrófagos (sobre-regulación que activa FcγRIII y FcγRI y sub-regulación inhibitoria del FcγRIIB), haciendo que se liberen más mediadores quimiotácticos (por ejemplo, quimioquinas CXCL) y la posterior instrumentación de la respuesta inflamatoria.

La importancia de C5a/C5aR se ha demostrado en diversos sistemas modelos de inflamación por complejos inmunitarios. Por ejemplo, se ha mostrado que la C5a inicia la cascada inflamatoria en un modelo de peritonitis de ratón de la reacción de Arthus pasiva inversa (Godau J, et al., *J. Immunol.* 173, 3437 (2004)). También se ha mostrado que la C5a regula los FcγR en la enfermedad pulmonar inducida por los CI (Shushakova NJ, et al., *J. Clin. Invest.*, 110, 1823-1830 (2002)). Además, ratones con el gen C5aR desactivado no desarrollan inflamación en el modelo de transferencia de suero de KRNxNOD de Benoist-Mathis de la artritis reumatoide (Ji H, et al., *Immunity* 16, 157 (2002)) o en un modelo de artritis inducida por anticuerpos anti-colágeno (Grant EP, et al., *J. Exp. Med.* 196, 1461 (2002)).

Septicemia

La septicemia es una enfermedad grave causada por una infección irresistible del torrente sanguíneo por bacterias productoras de toxinas. Se ha reconocido que el sistema inmunitario innato puede ser perturbado durante la septicemia, como se pone de manifiesto por la activación extensiva de los sistemas inflamatorios, complemento y de coagulación, junto con la aparición de citoquinas y quimioquinas en el plasma. Esta "tormenta de citoquinas" tal como ha sido denominada desencadena numerosos mediadores inflamatorios que contribuyen a una disfunción o insuficiencia de múltiples órganos y a la muerte.

Revisiones recientes de la septicemia reflejan los intentos en el pasado de encontrar tratamientos para esta enfermedad y sugieren direcciones futuras (Crowther and Marshall (2001) *Jama* 286(15): 1894-6; Cohen, J. (2002) *Nature* 420(6917):885-91; Cross and Opal (2003) *Ann. Intern. Med.* 138(6): 502-5).

Hotchkiss and Karl (*N. Engl. J. Med.* 348(2):138-50, 2003) especulan que la eficacia mostrada por la proteína C recombinante activada anticoagulante en reducir la mortalidad en la septicemia puede ser debida en parte a sus efectos antiinflamatorios. Algunos de los efectos (directos e indirectos) de la proteína C activada son bloquear la producción de citoquinas, bloquear la adhesión de células, inhibir el reclutamiento de neutrófilos, desgranular los mastocitos y activar las plaquetas. La C5a media la quimiotaxis de leucocitos, la liberación de histamina de los mastocitos, la potenciación de la adhesión de las células neutrófilos-endoteliales y la inducción de la producción de citoquinas a través de la unión al receptor de la C5a.

Durante la septicemia en seres humanos, la activación no regulada del sistema complemento da como resultado una generación excesiva de anafilatoxinas, especialmente C3a y C5a y la disfunción subsiguiente de los neutrófilos. En etapas tardías de la septicemia, los neutrófilos han suprimido la respuesta quimiotáctica, disminuido la liberación de enzimas, alterado el pH intracelular y producido un estallido respiratorio defectuoso (menor producción de las especies reactivas de oxígeno, especialmente H₂O₂), conduciendo a una actividad bactericida reducida. Estos defectos han demostrado ser dependientes de la C5a. Durante la septicemia experimental los neutrófilos de la sangre tienen una capacidad muy disminuida de unirse a la C5a, tienen respuestas quimiotácticas reducidas a la C5a y una pérdida de la producción de H₂O₂. Estos defectos se pueden impedir en la septicemia inducida por la CLP tratando los animales con anticuerpos anti-C5a. Este tratamiento redujo la bacteremia y mejoro mucho la supervivencia. Esto indica que la septicemia induce una generación excesiva de C5a, lo cual, a su vez, conduce a graves defectos funcionales en los neutrófilos.

Los anticuerpos para C5aR también pueden proteger de la muerte por septicemia en modelos en animales. Se ha

mostrado que tanto la inmunorreactividad del C5aR como la expresión del mRNA están aumentadas en las células epiteliales de pulmón, riñón, hígado, corazón y timo en una fase temprana de la septicemia experimental.

Los ratones inyectados al comienzo de la CLP con anticuerpos para el C5aR mostraron una supervivencia notablemente mejorada cuando se compararon con los animales que recibieron IgG no específica. En ratones tratados con anti-C5aR, los niveles en suero de la IL-6 y el TNF- α y los recuentos bacterianos en los diversos órganos fueron significativamente reducidos durante la CLP cuando se compararon con animales con CLP de control. Estos estudios demostraron que el bloqueo del C5aR es muy protector del resultado letal de la septicemia.

Se ha sugerido que es la localización de la C5a lo que puede ser crítico en términos de su potencial para proteger o perjudicar. La generación local de la C5a en tejidos es esencial para el control temprano de una infección. Se establece un gradiente de la C5a que provoca la quimiotaxis de los leucocitos. A mayores concentraciones de la C5a se detiene la quimiotaxis y las células producen su estallido de oxígeno tóxico. En la septicemia, la activación del complemento difuso en la sangre conduce a un exceso de C5a intravascular difusa que paraliza los neutrófilos permitiendo la proliferación no restringida de bacterias. Simultáneamente el secuestro de los neutrófilos en la microcirculación lesiona los pulmones, los riñones y el hígado. En este modelo, puede ser crítica la actuación del C5aR sobre los leucocitos en lugar del receptor sobre las células epiteliales del hígado, pulmones, etc. La intervención, por medio de antagonistas del C5aR puede revelarse terapéuticamente valiosa.

Lesión por isquemia-reperfusión (IR)

El sistema del complemento es un importante mediador del daño del tejido inflamatorio en diversas enfermedades incluyendo la lesión por isquemia-reperfusión (IR).

Las funciones relativas del C5a y el complejo de ataque a la membrana C5b-9 en mediar la lesión por IR parecen variar. En algunos modelos el C5a es el mediador importante. Los antagonistas de C5aR protegen a los ratones y ratas contra la lesión por IR en el intestino delgado y en los riñones (Heller et al., (1999) *J. Immunol.* 163(2): 985-94; Arumugam et al., (2003) *Kidney Int* 63(1): 134-42; Arumugam et al., (2002) *J. Surg. Res.* 103(2):260-7). En un modelo de lesión por IR en ganado porcino un antagonista del C5aR redujo marcadamente el tamaño del infarto de miocardio (Riley et al., (2000) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 120(2): 350-8).

Estudios con anticuerpos para la C5 también demuestran reducciones similares en lesiones por IR (Fitch et al., (1999) *Circulation* 100(25):2499-506; de Vries et al., (2003) *Transplantation* 75(3): 375-82).

Estudios clínicos y experimentales han mostrado que la IR de órganos, tales como riñones, hígado, pulmones y corazón induce una liberación rápida de diversas citoquinas. Aunque muchas de estas moléculas disminuyen en nivel después de la reperfusión, la IL-8 aumenta significativamente. La IL-8 es un potente quimioatrayente de neutrófilos. Los niveles de IL-8 se correlacionan negativamente con la función de los pulmones y los altos niveles están asociados con riesgo aumentado de muerte en el trasplante de pulmón. La administración intravenosa de anticuerpos anti-IL-8 al comienzo de la reperfusión reduce marcadamente la lesión en los pulmones y la infiltración de neutrófilos (de Perrot et al., (2003) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167(4):490-511).

Hay pruebas que muestran que la lesión por IR ocurre de un modo bifásico. Los macrófagos activados durante la isquemia median la fase temprana de la lesión, mientras que los neutrófilos y los linfocitos están implicados principalmente en la segunda fase retardada. El reclutamiento de neutrófilos y linfocitos da como resultado la liberación de citoquinas antes y después de la reperfusión.

Puesto que la C5a es un potente quimioatrayente para diversas células mieloides incluyendo macrófagos y neutrófilos e induce también la producción de citoquinas se considera que podría ser beneficioso bloquear el C5aR con anticuerpos específicos evitando la liberación de IL-8 y la migración de neutrófilos y reducir así la lesión por IR.

Síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y lesión pulmonar aguda (LPA)

Los SDRA y LPA son síndromes que resultan del edema y la inflamación pulmonares. El desarrollo de SDRA/LPA está asociado a varios trastornos clínicos incluyendo lesión pulmonar provocada por infección por neumonía, aspiración de contenido gástrico, traumatismo, septicemia, pancreatitis aguda, sobredosis de drogas y paso en derivación (bypass) cardiopulmonar. La septicemia es la causa principal del SDRA/LPA. Al igual que con la IR, la respuesta inflamatoria en la LPA está asociada al reclutamiento de grandes números de neutrófilos y monocitos en los espacios aéreos distales de los pulmones. Las moléculas proinflamatorias, tales como citoquinas, radicales oxigenados y proteasas juegan un papel y la excesiva inflamación puede empeorar el SDRA/LPA (Ware and Matthay (2000) *N. Engl. J. Med.* 342(18): 1334-49; Brower et al., (2001) *Chest* 120(4): 1347-67).

Se ha sugerido que podrían ser beneficiosas las estrategias antiinflamatorias para reducir el número de neutrófilos que emigran a los espacios extravasculares de los pulmones, para reducir la adhesión de neutrófilos al endotelio pulmonar y para reducir la liberación de factores quimiotácticos (Brower et al. (2001) *Chest* 120(4): 1347-67).

Estudios de pacientes con SDRA revelan que en las fases tempranas de la enfermedad altos niveles de IL-8 están presentes en el fluido BAL o el fluido del edema pulmonar. Además, los anticuerpos que neutralizan las IL-8 reduje-

ron la lesión pulmonar en el modelo en conejos (Brower et al., (2001) *Chest* 120(4): 1347-67).

Para SDRA y LPA bloquear el C5aR también puede ser un enfoque terapéuticamente viable. La C5a es una potente molécula quimiotáctica y estimuladora de la liberación de citoquinas. Los estudios descritos antes que usaron moléculas que antagonizan la C5a o el C5aR demostraron la reducción de la lesión en diversos modelos de inflamación.

5 Producción de compuestos identificados en los métodos de cribado de la invención

El método objeto descrito en la presente memoria comprende además producir o sintetizar el compuesto que se analiza en el animal modificado genéticamente.

Los compuestos de peptidilo se preparan convenientemente por síntesis estándar de péptidos, tal como el método de síntesis de Merrifield (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963) y la miriada de mejoras disponibles en esa tecnología (véase, por ejemplo, *Synthetic Peptides: A User's Guide*, Grant, ed. (1992), W.H. Freeman & Co., New York, pp. 382; Jones (1994) *The Chemical Synthesis of Peptides*, Clarendon Press, Oxford, pp. 230; Barany, G. and Merrifield, R. B. (1979) en *The Peptides* (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York; Wünsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Müller, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474.

Preferiblemente, el péptido se sintetiza sobre un soporte en fase sólida, tal como, por ejemplo, una perla de gel de poliestireno que comprende poliestireno reticulado con divinilbenceno, preferiblemente divinilbenceno al 1% (p/p), que se hincha más usando disolventes lipófilos, tal como, por ejemplo diclorometano o dimetilformamida (DMF). El poliestireno puede ser funcionalizado por adición de grupos de clorometano o aminometilo.

Alternativamente, los geles de polidimetil-acrilamida reticulados y funcionalizados se pueden usar una vez hinchados y solvatados usando DMF o un disolvente aprótico dipolar. También se pueden usar para la síntesis de péptidos otros soportes sólidos conocidos por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, perlas derivadas de polietilenglicol producidas injertando polietilenglicol en la superficie de perlas de poliestireno inerte. Los soportes sólidos preferidos comercialmente asequibles incluyen PAL-PEG-PS, PAC-PEG-PS, KA, KR o TGR (Applied Biosystems, CA 94404, USA).

Para la síntesis de péptidos en fase sólida, grupos bloqueantes que son estables durante los tratamientos repetidos necesarios para la eliminación del grupo bloqueante de amino de la cadena peptídica en crecimiento y para los acoplamientos repetidos de aminoácidos, se usan para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos durante la síntesis y para enmascarar la reactividad indeseada de los grupos funcionales α -amino, carboxilo o de la cadena lateral. Los grupos bloqueantes (también llamados grupos protectores o grupos enmascarantes) protegen por tanto al grupo amino del aminoácido que tiene un grupo carboxilo activado que está implicado en la reacción de acoplamiento o protegen al grupo carboxilo del aminoácido que tiene un grupo amino acilado que está implicado en la reacción de acoplamiento.

Durante la síntesis, el acoplamiento ocurre después de la eliminación de un grupo bloqueante sin rotura de un enlace peptídico ni de los grupos protectores unidos a la otra parte del péptido. Adicionalmente, se requiere que el anclaje péptido-resina que protege al extremo C del péptido esté protegido durante el proceso sintético hasta la escisión de la resina. Por consiguiente, por la selección juiciosa de los α -aminoácidos adecuadamente protegidos se añaden los aminoácidos en las localizaciones deseadas a un péptido en crecimiento mientras está todavía anclado a la resina.

Los grupos bloqueantes de amino preferidos son fácilmente eliminables, pero suficientemente estables para sobrevivir en condiciones para la reacción de acoplamiento y otras manipulaciones, tal como, por ejemplo, modificaciones en los grupos de las cadenas laterales. En una realización, los grupos de bloqueo de amino se seleccionan del grupo que comprende: (i) un grupo benciloxicarbonilo (Z o carbobenzoxi) que se elimina fácilmente por hidrogenación catalítica a temperatura ambiente y presión ordinaria o usando sodio en amoniaco líquido y ácido bromhídrico en ácido acético; (ii) un derivado de uretano; (iii) un grupo t-butoxicarbonilo (Boc) que se introduce usando azida de t-butoxicarbonilo o dicarbonato de di-terc-butilo y se elimina usando un ácido suave, tal como tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA al 50% en diclorometano) o HCl en ácido acético/dioxano/acetato de etilo; (iv) un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) que se escinde bajo condiciones suavemente básicas, no hidrolíticas, tal como, por ejemplo, usando una amina primaria o secundaria (por ejemplo, piperidina al 20% en dimetil-formamida); (v) un grupo 2-(4-bifenilil)propil(2)oxicarbonilo (Bpoc); (vi) un grupo 2-nitrofenilsulfenilo (Nps); y (vii) un grupo ditia-succinilo (Dts). El Boc es ampliamente usado para proteger el extremo N en química Fmoc o Fmoc es ampliamente usado para proteger el extremo N en química Boc.

Los grupos protectores de las cadenas laterales variarán para las cadenas laterales funcionales de los aminoácidos que forman el péptido que se sintetiza. Los grupos protectores de las cadenas laterales se basan generalmente en el grupo Bzl o el grupo tBu. Los aminoácidos que tienen alcoholes o ácidos carboxílicos en la cadena lateral se protegen como éteres de Bzl, ésteres de Bzl, ésteres de cHex, éteres de tBu o ésteres de tBu. La protección de la cadena

lateral de los aminoácidos con Fmoc requiere grupos bloqueantes que sean idealmente estables a las bases y lábiles a los ácidos débiles (TFA). Se han descrito muchos grupos protectores diferentes para la síntesis de péptidos (véase *The Peptides*, Gross et al. eds., Vol. 3, Academic Press, New York, 1981). Por ejemplo, el grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilfenilsulfonilo (Nd-Mtr) es útil para la protección de la cadena lateral de arginina, sin embargo, la desprotección de Arg(Mtr) requiere un tratamiento prolongado con TFA. Para proteger la cistina se usan cierto número de grupos lábiles a los ácidos débiles (TFA, trifluoroacetato de talio (III)/TFA) o grupos lábiles estables al TFA, pero no al trifluoroacetato de talio (III)/TFA o grupos estables a los ácidos débiles.

Las dos estrategias de protección más ampliamente usadas son las estrategias Boc/Bzl y Fmoc/tBu. En Boc/Bzl, se usa Boc para la protección de amino y las cadenas laterales de los diversos aminoácidos se protegen usando grupos protectores basados en Bzl o cHex. Un grupo Boc es estable en condiciones de hidrogenación catalítica y se usa adecuadamente junto con un grupo Z para la protección de muchos grupos de cadenas laterales. En Fmoc/tBu, se usa Fmoc para la protección de amino y las cadenas laterales se protegen con grupos protectores basados en tBu.

Alternativamente, el compuesto de peptidilo se produce por la expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de dicho péptido. Las genotecas que codifican péptidos aleatorios son particularmente preferidas para estos fines, porque proporcionan una amplia gama de diferentes compuestos para analizar. Alternativamente, se pueden cribar ácidos nucleicos de origen natural. De acuerdo con esta realización, el ácido nucleico que codifica el compuesto de peptidilo se produce por síntesis estándar de oligonucleótidos o procede de una fuente natural y se clona en un vector de expresión adecuado en conexión operativa con un promotor u otra secuencia reguladora capaz de regular la expresión en un sistema exento de células o en un sistema celular.

Los oligonucleótidos se sintetizan preferiblemente con secuencias de enlazador o adaptador en los extremos 5' y 3' para facilitar la clonación subsiguiente en un sistema vector adecuado usando técnicas estándares.

Colocar una molécula de ácido nucleico bajo el control regulador de, es decir, "en conexión operativa con", una secuencia de promotor significa posicionar dicha molécula de tal modo que la expresión esté controlada por la secuencia del promotor, generalmente posicionando el promotor hacia el extremo 5' de la secuencia que codifica el péptido.

El requisito previo para producir péptidos intactos en bacterias, tales como *E. coli* es el uso de un promotor fuerte con un sitio eficaz de unión al ribosoma. Los promotores típicos adecuados para la expresión en células bacterianas, tales como *E. coli* incluyen, pero sin limitación, el promotor *lacZ*, los promotores λ_L o λ_R sensibles a la temperatura, el promotor T7 o el promotor *tac* inducible por IPTG. Son bien conocidos en la técnica y están descritos cierto número de otros sistemas vectores para expresar la molécula de ácido nucleico de la invención en *E. coli*, por ejemplo, en Ausubel et al (en: *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, ISBN 047150338, 1987) o Sambrook et al (en: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Se han descrito numerosos plásmidos con secuencias de promotor adecuadas para la expresión en bacterias y sitios eficientes de unión al ribosoma, tales como por ejemplo, pKC30 (λ_L : Shimatake and Rosenberg, *Nature* 292, 128, 1981); pKK173-3 (*tac*: Amann and Brosius, *Gene* 40, 183, 1985), pET-3 (T7: Studier and Moffat, *J. Mol. Biol.* 189, 113, 1986); la serie de vectores pBAD/TOPO o pBAD/Thio-TOPO que contienen un promotor inducible por arabinosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), el último de los cuales está diseñado para producir también proteínas de fusión con tiorredoxina para potenciar la solubilidad de la proteína expresada; las series de vectores de expresión pFLEX (Pfizer Inc., CT, USA); o la serie de vectores de expresión pQE (Qiagen, CA), entre otros.

Los promotores típicos adecuados para la expresión en virus y células procariotas y células eucariotas incluyen el promotor tardío de SV40, el promotor temprano de SV40 y el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor CMV IE (citomegalovirus inmediato temprano) entre otros. Los vectores preferidos para la expresión en células de mamíferos (por ejemplo, 293, COS, CHO, células 10T, células 293T) incluyen, pero sin limitación, el juego de vectores de pcDNA suministrado por Invitrogen, en particular pcDNA 3.1 cola de myc-His que comprende el promotor de CMV y que codifica una cola de 6xHis y MYC en extremo C; y el vector de retrovirus pSR α tkneo (Muller et al., *Mol. Cell. Biol.*, 11, 1785, 1991). El vector pcDNA 3.1 myc-His (Invitrogen) es particularmente preferido para expresar péptidos en una forma secretada en células 293T, en donde el péptido o proteína expresado puede ser purificado de proteínas de la misma especie, usando técnicas de afinidad estándares que emplean una columna de níquel para fijar la proteína mediante la cola de His.

Están disponibles públicamente una amplia gama de sistemas hospedantes/vectores adicionales adecuados para expresar péptidos y están descritos, por ejemplo, en Sambrook et al (en: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Son bien conocidos por los expertos en la técnica medios para introducir el ácido nucleico o una construcción génica que lo comprende en una célula para su expresión. La técnica usada para un organismo dado depende de técnicas satisfactorias conocidas. Los medios para introducir DNA recombinante en células de animales incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, tal como la que usa lipofectamina (Gibco, MD, USA) y/o cellfectina (Gibco, MD, USA), absorción de DNA mediada por PEG, electroporación y bombardeo con micropartículas, tal como el que usa partículas de wolframio u oro revestidas con DNA (Agracetus Inc., WI, USA) entre otros.

Las técnicas para sintetizar compuestos orgánicos pequeños variarán considerablemente dependiendo del compuesto, sin embargo, dichos métodos serán bien conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, se usan programas informáticos para seleccionar bloques de construcción químicos adecuados a partir de compuestos conocidos, para producir una quimioteca combinatoria. Por ejemplo, el método de construcción de modelos de relaciones cuantitativas estructura-actividad (abreviadamente QSAR por la expresión inglesa *Quantitative Structure Activity Relationship*) usa regresiones o árboles de regresiones lineales de estructuras de compuestos para determinar la idoneidad. El programa informático de Chemical Computing Group, Inc. (Montreal, Canadá) usa datos experimentales de cribado de alta productividad de compuestos activos, así como inactivos, para crear un modelo QSAR probabilístico, el cual se usa subsiguientemente para seleccionar compuestos cabezas de serie. El método QSAR binario se basa en tres propiedades características de compuestos que forman un "descriptor" de la probabilidad de que un compuesto particular realice o no una función requerida: carga parcial, refractividad molar (interacciones de unión) y logP (lipofilicidad de la molécula). Cada átomo tiene un área superficial en la molécula y tiene tres propiedades asociadas con la misma. Se determinan todos los átomos de un compuesto que tienen una carga parcial en cierto intervalo y se suman las áreas superficiales (descriptor de área superficial de Van der Walls). Los modelos QSAR binarios se usan luego para construir modelos de actividad o modelos ADMET, que se usan para construir una quimioteca combinatoria. Por consiguiente la información de supresores y no supresores deseados, incluyendo compuestos cabezas de serie identificados en los cribados iniciales se puede usar para ampliar la lista de compuestos que se criban para identificar de este modo compuestos altamente activos.

En una realización, el método objeto comprende además formular el compuesto identificado para la administración a un animal no humano o humano. Las formulaciones pueden ser adecuadas para la administración por inyección por una vía subcutánea, intravenosa, intranasal o intraperitoneal. Alternativamente, pueden ser adecuadas para administración oral en la forma de aditivos alimentarios, comprimidos, trociscos, etc.

Los compuestos se formulan convenientemente en un excipiente o diluyente adecuado, tal como, por ejemplo, un disolvente acuoso, un disolvente no acuoso, un excipiente no tóxico, tal como una sal, conservante, tampón y similares. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los disolventes acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales, tal como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la formulación adecuados para administración al animal se ajustan de acuerdo con las prácticas de rutina. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil-parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tal como ácido etilenediamintetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tal como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede estar encerrada en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener uno de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente disgregante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. Para administración por inhalación, los compuestos se suministran en la forma de una pulverización por aerosol desde recipientes o dispensadores presurizados que contienen un agente propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador. Para administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que ha de ser atravesada. Dichos agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede conseguir a través del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como es generalmente conocido en la técnica.

Opcionalmente, la formulación incluirá también un vehículo, tal como, por ejemplo, seroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapa bocallave (KLH), ovalbúmina, seroalbúmina de ratón, seroalbúmina de conejo y similares. También se conocen en la técnica medios para conjugar péptidos a proteínas vehículos (soportes) e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotada.

La presente invención se ilustrará ahora por los siguientes Ejemplos, que de ningún modo han de entenderse como limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de una construcción diana para producir un ratón con el gen de C5aR humano activado

Para producir una raza de ratones mutantes mediante recombinación homóloga se necesitan dos elementos principales. Una línea de células madre embrionarias (ES) capaz de contribuir a la línea germinal y una construcción diana que contenga secuencias del gen diana con la mutación deseada. El mantenimiento de las células ES en su estado no diferenciado se consigue haciendo crecer células sobre una capa de células alimentadoras. La construcción diana se transfecta luego a células ES cultivadas. Las líneas de células ES proceden de la masa celular interna de un embrión en la fase de blastocisto. La recombinación homóloga ocurre en un pequeño número de células transfectadas, dando como resultado la introducción de la mutación presente en la construcción diana en el gen diana.

Una vez identificados, los clones de células ES mutantes pueden ser microinyectados en un blastocisto normal para producir un ratón quimérico. Debido a que muchas líneas de células ES retienen la capacidad de diferenciarse en cada tipo de célula presente en el ratón, la quimera puede tener tejidos, incluyendo la línea germinal, con contribución tanto del blastocisto normal como de las células ES mutantes. La reproducción de ratones quimeras de la línea germinal proporciona animales que son heterocigóticos para la mutación introducida en la célula ES y pueden ser cruzados para producir ratones mutantes homocigóticos.

Como se muestra en la Figura 1, la construcción diana usada para reemplazar la secuencia del C5aR de ratón endógeno por la secuencia del C5aR humano contiene dos regiones de homología para el gen diana localizadas a ambos lados de un marcador seleccionable positivo (PGK-Neo, un gen híbrido que consiste en el promotor de la fosfoglicerato-quinasa I que activa el gen de la neomicina-fosfotransferasa). La recombinación homóloga transcurre mediante un evento de doble cruzamiento que reemplaza las secuencias del gen diana por las secuencias de la construcción de reemplazo. Debido a que no se produce ninguna duplicación de secuencias, el gen normal no puede ser regenerado.

Cuando la construcción diana es linealizada, el gen neo está flanqueado por dos regiones de homología con el gen diana. La selección de las células usando fármacos (por ejemplo, G418) elimina la gran mayoría de células que no tienen establemente incorporada la construcción.

Aunque muchos métodos de inactivación de genes que implican recombinación homóloga todavía usan construcciones que dejan el marcador seleccionable positivo en el DNA genómico, ha llegado a quedar cada vez más claro que esto puede causar cierto número de efectos no previstos. Por ejemplo, la presencia del gen neo, frecuentemente con su propio promotor, puede alterar la expresión de los *loci* vecinos. Esto puede ser un problema particular en agrupaciones de genes en las que los genes vecinos son de la misma familia, puesto que los genes afectados pueden tener funciones idénticas o similares. Como resultado, ligeras diferencias en las construcciones diana condujeron a diferencias marcadas en el fenotipo.

Por esta razón la construcción diana ilustrada en este ejemplo incluye sitios loxP que flanquean el gen PGK-neo, de modo que el marcador seleccionable pueda ser eliminado después de servir como diana por expresión transitoria de la Cre-recombinasa. Esto dejará un pequeño sitio loxP en el DNA genómico, pero la construcción puede ser manipulada genéticamente de modo que éste se encuentre en una localización inocua (Figura 2). Aunque teóricamente incluso un sitio loxP podría causar alteraciones en la expresión de genes vecinos, hasta ahora no se ha informado de ninguno de tales casos. La eficacia de la recombinación de Cre procedente de la expresión transitoria descrita en la bibliografía varía ampliamente desde ~2% hasta ~15%. Esta tasa debe ser distinguida de la eficacia de la recombinación de Cre *in vivo*, en donde la expresión de Cre proviene de las secuencias integradas en el genoma y por tanto mostrará una expresión de mayor duración en casi todos los casos.

La SEQ ID NO:1 muestra la secuencia de DNA genómico de ratón (~22 kb) que abarca el gen C5aR (C5r1). La SEQ ID NO:2 muestra la secuencia de cDNA del C5aR humano y la SEQ ID NO:3 muestra la secuencia de la proteína C5aR humana.

La región genómica del ratón como se muestra en la SEQ ID NO:1 (el *locus* diana) se caracteriza como sigue:

exón 1: nucleótidos 757-784 (región no traducida 5')

exón 2: nucleótidos 1048-1152 (región no traducida 5' más codón de iniciación)

exón 3: nucleótidos 10726-11778 (toda la secuencia codificadora excepto ATG).

La Figura 3 muestra un mapa de restricción de la secuencia de 22 kb mostrada en la SEQ ID NO:1. Los sitios de restricción relevantes son como sigue:

Enzima:	Nº de cortes	Posiciones			
EcoRI	2	18462	19176		
EcoRV	4	199	5337	9151	18964
NdeI	2	7698	18758		
XbaI	4	1351	15968	16852	20902

El vector diana usado para generar los ratones con el gen activado incluye regiones homólogas al DNA genómico de aproximadamente 3 kb a ambos lados del exón 3 (es decir, aproximadamente los nucleótidos 7377-15045 como se muestra en la SEQ ID NO:1). En particular, el vector diana comprendía la región de aproximadamente los nucleótidos 7377-15045 de la SEQ ID NO:1, excepto que los nucleótidos 10726-11778 estaban reemplazados por los nucleótidos 28 a 1077 de la SEQ ID NO:2. Esto significa que después de la integración, los exones endógenos 1 y 2 de ratón permanecen en el mamífero transgénico, pero el exón 3 del *locus* del ratón ha sido reemplazado por una secuencia que codifica el C5aR humano.

Ejemplo 2: Transfección e identificación de células madres embrionarias de ratón que contienen el gen C5aR humano

A continuación se proporciona un protocolo básico para el cultivo de células madre embrionarias y para la introducción de la construcción diana en células ES. Este protocolo también describe el método para identificar clones en los cuales el gen diana ha sido alterado por recombinación homóloga. Los recombinantes homólogos resultantes son heterocigóticos para el C5aR humano y se pueden usar para producir ratones transgénicos homocigóticos para el gen C5aR humano. En este ejemplo la células ES procedían de ratones C57BL/6.

Materiales

Construcción diana

Células madres embrionarias (ES)

Medio ES/LIF

Tripsina/EDTA: tripsina al 0,25% (p/v) / EDTA 1 mM (HEPES 20 mM, pH 7,3, opcional)

Medio ES

Tampón de electroporación

G418

Medio de congelación

Tampón de digestión

NaCl saturado

Gel de agarosa al 1%

Transfección de la construcción y selección de células ES

1. Cultivar células ES en medio ES/LIF. Someter las células a pases cada 2 a 3 días sembrando una placa de cultivo de tejidos revestida con gelatina de 100 mm con $1-2 \times 10^6$ células/placa. El factor inhibidor de leucemia (LIF) impide que las células ES se diferencien. Puede ser preferible someter las células a pases a una densidad mayor si se planifica la inyección en blastocistos de las células (por ejemplo, $1,5 \times 10^6$ células por matraz de 25 cm²).

2. Recolectar $\sim 5 \times 10^6$ a 1×10^7 células añadiendo tripsina/EDTA e incubando durante ~ 5 minutos hasta que las células estén liberadas en la superficie de la placa. Disociar las células individuales pipeteando arriba y abajo de cinco a diez veces. Añadir 5 ml de medio ES. Sedimentar las células y volver a poner en suspensión en el mismo tubo el sedimento celular en 1 ml de tampón de electroporación. Típicamente, se pueden obtener 10^7 células de una placa de 100 mm de cultivo de tejidos casi confluyente.

3. Añadir 1 pmol del DNA de la construcción estéril linealizada.

4. Someter a electroporación la mezcla a 450 V y 250 μ F en una cubeta de electroporación de 4 mm. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Con las células madre embrionarias se pueden usar muchas condiciones de

electroporación.

5. Cultivar las células en placa en un medio ES a $\sim 2 \times 10^6$ células por placa de cultivo de tejidos de 100 mm revestida de gelatina. Incubar 24 horas.

5 6. Comenzar la selección cambiando el medio ES por el medio ES/LIF y añadiendo G418 a 0,2 mg/ml y GANC a 2 μ M (final).

10 7. Continuar la incubación, cambiando el medio diariamente usando medio ES/LIF y añadiendo G418 (0,2 mg/ml final), hasta que sean visibles colonias aisladas individuales (típicamente 1 semana después de la electroporación). Retirar una colonia individual de la placa usando una punta de pipeta tratada en autoclave, y colocarla en una gota de 35 μ l de tripsina/EDTA durante 5 minutos. Pipetear arriba y abajo aproximadamente cinco veces hasta disociar las células. Transferir las células a un pocillo de una placa de microtitulación de 24 pocillos revestida de gelatina que contenga 1 ml de medio ES/LIF.

15 8. Incubar hasta que sean visible colonias, pero no se diferencien las células (típicamente 3 a 4 días). Someter a pases la mitad de las células a un pocillo de una placa de microtitulación limpia de 24 pocillos revestida de gelatina. Añadir las células restantes a 0,5 ml de medio de congelación y colocar la placa a -70°C . Congelar durante la noche y luego transferir a nitrógeno líquido. Las células no diferenciadas crecen en colonias lisas redondas. Las células diferenciadas son más planas con bordes intercelulares definidos. Realizar inmediatamente la etapa 9 después de colocar la mitad de las células en el congelador.

Cribado de los recombinantes homólogos

20 9. Incubar células ES en una placa de microtitulación de 24 pocillos (etapa 14) hasta casi confluencia (usualmente 2 a 3 días). Debido a que no es crítico impedir la diferenciación de las células ES en esta etapa, se puede omitir LIF del medio de cultivo; sin embargo, la presencia de LIF puede ayudar a mantener el crecimiento celular.

10. Añadir 300 μ l de tampón de digestión a cada pocillo. Transferir el contenido de los pocillos a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e incubar durante la noche a 55°C .

25 11. Añadir 150 μ l de NaCl saturado y agitar con vórtice vigorosamente (la solución se volverá blanca lechosa). Añadir 2 volúmenes de etanol al 95% (la solución se volverá trasparente excepto el DNA precipitado). Algunos investigadores precipitan el DNA usando 2 volúmenes de etanol (o 1 volumen de isopropanol) sin añadir sal. Sin embargo, el sedimento de DNA se vuelve a poner en suspensión poner en suspensión más fácilmente si se añade sal.

12. Volver a poner en suspensión el sedimento de DNA en 50 μ l de agua. Determinar la concentración de DNA midiendo la absorbancia a 260 nm.

30 13. Digerir 10 μ g de DNA (o 10 μ l si no se determinó la concentración de DNA) con la enzima de restricción adecuada.

14. Fraccionar el DNA digerido en un gel de agarosa al 1%. Transferir a una membrana de nilón e hibridar por transferencia Southern a una sonda de hibridación del gen diana adecuada para distinguir el gen diana inalterado de un gen diana que haya experimentado recombinación homóloga.

35 15. Seleccionar colonias de células ES que muestren dos fragmentos de hibridación de aproximadamente igual intensidad – un fragmento del tamaño predicho para el gen diana inalterado y un fragmento del tamaño predicho para un gen diana que haya experimentado recombinación homóloga. Si los dos fragmentos son de intensidad de hibridación desigual, la población de células puede no ser clonal. Congelar las células y conservarlas en nitrógeno líquido.

40 Un total de 672 colonias de células ES transfectadas con la construcción diana hC5aR se cribaron para detectar recombinación homóloga entre la construcción diana y el genoma del ratón.

45 El DNA extraído de las colonias de células ES se digirió con EcoRV o XbaI y se sometió a electroforesis a través de un gel de agarosa. El DNA se transfirió a un filtro (por el método Southern) y se hibridó a un DNA sonda marcado con ^{32}P en 5' o 3' usando condiciones estándares. Después de lavar, el filtro se expuso a una película de rayos X. Este cribado proporcionó tres colonias que contenían el gen C5aR humano. A dos de estas colonias (5H1 y 6C8) se les identificaron un gen C5aR humano correctamente integrado en el *locus* del gen C5aR de ratón (los datos no se muestran).

Ejemplo 3: Implantación de células ES, generación de quimeras y transmisión de líneas germinales del gen C5aR humano

50 El método estándar para generar quimeras con células ES usa embriones de ratón de 3 a 5 días (blastocistos). Los embriones en esta etapa tienen una gran cavidad llena de fluido en la cual se pueden colocar por inyección las células ES. Los blastocistos ya han salido de los oviductos y se encuentran en las trompas uterinas. Para las inyeccio-

nes, deben ser recolectados antes de eclosionar (pérdida de zona pelúcida) y unirse a la pared uterina. Para generar blastocistos para inyecciones de células ES se usan diversas razas de ratones. En este ejemplo se usó la raza de ratones Balb/c para generar blastocistos. Esta raza proporciona un número razonable de embriones. Tiende a producir quimeras de alta calidad que se pueden distinguir fácilmente por el color del pelaje cuando se usan con células ES procedentes de una variedad de sub-razas de C57BL/6.

Las células ES de las colonias, 5H1 y 6C8 se inyectaron en ~200 blastocistos. Los blastocistos fueron implantados en ratones hembras pseudo-preñadas. Nacieron unas 17 quimeras con color de pelaje entre 5 y 50% de piel negra. Las 13 quimeras machos se aparearon con hembras C57BL/6 y produjeron unos 300 cachorros. Se observó la transmisión de líneas germinales del gen C5aR humano en 19 cachorros de 5 parejas de apareamiento quimera x C57BL/6.

La presencia del *locus* C5aR humano se confirmó por transferencia Southern. El DNA genómico extraído de la cola de los ratones se digirió con EcoRV, se sometió a electroforesis y se hibridó a la sonda 3'. El filtro se desmontó y se volvió a sondear con la sonda Neo. Cierta número de ratones mostraron el gen C5aR. El genotipo de estos ratones se denominó hC5aRflox(ed)(neoR)/wt (abreviado H5Rf/+).

Ejemplo 4: Reproducción e identificación de ratones homocigóticos para el gen C5aR humano

Una generación de ratones H5Rf/+ se aparearon con ratones C57BL/6 supresores del Cre para eliminar el gen marcador neoR generando de este modo ratones H5R/wt/Cre. Los ratones H5R/wt/Cre se aparearon con ratones C57BL/6 para eliminar el gen Cre, generando de este modo ratones H5R/wt heterocigóticos (H5R/+). Los apareamientos entre los ratones H5R/+ produjeron ratones homocigóticos con genes activados H5R/H5R. También se establecieron algunos apareamientos H5Rf/+ x H5Rf/+ y generaron homocigotos H5Rf/H5Rf.

La confirmación de que los ratones llevan el gen C5aR humano se realizó usando un ensayo de genotipado basado en la PCR. El ensayo de genotipos por transferencia Southern usado anteriormente para identificar ratones que llevan el gen C5aR humano se basó en la hibridación con una sonda de DNA específica de ratón (no una sonda específica del gen C5aR humano). El ensayo de PCR descrito más adelante utilizó cebadores que específicamente amplifican las secuencias del gen C5aR humano o de ratón.

Preparación del DNA de la cola

Puntas de colas de 3 mm se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml y se incubaron durante una noche a 65°C en 200 µl de tampón de aislamiento de DNA (Tris-Cl 67 mM, pH 8,0 (Calbiochem), sulfato de amonio 16,6 mM (Sigma), cloruro de magnesio 6,5 mM (Promega), β-mercaptoetanol al 1% (ICN Biomedical) y Triton X100 al 0,05% (Sigma)). El líquido sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml que contenía 500 µl de etanol al 100% (UNIVAR), se mezcló y se incubó durante 2 horas a -20°C, luego se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y 13.000 rpm (Labofuge 400R, Heraeus Instruments) para precipitar el DNA genómico purificado. El sedimento de DNA se lavó en etanol al 70% y se dejó secar antes de volver a ponerlo en suspensión en 50 µl de agua destilada. Se usó una parte alícuota de 1 µl como el DNA molde en el siguiente ensayo de PCR.

PCR para amplificar genes del C5aR humano y de ratón

Cada mezcla de reacción de PCR contenía 5 µl de tampón 10x PCR libre de magnesio, 5 µl de cloruro de magnesio 25 mM, 0,5 µl de Taq DNA-polimerasa (2,5 unidades/µl), 1 µl de los dNTP 10mM (Promega), 1 µl de cada cebador oligonucleotídico 10 mM (F1C, R2a, F3C y R4C) y 1 µl del DNA molde. El volumen total se completó hasta 50 µl con agua destilada. Los cebadores oligonucleotídicos usados fueron:

5'-TGGACTACAGCCACGACAAACG-3' (F1C) (SEQ ID NO:4) y

5'-AGGAAGGACATCATTATCCCCG-3' (R2a) (SEQ ID NO:5),

ambos específicos para el exón 3 de C5aR humano; y,

5'-CACCAGCCCCGAGATTTTTC-3' (F3C) (SEQ ID NO:6) y

5'-TCAGAAACCAGATGGCGT-3' (R4C) (SEQ ID NO:7),

ambos específicos para el gen C5aR de ratón.

Las secuencias diana se amplificaron luego usando un termociclador de PCR System 2700 (Applied Biosystems). La PCR empezó con una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, seguida por 25 ciclos de tres etapas: 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. Una etapa de extensión final: 5 minutos a 72°C fue seguida por conservación a 4°C.

Electroforesis en gel

El genotipo de cada muestra se visualizó usando electroforesis en gel con 10 µl del producto de la PCR y 6x coloran-

te de carga (Promega). El gel consistía en 80 ml de agarosa de calidad para DNA al 1,5% (Progen) en 1x TBE y 2 µl de bromuro de etidio (MP Biomedicals). Las muestras se hicieron correr a 100 voltios durante 30 minutos junto con una cadena de DNA de 1 kb (Promega). Se esperó que el DNA de ratones homocigóticos H5Rf/H5Rf tendría una sola banda de 237 pb, el DNA de ratones heterocigóticos H5Rf/+ tendría bandas de 237 pb y 565 pb y el DNA de los ratones de tipo natural de ratón tendría una sola banda de 565 pb. El análisis del gel mostró que los ratones nº 10, 24 y 25 eran homocigóticos (H5Rf/H5Rf) (datos no mostrados). En algunas muestras, se observó un transcrito irrelevante de una longitud de 1139 pb (amplificado con los cebadores F3C y R2a).

La localización relativa en el *locus* del C5aR ratón/humano de los cebadores de la PCR, F1C, R2a, F3C y R4C, usados en el ensayo de genotipado se muestra en la Figura 4.

Ejemplo 5: El C5aR humano se expresa en células aisladas de ratón con el gen activado

Para confirmar que el receptor de la C5a humana se expresa en ratones que llevan el gen C5aR humano se aislaron neutrófilos de la sangre de un ratón de tipo natural (+/+), un heterocigoto (H5Rf/+) y un homocigoto (H5Rf/H5Rf).

Tinción con inmunofluorescencia directa de C5aR en sangre completa de ratón

Se recogieron aproximadamente 30 µl de sangre venosa periférica de ratones homocigóticos (H5Rf/H5Rf), heterocigóticos (H5Rf/+) y de tipo natural (+/+) en un tubo que contenía EDTA (la concentración final de EDTA fue 5 mM). Para la detección del receptor C5aR humano se tiñeron 30 µl de sangre con 5 µl de 7F3 marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína, Sigma), un anticuerpo específico para el C5aR humano (7F3 no da reacción cruzada con el C5aR de ratón). La sangre y el anticuerpo se incubaron en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para lisar los eritrocitos y fijar las células se añadieron 500 µl de solución de lisis BD (Becton Dickinson) a la solución de sangre/anticuerpo. Después de 15 minutos las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente y el sedimento celular se volvió a poner en suspensión en 1 ml de tampón de lavado (1 x PBS, BSA al 0,1%, azida de sodio al 0,02%). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) usando el programa informático *Cell Quest* (Becton Dickinson). Para cada muestra se contaron aproximadamente 5.000 células.

La Figura 5 muestra los resultados de este análisis. Los neutrófilos tanto de los ratones KI homocigóticos como heterocigóticos se unieron al 7F3, un anticuerpo específico para el C5aR humano. En contraste, los neutrófilos de ratones de tipo natural no se tiñeron por 7F3. Los linfocitos de todos los genotipos de los ratones no se tiñeron con el mAb 7F3. Esto era lo esperado puesto que el C5aR no se expresa en los linfocitos. Los monocitos procedentes de los ratones homocigóticos y heterocigóticos con el gen activado fueron teñidos parcialmente con 7F3, lo que indica que un pequeño porcentaje de las células expresó el C5aR humano. Ninguno de los monocitos procedentes del ratón de tipo natural dio positivo en la tinción con 7F3.

En resumen, los ratones que llevan el gen C5aR humano expresan el C5aR humano en la superficie de los tipos esperados de células. Esto indica que la célula de ratón es capaz de expresar y procesar el receptor de la C5a humana.

Ejemplo 6: Los ratones con el gen C5aR humano activado se pueden usar para cribar compuestos anti-inflamatorios

Para demostrar la utilidad de los ratones con el gen C5aR humano activado los autores de la presente invención sometieron ratones homocigóticos (H5Rf/H5Rf) a un modelo de enfermedad inflamatoria, en concreto al modelo K/BxN de artritis reumatoide.

Los ratones transgénicos (tg) K/BxN TCR expresan un TCR (receptor de linfocitos T) codificado por el transgén reactivo a un auto-péptido procedente de la enzima glicolítica omnipresentemente expresada, la glucosa-6-fosfatoisomerasa (GPI), presentada por la molécula Ag7 de la clase II del MHC. Estos animales desarrollan espontáneamente una forma muy agresiva de artritis, que comienza a una edad de 3 a 4 semanas. Al igual que en los seres humanos, la enfermedad es crónica, progresiva y simétrica, y presenta la mayoría (aunque no todos) los aspectos clínicos, histológicos e inmunológicos de la artritis reumatoide (AR) en seres humanos. Los aspectos histológicos incluyen invasión de leucocitos, sinovitis, formación de paño, cartilago y destrucción ósea. El trastorno es críticamente dependiente tanto de los linfocitos T como de los B, es específico de las articulaciones pero se inicia, y luego se perpetúa, por la auto-reactividad de los linfocitos T y luego los B para un antígeno omnipresentemente expresado, GPI.

Sorprendentemente, la transferencia de suero (o las IgG anti-GPI purificadas por afinidad) procedente de ratones K/BxN artríticos a animales sanos provoca artritis en unos días, incluso cuando los receptores están exentos de linfocitos.

Protocolo de transferencia de sueros, tratamiento con anticuerpos y puntuación de la artritis.

Se mezclaron sueros de ratones K/BxN artríticos de 60 días y se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) (150 µl de volumen total) en ratones homocigóticos (H5Rf/H5Rf) de 6 - 9 semanas y en ratones de tipo natural (+/+) en cada

uno de los días 0 y +2. Se inyectó i. p. en los ratones cada uno de los días -1 y + 3 un anticuerpo estéril (200 µg del anticuerpo 7F3 – isotipo IgG2a anti-C5aR humano de ratón o 200 µg del anticuerpo de control del isotipo IgG2a) en PBS.

5 La artritis se puntuó diariamente por examen clínico durante 10-14 días. La gravedad de la artritis en cada pata afectada se clasificó gradualmente como sigue:

0 puntos: sin indicios de inflamación

1 punto: inflamación sutil (articulaciones de las falanges metatarsianas, falange individual o edema localizado)

2 puntos: hinchazón fácilmente identificada pero localizada en la superficie dorsal o ventral de la pata.

3 puntos: hinchazón en todos los aspectos de la pata.

10 La suma de las puntuaciones de las cuatro patas en cada ratón se definió como la puntuación clínica (máxima puntuación por animal = 12) y representa la gravedad y progresión global de la enfermedad en un animal.

El grosor de los tobillos se midió cada día usando un calibrador. El grosor de cada tobillo trasero se midió dos veces y se calculó la media de las 4 medidas. El grosor de los tobillos se definió como la diferencia en el grosor de los tobillos desde la medida del día 0. Los ratones se pesaron diariamente.

15 Histología

20 El método básico de fijación, descalcificación, cortes en parafina y tinción con hematoxilina/eosina de secciones de articulaciones es como se ha descrito (Kouskoff et al., 1996, *supra*). Para la inmunohistología se obtienen cortes criostáticos no fijados y no descalcificados. Dicho resumidamente, las articulaciones de los tobillos diseccionadas sin piel se embeben en OCT, se congelan en isopentano en nieve carbónica y se montan en un soporte de cromicrotomo a -25°C. Después de recortar el bloque de tejido hasta un nivel deseado, una cinta transparente se fija a la superficie de la sección del bloque. Se cortan secciones sagitales (6 u 8 mm de espesor) por debajo de la cinta y el tejido se transfiere subsiguientemente a un portaobjetos revestido con adhesivo. Los portaobjetos se conservan a -80°C hasta su uso, luego se fijan con acetona durante 30 segundos a 1 minuto y se secan al aire durante 30 minutos. Los núcleos se someten a una contratinción con 50 ng de DAPI (Molecular Probes).

25 Los ratones homocigóticos con el gen C5aR activado desarrollan una enfermedad inflamatoria.

30 Para inducir una enfermedad inflamatoria los ratones homocigóticos con el gen C5aR humano activado (respecto al C57BL/6) y los ratones de tipo natural/de control (C57BL/6) fueron inyectados con suero de K/BxN. Estudios previos han determinado la dosis óptima de suero requerida y el lapso de tiempo esperado para la inflamación en el modelo K/BxN de la artritis reumatoide. En este experimento todos los ratones fueron inyectados i.p. con 2 lotes de 150 µl de suero recogido de ratones K/BxN artríticos. Se esperaba que los ratones de tipo natural mostrarían signos de inflamación a los 4 de la inyección del suero.

35 Los autores del presente invento también esperaban que los ratones con el gen C5aR humano activado mostraran signo de inflamación si se expresa el gen hC5aR y la proteína receptora se procesa correctamente y se acopla al sistema de señalización de la proteína G. En primer lugar, la afinidad de la C5a humana por el receptor de la C5a en células de ratón y humanas es muy similar (Woodruff et al., 2001, *Inflammation*, v25, pp.171-177) lo que sugiere que la afinidad del C5aR de ratón por el receptor de la C5a humana sería similar a su afinidad por el C5aR de ratón. En segundo lugar, los estudios con ratones deficientes en C5aR han mostrado que la ausencia de C5aR impide la inflamación en el modelo K/BxN (Ji et al., 2002, *Immunity*, v16, pp.157-168). Por tanto, si el gen C5aR humano no se expresó o el receptor C5aR humano no estaba funcionando correctamente entonces los ratones homocigóticos con hC5aR no mostraría signos de inflamación después de la inyección de suero de K/BxN.

45 En este modelo los signos clínicos externos de inflamación son edema y enrojecimiento de las patas, particularmente las patas traseras. Antes y cada día después de la inyección del suero se pesaron los ratones y se midieron los grosores de sus tobillos traseros, y se realizó una puntuación clínica como se ha descrito antes. La Figura 6 muestra el aumento en el grosor de los tobillos y la puntuación clínica para ratones de tipo natural y homocigóticos a los que se ha inyectado el suero de K/BxN. El progreso de la enfermedad en los ratones homocigóticos con el gen hC5aR activado fue el mismo que en los ratones de control con inflamación aparente que comenzaba el día 3 después de la inyección de suero. Esto demuestra que es normal la expresión y procesamiento del receptor de la C5a humana en los ratones con el gen activado.

50 El examen histológico del corte transversal de los tobillos de ratones realizado el día 13 después de la inyección del suero en este modelo revela erosión ósea e infiltración de leucocitos en la articulación sinovial. El grado de la destrucción de tejidos y la acumulación de leucocitos fueron similares en los ratones homocigóticos con el gen hC5aR activado y los ratones de control (los datos no se muestran).

Los ratones homocigóticos con el gen C5aR humano activado se pueden usar para analizar compuestos con propiedades anti-inflamatorias.

- 5 Los ratones con el gen C5aR humano activado fueron desarrollados como una herramienta útil para cribar compuestos anti-C5aR humano con actividad anti-inflamatoria. Para analizar la utilidad de los ratones se administró tanto a los ratones homocigóticos con hC5aR como a los de tipo natural (de control) un anticuerpo específico para el C5aR humano (que no se une al C5aR de ratón) o un anticuerpo de control (del mismo isotipo pero especificidad irrelevante) en el modelo K/BxN y se determinó el efecto del anticuerpo sobre el progreso de la enfermedad inflamatoria. El anticuerpo se inyectó i.p. dos veces (200 µg por dosis), un día antes y un día después de la primera inyección de suero de K/BxN. Los ratones fueron monitorizados como se ha descrito antes.
- 10 La Figura 7 muestra el progreso clínico de la enfermedad y el engrosamiento de los tobillos en ratones en el curso del experimento. Los ratones homocigóticos con hC5aR activado inyectados con anticuerpo de control desarrollaron hinchazón y otros signos de inflamación. En contraste, los ratones con el gen hC5aR activado inyectados con el anticuerpo 7F3 anti-C5aR humano no desarrollaron signos clínicos de inflamación. Los ratones de control (de tipo natural) tratados con 7F3 desarrollaron inflamación como se pone de manifiesto por el aumento del grosor de sus tobillos - como era de esperar, puesto que el 7F3 se une específicamente al C5aR humano y no se une al C5aR de ratón.
- 15 Además, el análisis histológico reveló que los ratones inyectados con el anticuerpo anti-C5aR humano no presentaban daño en los tejidos - la arquitectura de la articulación sinovial parecía normal sin signos de erosión ósea ni excesiva infiltración de leucocitos – cuando se compararon con los tobillos de ratones inyectados con el anticuerpo de control (datos no mostrados).
- 20 Estos datos muestran claramente que los ratones con el gen C5aR humano activado son útiles para analizar compuestos con actividad anti-inflamatoria en modelos de enfermedades inflamatorias.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> G2 Inflammation Pty Ltd
 <120> Mamíferos transgénicos
 <130> 503037
 5 <150> AU 2003907150
 <151> 2003-12-24
 <160> 7
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 10 <211> 21005
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica miscelánea
 15 <222> (5484)..(5484)
 <223> n = un número de nucleótidos desconocidos, datos disponibles de mouse locus sugieren aproximadamente 626 nucleótidos de longitud
 <220>
 <221> característica miscelánea
 20 <222> (7392)..(7392)
 <223> n = un número de nucleótidos desconocidos, datos disponibles de mouse locus sugieren aproximadamente 100 nucleótidos de longitud
 <220>
 <221> característica miscelánea
 25 <222> (9861)..(9861)
 <223> n = un número de nucleótidos desconocidos, datos disponibles de mouse locus sugieren aproximadamente 233 nucleótidos de longitud
 <400> 1
 tttatttttta ttttttttaaa aaatttggtcc ttcctatgca ggtggcctgg aattttttaat 60
 cctcctgctt ttgtccaagt aatagaatta caggcatgta taattgtgcc taacctgagc 120
 caattttgtc tttgctaaaa agcacagggt ctcaacctgt gggtcctgac ccctggggggg 180
 aggggtgtcac atctcagata tcttgtatat ctgatattta cattacagtt atgaagtaac 240
 aatgaaatgc ttttgtgggt ggggggtcac acaatatgtg gaaccaactg ttttcagggt 300
 cacagtgtca ggaagggtga gagccactgc taaaaaggat ctacaaaagc ctactctgga 360
 ttagaagtta ctgtgcagcc aggaggatgg ctttgaactt attctcctgc ctcagccgcc 420
 tgggtgctgg ggtcggatgc agcactacat cagggttttat gcggtgctgg gaatgggtatc 480
 cagggttttg cacatgctag gcaagtgttt aaccaaccaa gccatgatcc cagcatgctt 540
 tgctttatta tttgagacag gtcctgttct gcagcccagg gtgatcctcc tgccccagtc 600

tcctgagtgc	tagcattgag	ttaacacatc	tccctaacc	ccttaagaga	aaacgccaag	660
accttggcca	tctcttcagc	cctctgtgtg	ctttcttget	ataaaagcca	ccaggetggg	720
gagctgtggt	cattatttct	gtcatgtaga	aacccagaa	actccaaaac	ttccttcaga	780
agaggtaggc	tcctcctcag	attggggaac	gaggccagga	aaagcagctg	cgtccccaaa	840
agtgaagaag	tcctggaaat	tgccttttcc	ccttctgggg	ccagagactt	ccttctttt	900
ccaagttgac	atctctcccc	tggctggttg	gtactgggtg	gtgctgaggg	tgtactgggt	960
aagcaccggt	ggagggagcc	tcagctagga	tggtcagtga	gtgaccaatg	agcacctcca	1020
ggagacaaga	cagtcatttc	ctctcagttg	cctgcctctc	ttcttgaggg	tttaaaaggc	1080
acagcctggg	tgacagggac	cttcaggcat	ccgtcgtgg	ttaccacaga	accagggagg	1140
agccaggaca	tgggtgagtgg	attcctctcc	ctgtctgact	ttctttgccc	atttctagct	1200
cctttcccat	cctgagctca	cactctgaga	tgggatgtgg	ccaacggact	aaggggattt	1260
atgggaacca	cggcggcctc	accaagatgt	aggctcaaga	aggttcttca	ggacaggaga	1320
ccctggagtc	agctctctc	actgaagagt	tctagaagtt	gggcatgttc	atttacactt	1380
gtaatctgag	ccctcaagag	gccggggcag	gatgctgcag	tcaaggctac	atagtgactt	1440
ttaggctagt	gtgagctaca	ctatgagata	ctgtgttcag	agacaaatgg	gctggaggta	1500
gagatcaggt	gtgagagtgc	tctgtgggag	agctggaagc	catgggtcca	atgaccagca	1560
cctcgtacag	ctgggtggga	gtgattggaa	attcaatctt	acatagtaat	tttgaggtta	1620
acctgggcta	cactacatga	gaccctactt	cagaaaagca	agaacaaaaa	aataatttta	1680
caaactagcc	aaggtggttg	ctcaaacctg	ctatcctggc	tcctagcagg	aggtttgaga	1740
tttggggcga	gcctaggcaa	ctttgttgag	actttgtctc	aaagactaaa	agcaaaacaa	1800
aacaaaaact	caaacagtgt	gaataaagga	aggaagaatg	aaacaattgc	agaaacctgt	1860
tgggattgta	gctcaactgcc	tagcctgagt	gtggcccagg	gttccgtctc	ctacgtgag	1920
tctaaaacta	ccaagcagag	actgggtgct	gtgacgcaca	ccttttaatc	ccgcactcag	1980
gaggcagaat	cgggagggttc	tctgtgagtt	cgaggccagc	ctggtaaaca	tgtaaagaag	2040
tctaagggaag	gtcaatgttg	agagtcttga	cagccagttt	gaaagaacgc	ccattcccag	2100
aaaagttaga	ggaagcccag	atgggagcac	tgatggcctg	ggtccttctg	tggttaatgg	2160
ccatgaccct	ctaggcaggt	ccctctccat	gcctgggacc	tgacgttgag	gcatggtgct	2220
agaccagcgg	cgacttggcc	ccactgtaac	agaggatacg	gtcttgcttc	atccacacaa	2280
aagaggaaac	ggaaaacttg	atgacaggga	gggtacacgc	tttcttcac	cttcttctgt	2340
cccatccaat	cctgtgtctg	ccccgagcaa	ttggggtttc	cagaacaggg	tgggttcttt	2400
ttcctttcta	cacaacgttt	ctgaagacga	agtcacttta	ttgaccacc	gaactgtaga	2460

gtccctgatt	tgggctgggg	cgtgactgag	ttttttgttt	tttgtttggt	tgtttgtttg	2520
ttttaaatat	tggaataggg	tgtcagtatc	tttttttttt	tttaagattt	atattattata	2580
tataagtaca	ctgtagctgt	cttcagacac	tccagaagat	ggcatcagat	cttgttacag	2640
atggttggtg	gctaccatgt	ggttgctggg	atttgaactc	cagaccttcg	gaagagcagt	2700
cgggtgctct	tacccactga	gccaaactcac	cagccctttt	tttttttttt	tttttttttt	2760
ttttttttta	agattttactt	attttatata	tgtgagtagt	attgtctctt	cagagacacc	2820
agaagagggc	atcagaccca	attacagatg	gttattagcc	accatgtggg	tgctgggaat	2880
tgaactcggg	acctttggaa	gagcagtcag	agctctaaac	cgtggaacca	tctctgcagc	2940
ccgtgactgg	attcttaggc	cagtagtcta	tggctaagct	atgcccctca	cccctcactg	3000
ggggattcta	ggcaggggct	ctaccactga	gccacactcc	cagcccctca	ctgggggatt	3060
ctaggcaggg	gctctaccac	tgagccacgc	cccagcccc	tcactggggg	attctaggca	3120
ggggctctac	aacatttcag	tccttgatct	tttaagacag	gatgtcacta	tgtagcccaa	3180
tggtctaaat	cacatgatta	tcctcaggct	ccctgggtgct	gggatcacag	gcataatacca	3240
ccgtggctag	cccctaaaca	taatttttct	tttgaatgaa	taattttttt	cttttggttt	3300
ttcaagatag	gatttctctg	tgtagccttg	gctgccctgg	aacttgctct	ataaaccagc	3360
ctggcttcaa	actcacagat	cctcctgcct	ctacctcctg	agtgctggga	ttaaaggcat	3420
gtgccatcac	tgcttagctt	tgaatgaata	ctttttttta	atattgtgaa	taggcattta	3480
ctgagtgtct	attgtatgct	agtcctcttg	ctaagcactt	tagatttact	acatagcaaa	3540
ctatcaataa	aggagctgta	gaatatccat	gtatttcaag	ggcaacacag	cctttgaaca	3600
gacatatact	atcccaatgg	cattccacgc	attaggcggg	ataacctttt	aaagagaagg	3660
ctcttgggat	tcggccccac	cctgctctt	gctgataggt	tttgggaggc	tttctaacta	3720
acctagagcc	ccacttttta	aaatctgtag	agtgggtgtg	gccatagtag	cagcccaatg	3780
agggttgcat	gtgttaaagt	aagaaaagag	cagttgaaag	cccctcacia	gtggcccata	3840
cctgtaatcc	cagcactcag	gagaaagagg	ccctgtctca	aaagaaaata	caaaaagcat	3900
gtaaacttat	ggaccaggct	aattatttta	ttttgttttt	ttaaaaaaga	tttattttatt	3960
tattttattac	atgtaagtac	actgtagctg	tcttcagaca	ctccagaaga	gggagtcaga	4020
tctccttacg	aatggttggt	agccaccatg	tggttgctgg	gatttgaact	aaggaccttc	4080
agaagagcag	tcaggtgttc	ttacacgctg	agccatcgca	ccagccccag	gctaattatt	4140
gttattttga	aatagggtct	catgtagata	aggctgaacc	tagaactcac	tatgtagcca	4200
aggatagctt	tgacttctgt	tcctcctgct	ccacctctgg	tctctctctc	tcgatataata	4260
cacacatata	tgttcatttt	atatattata	ttgtataata	gtttatagtc	ttcttttttt	4320

cttttttttt	tttttttttg	ggttttcaag	acagggtttc	tctgtgtagc	cctggctgtc	4380
ctggaactca	ctctgtagac	caggctggcc	tcgaactcag	aaatccgcct	gcctctgcct	4440
cccagtgct	gggattaaag	gcgtgtgcca	ccacgcccg	ctatagttca	tattctttaa	4500
gcaactat	ttatatcatt	tatttatttg	tcttacaaga	tttgttttta	attgtgtgta	4560
cgcttttgag	tctgtctgtc	acacgcgtgc	agatgccctc	agaggacaga	aggtgttgga	4620
ttttcggagc	tggagtttca	ggcagttgtg	agatccccct	gggtgctgag	aagtgaacac	4680
atgtcctctg	cggagctga	cagtgtctct	cattgtcgaa	ccatctctcc	acttccttct	4740
tagtcttttt	tttctcaatt	gtttttctcc	ttaaaaaata	ttttgacctt	atgattagtt	4800
gagtccacag	acatggacac	tgtgtatacg	gagggacaat	gacatcttct	ataatagttc	4860
aaattatgta	tgcataata	atgttacata	tattgtattc	cacatccaag	aaccatataa	4920
acaggagaaa	gtgctctctc	tctctctctc	tctctctctt	aaagatttat	ttatttgta	4980
tatgtaagta	cactgtagct	gtcttcagtc	actccagaag	agggcacag	atctcattat	5040
ggatggttgt	gagccaccaa	gtggttgctg	ggatttgaac	tcaggacttt	ccaagagcgg	5100
tcagtgtctc	tacctgtga	gccattctcc	agcccaggag	aaaactctct	taattccga	5160
gtcccagtc	cttccttaga	ggcagccact	actgtcagta	tgtgaggcta	gtctgtatgt	5220
acacgtgaat	ggacacacac	acattcatgc	acatgttggt	catccttcct	tctacaggta	5280
atatacattg	tgcattgtcc	actgtatatt	cctattttta	acaaagtttc	cctagatata	5340
aaagaccttt	ctgtatcatt	tcattaacaa	ctaccttatt	cttttaaaaa	ctgcatagtg	5400
ctttgttgcc	tagaggctat	tactaagtta	ctcagtcctc	tttggtcagt	tcaaaatata	5460
attatcatct	cctcctctgc	ctcntgtatc	tgggaagccc	aggaaaccac	agagtttacg	5520
atcagcatct	ttttctctgc	ctcatgaagt	cacgaaaagg	acagggtgag	atcatgtcag	5580
gaagcaagaa	aggagaaggt	cagccggcaa	ggatgagaga	tgggggttaga	gaggcccgtg	5640
tcagaagtct	gagtcattgt	agtaaggatg	gtgagatctg	cagatgccag	gagaagcatt	5700
ccaccctgtc	tggggccttg	agaataccca	gagggcaggc	tgtgaggttt	cctatagggc	5760
ccagaattaa	toctcaagtg	acctgagcat	gggaccctgg	ggatgtgggg	atgccagag	5820
taacaagtag	aaagatacag	aactgagggt	gagccagagt	gaaatgagtg	gctgggtcct	5880
gggtctgtct	gtctgtctgt	ctgtctgtct	ctctctagct	ttctttttgt	ttttctctgt	5940
gtagccctgg	ctgtcctaga	actcactcta	taaaccgggc	tgacctcaaa	ctcagagatc	6000
tgtcctcccc	tgccaccggt	gctgggattg	aaggtgtgca	tcacatcacc	accctcctgc	6060
ttgaaatatt	tttaaattat	agaaaagtgt	gaggctagta	caagaagttt	atttatcttc	6120
ttttgttgtc	gttggttatt	attattactg	agatggggtc	tcgctatgta	gctcaggctg	6180

acactcaatg taatgcatag cccaggctgg tctggggcgc cacatcttcc tgttcagcct	6240
cctcagtgtt ggcattacag gcgagcatta ccataaatc ttgtgtttcc tccccaaagag	6300
tccccacatg cagtctatgg tgtatatatg tttaacctg tatatactta taaatctttg	6360
tatgtatcta tgtttctgtt tctataaaca tatcagttta gctgcatatc gacatatctg	6420
tttttctatc tgtcaatata gctatcaatt atgctccatc cattgtttct ctaccattca	6480
tctctagcta ttcacatctt acccaggcat tttctattct tctattagtt tagcctggtc	6540
ttgaaccccc aacctagctg aggatagctc tttttttttt ttttataatg gtactgaagt	6600
ttattttttt taaagattta tttatttatt acatgtaagt aactgtagc tgtcttcaga	6660
cacaccagaa gagggcgtca gatctcgta cagatggttg tgagccacca tgtggttgc	6720
gggatttgaa ctctggacct tcggaagagc agtcgggtgc tcttaccac tgagccatct	6780
caccagccct gaggatagct cttaactctt gatcttcttg cctccaccac atagattcag	6840
gggttacagg tgcactaccg tgtccagtct atgtagcact ggggatggaa cccaagggtt	6900
catacatgat aaatgagcac tctacaagat gagctatggt cctaaccat ctgcctgtct	6960
ttctatcacc tatgtcccat ccgttgatct ataaatcttt ttattcatct ttcacccacc	7020
cacccaacca ttcacccatt cattcttagt aaccaaggct ggtcttgaac tcttgatttt	7080
cccacccgag tcttccagct cctgagatga tacaagtga catcaccata cccgtgtcaa	7140
aatctacttc taattcttat ttctgttttt aaaaagaaaa gttatctgtt ttatgtatat	7200
atgtgtctgt tgagtgtata tatgtgcacc aagtgcctac aggagcctgc aaagatcagt	7260
tgtcagattc tgccattgga gttctaaaca gttgcgagct gtcacaactc tggctcctta	7320
caggagcagc aactgctctt aactgggtgac ccactctctc taatttctct ctctctctct	7380
ctctctctct cncctctctc tctctccctc cctccctccc tctcttctct ccttccctcc	7440
ttccttcccc cctcccttcc ttccttctct cattccttcc ttttgttttt tgtttgtttg	7500
ttttttttta attaggtatt ttcctcattt acattttcaa tgctatcca aaggcccccc	7560
ataccacccc cccaatccc ctaaccaccc actccccctt tttggccctg gcgttcccct	7620
gtactggggc atataaagtt tgcaagtcca atgggcctct ttttgagtg atggccgact	7680
aggccatctt ttgatacata tgcagctaga gacaagagct ccagggtact ggttagttca	7740
tattgttgtt ccacctatag ggttgagtt cccttttagct ccttgggtta tttctctagc	7800
tcctccattg ggggccgtgt gatccatcca atagctgact gtgatcatcc acttctgtgt	7860
tttgtttgtt tttttgagac agggtttcat cgtgtagccc tggctgtcct ggaactcact	7920
ctggagacca ggctggcctc gaacacacag ggatctacct acctctgcct cccaagtgtc	7980
gggattaaaag gcatgctcta ccaccacctg gctagttctt atttcttatt ttgccttttg	8040

ctggccccc	atactttg	ccacttcca	attgtaagtc	ccaaaactta	gggtttggaa	8100
aatgggtggc	ttgctagact	gtcaaggaga	taatgaagga	agaaagggag	gctcagagcc	8160
agagaaat	gcaaaggaa	ctgtatgccc	cataggtctg	gatcacaggg	gataactcca	8220
aagccagtat	ccaaaggaca	gcctatcctc	agctgggggt	ggagtctttg	cctgcttccc	8280
gcctatacta	aaatgtcgaa	ctatTTTTT	tcttctctc	tctctcttc	tattttttct	8340
tttaaagatt	tatttattta	ttttatgtat	atgagtacac	tagggcatta	gatctcatta	8400
cagatggttg	tgagccacca	tgtgattgct	ggaatttaaa	ctcaggacct	ctaggagagc	8460
atccagtgtc	cttaacctct	gagccatctc	tcagccctct	ggttttttgt	tttgttttgt	8520
tttgtttttt	tgttttttta	aagacagtat	ctcattgtct	ttgttagcag	ctctgtcctg	8580
tcctagaact	cactatgccc	aacacactga	cctcaaatac	atgcttatcc	acctggctct	8640
gcctcccaaa	tgctgggatt	aaacatgtgt	accaccacta	cctggcatct	ctgtccatca	8700
ttttaatcaa	agagaaaaat	gtataaaaact	ttttcttaag	tagcccagac	tggtaatgag	8760
gatcactgtg	catctgagga	tgagtctggt	gcctctgtct	cccagattct	ggggtgggag	8820
tcaccatttc	tagtttaatg	ttgtgctggg	tttgaggtct	gtggcttcat	gctttgagac	8880
tggtttcctg	taaggcaggc	gatcattgaa	tgcttcccca	ccctgcctcc	tgttactgaa	8940
tgtcaggatt	gtagccatga	gcgcocatgc	cgcctttaat	ataagatcat	ttaaagcagt	9000
agttctcaat	ctgttgtcag	agagtagcaa	gcttacagtc	aggaagtagc	aacaaaagtc	9060
atTTTTatggc	tggtgggtcac	cacaacatga	ggaactgtgt	taaaggctctc	agccttcgga	9120
aggttgagaa	ggaaacctca	aaccacaga	tatcggtcac	agttctcaaa	ggaccacatt	9180
gccaatatg	tttatacacc	atggtcacat	ttccagccca	ccgaggacac	caggataaag	9240
cttactgccc	aacaatgagg	tgtttcaaaa	ttagatgtca	ttgtcctgtc	tttataccaa	9300
ctttgggttt	tagtccaaat	tcagggcata	cacatctata	attctagcac	acaggaggta	9360
gaggcagggg	gatcagtagt	ttatcatctt	gagctacata	gtgagttttg	ggactagcct	9420
ggtatacagt	ggattctgtc	aaaaaactaa	atgacaaaga	agtaacaaca	acaacaacaa	9480
aataataata	ataataataa	taataataat	aataataata	atattattat	tattattatt	9540
attattatta	ttattattat	tattattttg	gtgtgtgtgt	agtgtctgga	cacataggtc	9600
aagctgagct	tgaactcagg	acaatcctca	tacactgttt	tgagctcttt	atatcactgg	9660
gagctggaga	gtgtagctca	ggagctcaac	agtacctgcc	agagtacag	gagttcagtt	9720
ccaagcacct	atgtagagta	tgctcacaac	cagatgtaat	tccaaagtgt	tcaatgccct	9780
cttctagcct	cccagggcac	cctcctctct	ctctctctct	ctctcctctc	tctctctctc	9840
tctctctctc	tctctctctc	ncccccata	cagtaccaat	ggtaagatgg	tttagcaggt	9900

aatcgcccaa	gcctggagac	ctgagttcta	tcttaggacc	cacataaagg	ttaagggaga	9960
gaacgcagtg	cacaaagtta	tcccctggct	ttcacatgtg	tgttatggca	tgcacatgca	10020
tacatacata	catgcataca	tacatacata	catacataca	tacatacata	gacagtgaca	10080
aattaaaata	atacctcatt	ggtcagtcac	tgcccccctt	taatcccagc	actcagaage	10140
cagaggcagt	tggaactctg	taagagtgga	gccagcctgg	tctacagagt	gagacttttt	10200
ctttttttct	ttttttttta	aagatttatt	cattttattat	acgtaagtac	actgtagctg	10260
tcttcagaca	ctccagaaga	gggagtcaga	tctcgttacg	gatggttgtg	agccaccatg	10320
tggttgctgg	gattttaaact	cctgaccttc	ggaagagcag	tcggttgctc	ttaccactg	10380
agccatctca	ccagccccga	gattttttct	catcacctcc	ctaccccaat	ccatatactt	10440
gattaaagcc	caggtctgga	gagccatgcc	tgtagtctca	gcattgggca	gctgaagtag	10500
atggaccacc	atgatttcag	tttatcctgg	gcttcagagt	gagtttaaga	ccagtctggg	10560
taatttaaca	gagaacctgt	ctcaaaataa	aatctacaaa	ctatactagt	tttataggtg	10620
ttcagcatcc	cttggtagag	ttgagactca	gaaagacggg	caatgcctcc	atccccctggg	10680
aatgtgtcta	ccaactcaca	caatctacct	gtttgatttg	cttaggaccc	catagataac	10740
agcagctttg	aaatcaacta	tgatcactat	ggaaccatgg	atcctaacat	acctgcggat	10800
ggcattcacc	tcccgaagcg	gcaacctggg	gatggtgcag	cccttatcat	ctactcgggtg	10860
gtgttcctgg	tgggagtacc	tggaatgcc	ctgggtggtg	gggtgacagc	cttcgaggcc	10920
agaaggggcg	tcaacgccat	ctggtttctg	aatctggcgg	tgcccgacct	cctctcgtgc	10980
ttggcactgc	ctgtcctggt	cacgaccgtt	ttaaatcata	actactggta	ctttgatgcc	11040
accgctgta	tagtcctgcc	ctcgtctatc	ctgctcaaca	tgtacgccag	tatcctgctg	11100
ctggctacca	ttagtgcga	ccgtttcctg	ctgggtgtca	agcccatctg	gtgtcagaag	11160
gtccgcggga	ctggcctggc	atggatggcc	tgtggagtgg	cctgggtctt	agcattgctc	11220
ctcaccattc	catccttcgt	gtaccgggag	gcataataag	acttctactc	agagcacact	11280
gtatgtggta	ttaactatgg	tgggggtagc	ttccccaag	agaaggctgt	ggccatcctg	11340
cggctgatgg	tgggttttgt	gttgccctctg	ctcactctaa	acatctgcta	caccttcctc	11400
ctgctccgga	cctggagtcg	caaggccacg	cgctccacca	agacgtcaa	agtgggtgatg	11460
gctgtgggtca	tctgtttctt	tatcttctgg	ctgccctatc	aggtgaccgg	ggtgatgata	11520
gctgtggctgc	ccccgtctc	gccaccttg	aagaggggtg	agaagctgaa	ctccctgtgc	11580
gtgtccctgg	cctacatcaa	ctgctgtgtt	aaccctatca	tctacgtcat	ggctggccag	11640
ggtttccatg	gacgactcct	aaggtctctc	cccagcatca	tacgaaacgc	tctctctgag	11700
gattcagtg	gcagggatag	caagactttc	actccgtcca	cgacggacac	ctcaaccggg	11760

aagagtcagg cgggtgtagag gagaagccac aactggccta gctgctcctt ttccagccct 11820
cctacccccct cctcttcttc ctccctctgc ctctctctct tccttctctt cttctctttg 11880
catgtttaat tttctgcaat tctctaagtt gctctgacta gccttgagcc caggatcctc 11940
atgaaggctg agattataaa tataaattcc tttgatgaaa agcatcacat taagatagta 12000
ctcggtcttt tttctaaggc tttttttttt tttcttggtt acgttgccca cctgcagtgg 12060
ctaggcagat acacctaatg atgacctcca ggggttggtt aacagagaac aagagaattt 12120
cctggccttc ttcttctctt ctctctcttc tttttccctc ctccctcttc ttctctctct 12180
cctccctttt tttttttatg gttctggtct gaaccaggt ctcaatggaa cccagggctt 12240
atggatatat cacataagca agctacagcc ccaaaccoca ggcaaccagt atccaccac 12300
cctttatttc tttctatgt ttgattttt ttttttttga gacaaggtct catgtagggt 12360
agtctggcct tgaactccag atctctctgt gaccatctcc caagtgtcgt gactgtagac 12420
ctgtgctggt gtgtccgacc tatcctttat ttctacaatt ttgtgttttc aggaatggta 12480
tttaatggaa cccaacatat ccaagctttg taaaaacaac tatgcatggc ttacttgata 12540
aattttttt ttttaaaaag gtacagaaat gtgttggtta acttttttaa agcacgtatt 12600
tattttattt gtgggggggtg aggggggtggt gctgggcaaa tgtcatggta tatgtgtgga 12660
ggtcagagga caacctgttg aaattggttc tctcattgca accatgaagg tctcatgga 12720
atcgaacca ggtcatcata cttggcagca aacaccttta cctgctgagt cacatcactg 12780
gccagaggtg tctgtcttta taatgcgttc tttcagctta atgaatgtgt gtgcatgagt 12840
gtatgtgttg gctagaaaat atgtacagat caacaccaga agtatcatgc aagcatggga 12900
atggttttga atttctggt caaattaaaa atgtgaaaga agacctgggt gtggtggcgc 12960
aaacctatat ccagcatgt gggaggttca ggggccagaa ttgagtttta gaaccagcc 13020
tggttacc agggagactg tctcatgaga tccaaataaa cagtatatga tggaaaacac 13080
tggagtttag ctctgctagg ccctctcttc ttcccagtggt atatgtgacc actggttgct 13140
acatatcaca gaccagcct acctgtgttc tgctattcac actttctata tgatgacact 13200
aacctcactg aatttttaca ggctccatgc cttggcattt attatttatg tattttatta 13260
ttttgagaca ggatctcttt acatagccct agctgtcctg gaactcacta tgtgaaccag 13320
gctggcctag aactcacaga gatgggcctg cctccatctc ctgagtgtta ggattaaaga 13380
catgagccac cacatccagc tttattctat gttttgtatg gcctctatga gtttgaaaca 13440
tttaatcaat tagttagtta attaattaat atatgagatg ggatctcatg tagcccaggc 13500
tagccttaag ctggttttac agctgaggtg ggattatagg tagtcctcct gactcccagt 13560
tgtctccctc ttgtggcttt tctcattatc ggtcacatct gtattgccac agctgagctt 13620

ctcaccact	gacccatgcc	ccagctgtcc	caagaacctc	ttcctcccct	tgcttttcca	13680
ttccaggaaa	aaccacactg	gcaacctgct	caccaggcc	ctttcagctg	ccccatcaca	13740
gacccagccc	tcccttctta	ccacacaccc	ggctctacat	cctgcccccc	ccccccgcac	13800
ccccccccgc	ctccttcatg	cctctccctt	cccttgatct	cctggttgcc	cagcacctct	13860
tccaaggacc	atcctgctcc	catectgtct	tcttgccagg	tgccccctcc	ttaagggagt	13920
ccctgtgac	agccctcagt	ttcccataag	caccctacca	tcaatctttt	tctctggctg	13980
cgattgagct	tcctgggttca	gggagtaagt	agtaggtagg	gattcacctc	cttctggcct	14040
tgctgtaatg	agatgctgtt	ttaagggttg	ggctgagggc	tggggctagg	gggtggggtg	14100
gggttagaaa	gacggatcag	tgattaagag	catttgatgt	tcttttagag	cagcggttct	14160
caacctctgg	gtctcaacct	ctttggcaaa	cttctgtttc	caaattattt	acattccgat	14220
tcataactag	caaaattaca	gttttgaagt	agaaatgaaa	ataactttat	ggtttggggg	14280
gacactgcag	agtgaggaac	tgtatttaag	ggctcatagg	cgtagcatca	tgaaggttga	14340
gaactactgt	tttaaaggat	tagttcagtt	cccagcatcc	acatagtgtc	tcctaattgat	14400
ttgtaatggc	tgcttggac	accaagccca	cacatgctgg	acatacatgc	aagcaaaaaca	14460
cccatacata	taaaattata	tataatatgt	aagctggggc	caggatacag	tgtttcagtt	14520
cagtaggtag	catgctggcc	taacacgcac	aagcctctgg	ttcagtcccc	tgcactgaat	14580
aaaatctcca	atagtgggtg	ggtgtggtgg	tacatgcatt	taattccagc	actccagaca	14640
cagatgcagg	cagacctctg	ggagtttgag	gccagctact	tagtgagctc	caggtcagtc	14700
caagtgcagc	ttggtttcaa	aataaaaaca	atatatacac	acaaagaaac	taaatctgca	14760
tggtggattt	aggaggtaga	ggcaggaggc	tcatctagtc	aaggagagtt	tgtggctagc	14820
ctgggctaca	tgaggccatt	ctgggctaca	tgagcctctg	tctgaaaaca	caaacaaaaa	14880
caaatgaaca	aacaaacaaa	caacaacaaa	aatcccagcc	aggcttggtg	acaagcattt	14940
gggagacggc	cataggtgga	cctccgtgag	ttcaggctgc	agagagaggc	cagtttaaaa	15000
ccaaaacgag	acaaaaaggg	atgctcagtg	gtttaagagc	attggctgct	gctcctccag	15060
gggactgagg	tttcttccc	agaaccaca	gggcagctca	caactgtctg	tagctccagt	15120
tccaggggag	ctgatgcagt	ttccttgcoct	ccacaggcat	ggtgtgtagc	acgcagatat	15180
acagacaaac	cactcatgca	ccaaaggcaa	aaataaatta	atctaaaaga	aaggaaggaa	15240
ggaaggaagg	aaggaaggaa	ggaaggaaga	aagaaagaaa	gaaagaaaga	aagaaagaaa	15300
gaaagaaaga	aagagaaaga	aagacaggaa	ggaaggaagg	aaggaaggaa	ggaaggaagg	15360
aaggaaggaa	ggaaggaagg	aattggacat	acagcaggtg	gtggtcatgt	tgagagaccc	15420
ccaccccagg	tgactcccag	gcaggtcagg	gttaagcaac	gcagctcaaa	acagaagttt	15480

gcagagtcca ggggattgcc aaatgtgtgg cctgtggaat ctgcttatgt caacagggtt 15540
ggaaggggaa gtgagcagga aaggaagtgg gctgagagct tggcggactc tagtgtgttc 15600
tttctcctcc ccagcccca gccttcttga cccttgggtc ttacacacct atctgttctt 15660
cagatgcagg gctccaaggc ctggggccag agccgccttc ccttgtaacg gtgacctccg 15720
ggagctcaca tccaggaagc tgttacattg cagtagagtc ttctgggatg aaatatgagg 15780
ggctgggaga cgggtcagtg agtaaagtgt ttgccattta aacataagga tatgcgttcc 15840
agcccaggct atggatttgc ctggtacaga ggcacggtgg gttgtgtttg taacctcagc 15900
acgggagagt gagacagatg gatctctagg gcttctgac cagcaggcct gggttaatca 15960
gtgagcatct agagcaagtt gagagccttg gtctctaaac acaagggtga aggaaagga 16020
gggcccttga gaggtggttc ataggtaccg ctctcagcag caagcactct cacctgagga 16080
gccctagccc tagctctact actgagccac actcccagcc cctcatttgt gagttcttgg 16140
ttctgttgag ccaggccccc aatcctttgc tggaggattc taggcaaata tctaactact 16200
gagctgtgca ctgctccaga ctttttatca tcttggcaca tctgttgacc aggtaatgtc 16260
cccatgttga ggtgtggaga aactgaggc ctttcaggat gagagagaga gaggagaggc 16320
ctgcatcaca gaatctgtag tgccttgacc cagaagcaat ttctctaac aacatgactt 16380
tatgctctaa atatcaacag aagaatttgt gaccgcatcc ttctcagcct taagcaaggc 16440
tcagagagaa agacgaccat caggaactgc tgagtgaoga gagtccatgt cagggttgag 16500
gccatgtcct gctcgggtgc ctaagcctgc accatgctgt aggtgtatag tttaagacag 16560
tgtactctag ggcacacttt aattcccaca attgggaagc tgaggaaagc aaatctgtga 16620
gtttgaagtc actctggcct acgtgagacc ctgtctcaaa cccaaccaa cccaaatcaa 16680
accaaaccaa acccagccac tatagccaac ttcttttttg ttcttgtcat tactactact 16740
actacaaata ataataataa atatctaata ataattttca ctttaaatat ctgtgcacat 16800
gggcctgtga gagtcacagt ttgtatttga aggtcagagg ctagccttaa ttctagagct 16860
ttcctttcta ctttgagaca gagtctcttg ttgcttgtaa tggcaaaggc cagctggccc 16920
acgtttccag ggattttgac tccctggctg tcttcttttc tgaacgctgg catcacatac 16980
atatactact gaatgtggct attatatggg ttccagaact tcaacctcag gtccccatgc 17040
ttgtgtgacg agcacattcc ccaccaatcc acccatgggg accggacaga tctctcccgt 17100
gagctcccc ttgcctctgc ctccggagtg ctggagtgaac aagcatgttc tcctatgcct 17160
gctgtcttcc cattttacag gtaaaaaaac cagaggccca gaaaggggac aggatttgc 17220
tattttgggg catgtggggg tttgagacag ggtttctcta tgtagtcctg gctgtctctc 17280
tgtgactctt ggctggcctc gaactcagag acctgtctga gtgctgtgat caaagggtgtg 17340

cgccaccact gcatgacagg acttgcatTTt tatgttcccc ggaaacctca ggccctgggc 17400
 tcagcttctt gatctttctg aggaggggtt attctgggct atcatcctca caacatttga 17460
 ggaaggaaaag atctttaaga gtctgtggct ggcaggaatg agaggcagag aacagcgag 17520
 ccggtcagtg gagggttagc aggccgctgg tgattactgc agaattcttag gggtccttta 17580
 gtgccaagggt tgggtgggaa gtggtttcag agatagccct ccagaccttg ctgttcaaag 17640
 cccacacacc tctggcttcc aggaagctga tagtagtgag gctgcgggtg gaggcacaca 17700
 ctttcggctt ttccgacctt tctgtctgtg ggttaatttg tgactcacgg ggaggaagaa 17760
 aagacaacta tttccctggg gctagcggag gccacgcctg tttttcctgg ttaagaagggt 17820
 tgcgcagggt cctcagagaa tcccatagga tctggggaag ggttgcatg ctgagactca 17880
 ggcccgctac tgtccctggg ggagagactc tgggcttctt tgcggctgct gaggtctgct 17940
 gtgcttgctg attcggccaa tttgggacca gtcagaagag aggtgaggaa gggaggcata 18000
 aaggagggtg cgagaagggg tggagaggct cataatgttt gccttagaag ctttcatttt 18060
 gaaatcttgg gagtcagaat tagcattcca gattatatat gttgtatttt cctgagacaa 18120
 gagctcatgc tgtccagggt gacctcaaac tcaactatga gttgagggtga tctcgaacac 18180
 ccgagtgtcc tgccctccacc tccagagtac agggatcatc aaacacagggt tatgtagtgc 18240
 tgggagcaga gctcagggtt tttggcactc taccaactga gccacacccc cagccctgaa 18300
 tcatataaaa taatctgttt cattacgaca tttatattat atatgaatgt tcttgagttt 18360
 tgctcaaatt caccaccatc tcttttctca tcagcttgta tgtgtgtgtt gttgtgttta 18420
 ttattgatac aaaatatctc tacgtagctc tgactgtctt ggaattcgtt atgtagacaa 18480
 ggctggattc acagaaatcc acctccctct gcttcagag cactgggatt aaaggcatac 18540
 tcttggttta tacttaaaag tggcaatttg gagctgaaga gatggctcaa tggttaagaa 18600
 catgcaatgt tctttcagag gtctgaggtt aggttctcag aacccatctt atcagtggct 18660
 tacgaacacc tgtaactcct gctctaggga gtcagatgcc ttcttctggc ccagcaggt 18720
 aactgcacac atgtggccaa cactgtgtg catagacata tgtaaaataa tggcaataat 18780
 attttatgta ttgtgtatag agccaaacaa atataaatga tttactgtaa aagaaagcaa 18840
 tgtcactggg tgcagaagtg tccatttgta atccagatg agaaggcaga taagaaaaga 18900
 acggtttctt ttactctctg gccatctgt tgagccagtt ggcaaacttg aggttctgtg 18960
 agatatccag tctgaaaaaa tgtggagggtc tggagggtgt ggctcagtgg tagacccct 19020
 gcctagaatc cccagtgag gggctgggg cgtggctcac agccggagcc ccttgtaaag 19080
 ctggaaagcg ggagatagcg cgagatagag aggggggtag acggagagag agagagcgag 19140
 agagagagag agagagagag agagagagag aacatgaatt ctgggaacca tcctgtctc 19200

```

tctttacaga ggaaatacca taggctgata gtgactgagt acagaaactg tcccagacta 19260
ttatcagtag tagctgtgaa ggggtggggtc agagatggga agagaggtag tgataacagc 19320
agttcacaca cacatacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 19380
caaacacaca cactgagcagg cacacacctgt ctgctgtttg ctgtggacga gcactgtggc 19440
agcctgtctc catagcagat ccgctaacta cactgactat ccgcagcgct cgctctccca 19500
gggtggggtct gtgattatcc ctatacaggt acacagagat tccgcagctt gttgaaggcc 19560
acacagctat tgaagctttg agtttttcta ctctgttat gctctatatt gcttgttttg 19620
tttgtttgtt ttgagatgag ggtcttaact tatagcccag gttggcctca aaatcatggc 19680
atttctctg cttcagcctc tgagtgtgg ggtgacaggt gagtttttgt tttgttttgt 19740
ttttaaacag gtacagttta ctttaaggaa ggaaaactac tcagaaaaat ggcttggcct 19800
catagctggc tacctggcag agctgagagt gtcccaattt ccgttctgtc ctctctgtt 19860
taacagtgtt ggccaaggct ttgggcagtg ccagacaacc cataaatagt cagatgagag 19920
ctgcaggttc cagccactcc agacatgggg ttgggtgtcc cctcccgccc aggtcctgtc 19980
cttccccgcc tgcttttgtt cttgtgtgtg tttcttaggc tttagtctt ctgtcccacc 20040
aaactggtga gctgggtcct agaggaggat gtgcacagac agagccagcc gtgactgcgg 20100
gtcagctcag ggccacgggg atacacgggt gactagcttc ccagtttctc acatctgggg 20160
ccggtaatat ttctggactc cctagggaca cgctgcaatt cagttctgtc ttcttagctg 20220
agtgatttta actaagttac tcaccctctc tctgcctctt tagctgcaga atcggttac 20280
caagactgta tcaaacacaca gtgttgaaag gtgtttgggg ccaggccttg cacgtgcaca 20340
aatgggtgcc ctctaatact ctaaaaactat tattattatt ttattaggta attttgtgtc 20400
ttagttaggg tttttattgc tgtgaagaga caccatgagg ggctgggggc gtgactcagt 20460
ggtagaacac ccacctaaaa ttccccaggg gcacacgcaa ctctctctct ctctctctct 20520
ctctctctct ctctctctga cagggtttct ctgtgtagcc ctggctgtcc tggaacttgc 20580
tttatagacc aggctggcct caaactcaca gagatccctc tgcctctgct ccaagtgtg 20640
gaattaagtt gtacaccacc actgcctggc taattatttc tatcttaata gtttcttttc 20700
ctgttgcttg tgatgaaata ctccacagcc agatgtgggt gcacactttt ttatcccaag 20760
acacttggga ggcagaggta ggtaaatttc tgtgagtttg gggccattct ggtctacata 20820
aaatactctt aaagggtac ttaagggaga aggtacttat tatagattat tatatattat 20880
gtcattatat attatatata atctagagaa ttaattattat aatatttcta taatacatac 20940
tatgtaatat aatattaata tcaatacaat tatattatct actattcatt atacattaat 21000
atata 21005

```

<210> 2

<211> 2328 <212> DNA

<213> Homo sapiens

5 <400> 2

agggggagcc caggagacca gaacatggac tccttcaatt ataccaçccc tgattatggg	60
cactatgatg acaaggatac cctggacctc aacacccctg tggataaaac ttctaacacg	120
ctgcgtgttc cagacatcct ggccttggtc atctttgcag tcgtcttcct ggtgggagtg	180
ctgggcaatg ccttgggtgt ctgggtgacg gcattcgagg ccaagcggac catcaatgcc	240
atctggttcc tcaacttggc ggtagccgac ttcctctcct gcctggcgct gcccatcttg	300
ttcacgtcca ttgtacagca tcaccactgg ccctttggcg gggccgcctg cagcatcctg	360
ccctccctca tcctgctcaa catgtacgcc agcatcctgc tcctggccac catcagcgcc	420
gaccgctttc tgctggtggt taaacccatc tggtgccaga acttcgagg ggcgggcttg	480
gcctggatcg cctgtgcggt ggcttggggg ttagccctgc tgetgacat accctccttc	540
ctgtaccggg tggtcggga ggagtacttt ccaccaaagg tgttgtgtgg cgtggactac	600
agccacgaca aacggcggga gcgagccgtg gccatcgctc ggctggctct gggcttcctg	660
tggcctctac tcacgctcac gatttggtac actttcatcc tgctcggac gtggagccgc	720
agggccaagc ggtccaccaa gacactcaag gtgggtggtg cagtgggtggc cagtttcttt	780
atcttctggt tgccctacca ggtgacgggg ataatgatgt ccttcctgga gccatcgta	840
cccaccttcc tgctgctgaa taagctggac tcctgtgtg tctcctttgc ctacatcaac	900
tgctgcatca acccatcat ctacgtggtg gccggccagg gcttcaggg ccgactgcgg	960
aaatccctcc ccagctcct ccggaacgtg ttgactgaag agtccgtggt tagggagagc	1020
aagtcattca cgcgctccac agtggacact atggcccaga agaccaggc agtgtaggcg	1080
acagcctcat gggccactgt ggcccgatgt ccccttcctt cccggccatt ctccctcttg	1140
ttttcacttc acttttcgtg ggatggtgtt accttagcta actaactctc ctccatgttg	1200
cctgtctttc ccagacttgt ccctcctttt ccagcgggac tcttctcctc ctccctcatt	1260
tgcaaggtga aacttccct ctagggagca ccctcccacc cccaccccc cccacacac	1320
catctttcca tcccaggctt ttgaaaaaca aacagaaacc cgtgtatctg ggatatttcc	1380
atatggcaat aggtgtgaac agggaactca gaatacagac aagtagaaag attctcgctt	1440
aaaaaaatgt atttatttta tggcaagttg gaaaaatagt aactggaatc tcaaaagtcc	1500
tttgggacaa aacagaagtc catggagtta tctaagctct tgtaagttag ttaatttaaa	1560
aaagaaaatt aggtgagag cagtggctca cgctgtaat ccagaaactt tgggaggcta	1620
aggtgggtgg atcacctgag gtcaagagtt ccagaccagg ctggccagca tggtgaaacc	1680

```

ccgtctgtac taaaaataca aaaaattaac tgggcatggt agtgggtgcc tgtaatccca 1740
gctacttggg aggctgaggt gggagaattg ctcgacattt ggaggtggag gttgtggtga 1800
gccatgatcg caccactgca ctctagcctg ggtgaccgag ggaggctctg tctcaaaagc 1860
aaagcaaaaa caaaaacaaa aacacctaata aaacctgcag ttttgtttgt actttgtttt 1920
taaattatgc tttctatttt gagatcattg caaactcaac acaattgtaa gtaatgatac 1980
agagggatct tgtgtaccct tcacccagcc tcccccaatg gcaacatctt gcaaaactac 2040
aatgtagtct cataaccagg atattgacat tgatacagtg aagatacagg acatttctcat 2100
caccacaggg atccccagga tgcccacttc cctccacccc cacaccccag ccgtgtccct 2160
aaccctggc aaccaggaat ccactctcca tttctataat gttgtcattt caagaatgtt 2220
attcaatgga atcatatagt atgtaacctg ttttgagctt aaaaaaaaaa gtatacatga 2280
ctttaatgag gaaaataaaa atgaatattg aaaaaaaaaa ctttagag 2328

```

<210> 3

<211> 350

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Asp Ser Phe Asn Tyr Thr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp
1      5      10      15

Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr Pro Val Asp Lys Thr Ser Asn Thr
      20      25      30

Leu Arg Val Pro Asp Ile Leu Ala Leu Val Ile Phe Ala Val Val Phe
      35      40      45

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

Glu Ala Lys Arg Thr Ile Asn Ala Ile Trp Phe Leu Asn Leu Ala Val
65      70      75      80

Ala Asp Phe Leu Ser Cys Leu Ala Leu Pro Ile Leu Phe Thr Ser Ile
      85      90      95

Val Gln His His His Trp Pro Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser Ile Leu
      100      105      110

Pro Ser Leu Ile Leu Leu Asn Met Tyr Ala Ser Ile Leu Leu Leu Ala
      115      120      125

```

Thr Ile Ser Ala Asp Arg Phe Leu Leu Val Phe Lys Pro Ile Trp Cys
130 135 140

Gln Asn Phe Arg Gly Ala Gly Leu Ala Trp Ile Ala Cys Ala Val Ala
145 150 155 160

Trp Gly Leu Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Phe Leu Tyr Arg Val
165 170 175

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr
180 185 190

Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile Val Arg Leu Val
195 200 205

Leu Gly Phe Leu Trp Pro Leu Leu Thr Leu Thr Ile Cys Tyr Thr Phe
210 215 220

Ile Leu Leu Arg Thr Trp Ser Arg Arg Ala Thr Arg Ser Thr Lys Thr
225 230 235 240

Leu Lys Val Val Val Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Phe Trp Leu
245 250 255

Pro Tyr Gln Val Thr Gly Ile Met Met Ser Phe Leu Glu Pro Ser Ser
260 265 270

Pro Thr Phe Leu Leu Leu Asn Lys Leu Asp Ser Leu Cys Val Ser Phe
275 280 285

Ala Tyr Ile Asn Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Val Val Ala Gly
290 295 300

Gln Gly Phe Gln Gly Arg Leu Arg Lys Ser Leu Pro Ser Leu Leu Arg
305 310 315 320

Asn Val Leu Thr Glu Glu Ser Val Val Arg Glu Ser Lys Ser Phe Thr
325 330 335

Arg Ser Thr Val Asp Thr Met Ala Gln Lys Thr Gln Ala Val
340 345 350

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

	<400> 4	
	tggaactacag ccacgacaaa cg	22
	<210> 5	
	<211> 22	
5	<212> DNA	
	<213> γ	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 5	
10	aggaaggaca tcattatccc cg	22
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 6	
	caccagcccc gagatTTTT c	21
	<210> 7	
20	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 7	
	tcagaaacca gatggcgt	18

REIVINDICACIONES

1. Un ratón con un gen activado, que comprende un polinucleótido que codifica un C5aR humanizado, en donde el exón endógeno 3 del *locus* C5aR de ratón ha sido reemplazado por una secuencia correspondiente que codifica un C5aR humano.
- 5 2. Un ratón con un gen activado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el exón endógeno 3 del *locus* C5aR de ratón ha sido reemplazado por medio de una recombinación homóloga dirigida a la diana por la secuencia correspondiente que codifica el C5aR humano.
- 10 3. Un ratón con un gen activado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia como la mostrada en la SEQ ID NO: 3 o una de sus variantes alélicas.
4. Un ratón con un gen activado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el polinucleótido comprende una secuencia como la mostrada en la SEQ ID NO:2 o una de sus variantes alélicas.
- 15 5. Una (o varias) célula(s) aislada(s), una línea celular, un tejido o u órgano obtenidos del ratón con un gen activado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo la(s) célula(s) aislada(s), la línea celular, el tejido o el órgano un polinucleótido que codifica un C5aR humanizado.
6. Un método para producir un ratón con un gen activado para analizar compuestos para un efecto sobre un fenotipo asociado con la señalización del C5aR, que comprende reemplazar el exón endógeno 3 del *locus* C5aR de ratón por una secuencia correspondiente que codifica el C5aR humano.
- 20 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el exón endógeno 3 del *locus* C5aR de ratón es reemplazado por medio de una recombinación homóloga dirigida a la diana por la secuencia correspondiente que codifica el C5aR humano.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde una construcción polinucleotídica del genoma de ratón con un gen activado con un exón 3 reemplazado codifica un polipéptido que comprende una secuencia como la mostrada en la SEQ ID NO:3 o una de sus variantes alélicas.
- 25 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde una construcción polinucleotídica del genoma de ratón con un gen activado con un exón 3 reemplazado comprende una secuencia como la mostrada en la SEQ ID NO:2 o una de sus variantes alélicas.
- 30 10. Un método para evaluar al menos un efecto farmacocinético y/o farmacodinámico de un compuesto candidato, que comprende administrar un compuesto candidato a un ratón con un gen activado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o a un tejido o células aislados del mismo, y examinar al menos un efecto farmacocinético y/o farmacodinámico del compuesto candidato en el ratón con un gen activado.
- 35 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde al menos uno de los efectos farmacocinéticos examinados es volumen de distribución, depuración total, unión a proteínas, unión a tejidos, depuración metabólica, depuración renal, depuración hepática, depuración biliar, absorción intestinal, biodisponibilidad, biodisponibilidad relativa, depuración intrínseca, tiempo medio de permanencia, tasa máxima de metabolismo, constante de Michaelis-Menten, coeficientes de reparto entre tejidos y sangre o plasma, fracción excretada inalterada en orina, fracción de fármaco convertido sistemáticamente en metabolitos, constante de la velocidad de eliminación, semi-vida o depuración de la secreción.
- 40 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde al menos uno de los efectos farmacodinámicos es la modulación de un fenotipo asociado con la señalización de C5aR.
- 45 13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende (i) administrar un compuesto candidato a un ratón con un gen activado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o a un tejido o a células aislados obtenidos del mismo en condiciones en las que se exprese al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR; y (ii) monitorizar el desarrollo de al menos un fenotipo después de la administración del compuesto.
- 50 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además: (iii) comparar la extensión del fenotipo en el ratón con un gen activado o en las células derivadas del mismo, al cual se administró el compuesto, con la de un mamífero o células derivadas del mismo de control, en donde una diferencia en la naturaleza o extensión del fenotipo cuando se compara con el mamífero de control indica el potencial del compuesto para modular la actividad del C5aR.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende: (i) administrar un compuesto candidato a un ratón con un gen activado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un tejido o a células aislados obtenidos del mismo en condiciones en las se exprese que al menos un fenotipo asociado con la señalización del

C5aR; (ii) monitorizar el desarrollo de al menos uno de los fenotipos después de la administración del compuesto; y opcionalmente (iii) comparar la extensión del fenotipo en el ratón con un gen activado, al cual se administró el compuesto, con la de un mamífero de control, en donde una reducción o inhibición en la naturaleza o extensión del fenotipo cuando se compara con el mamífero de control indica el potencial del compuesto para inhibir o reducir la actividad del C5aR.

5

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende: (i) administrar un compuesto candidato a un ratón con un gen activado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o a un tejido o a células aislados obtenidos del mismo, en condiciones en las que se exprese al menos un fenotipo asociado con la señalización del C5aR; (ii) monitorizar el desarrollo de al menos uno de los fenotipos después de la administración del compuesto; y opcionalmente (iii) comparar la extensión del fenotipo en el ratón con un gen activado, al cual se administró el compuesto, con la de un mamífero de control, en donde una potenciación en la naturaleza o extensión del fenotipo cuando se compara con el mamífero de control indica el potencial del compuesto para promover o potenciar la actividad del C5aR.

10

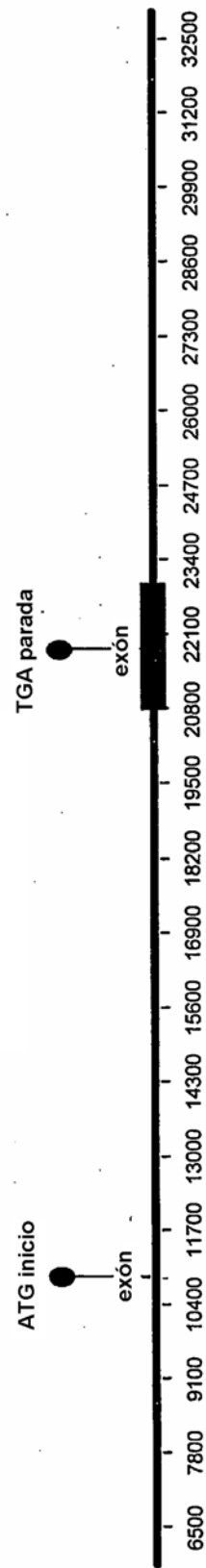
17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en: un péptido, incluyendo un péptido derivado del C5aR o de la C5a u otro péptido no C5aR y capaz de inhibir, reducir o reprimir una función del C5aR y un mutante dominante-negativo del C5aR; un inhibidor no peptídico del C5aR; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al C5aR e inhibe una función del C5aR; una molécula orgánica pequeña, un ácido nucleico que codifica dicho péptido derivado del C5aR o de la C5a u otro inhibidor peptídico que no es C5aR, un ácido nucleico antisentido dirigido contra el mRNA que codifica el C5aR, una ribozima anti-C5aR y un pequeño RNA de interferencia (RNAi) que tiene como diana la expresión del gen C5aR.

15

20

Construcción de un ratón con el gen C5aR humano activado

Locus C5aR humano



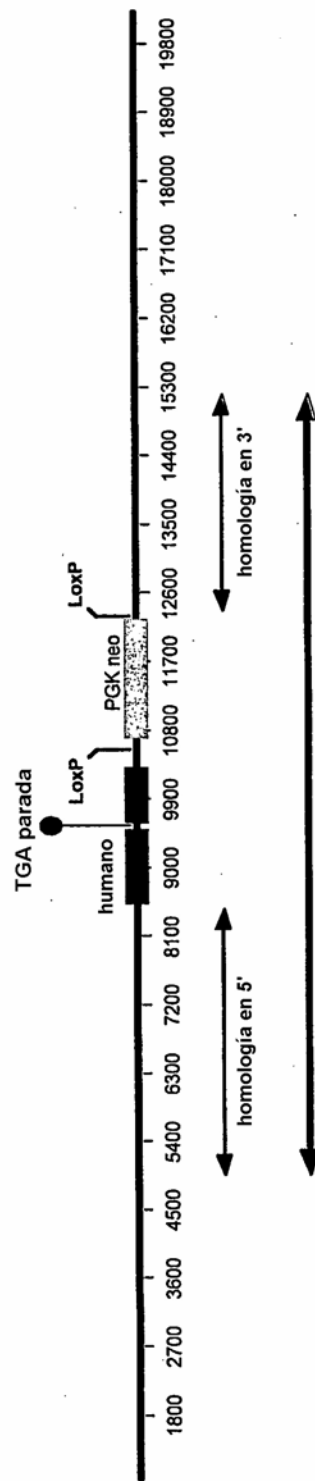
Locus C5aR de ratón



Figura 1

Construcción de un ratón con el gen C5aR activado

Locus del C5aR de ratón señalado como diana



Vector con la diana

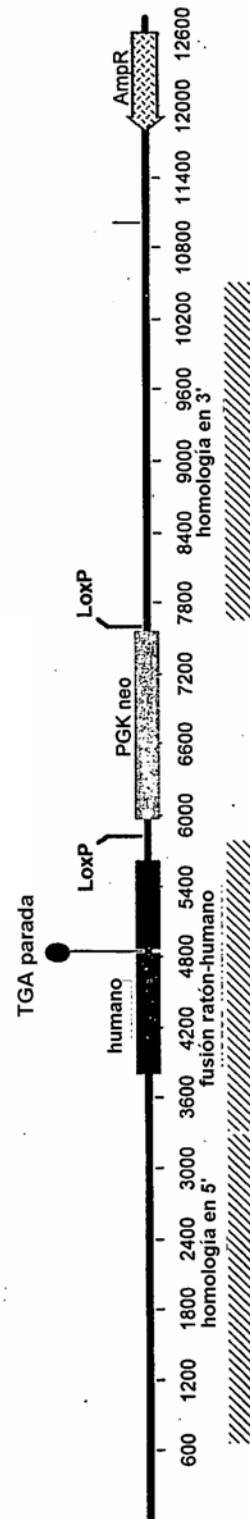


Figura 1 continuación

Locus del gen C5aR de humano/ratón final después de la delección del gen PGKneo por Cre-recombinasa

Locus con Cre delecionado

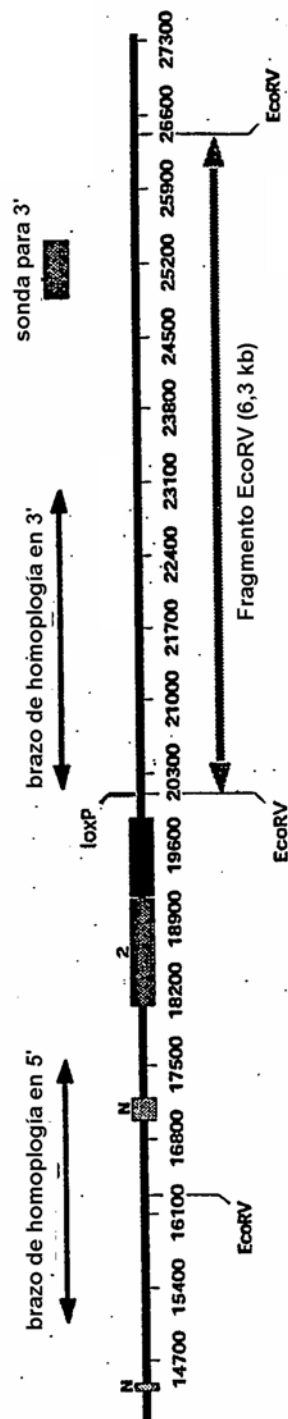


Figura 2

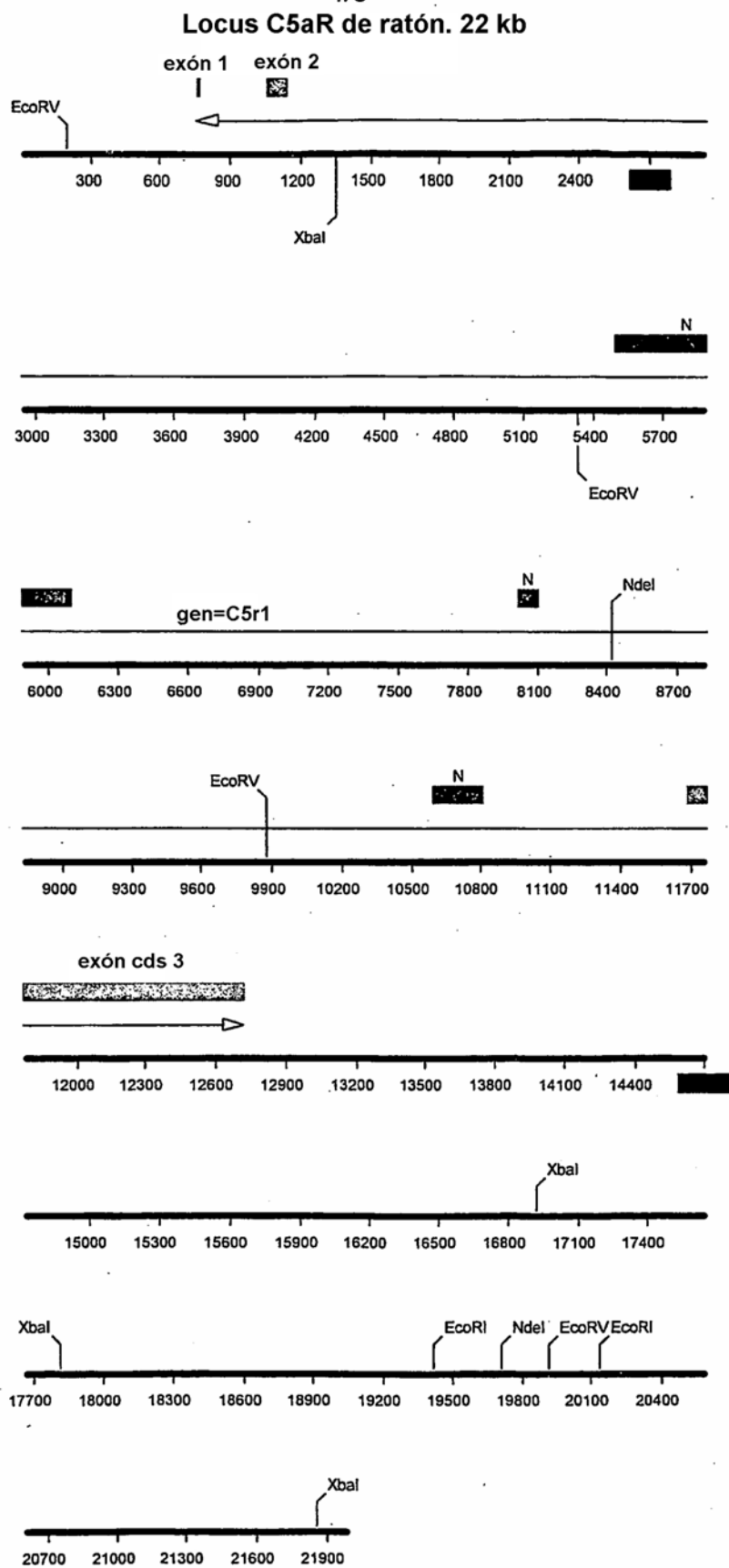
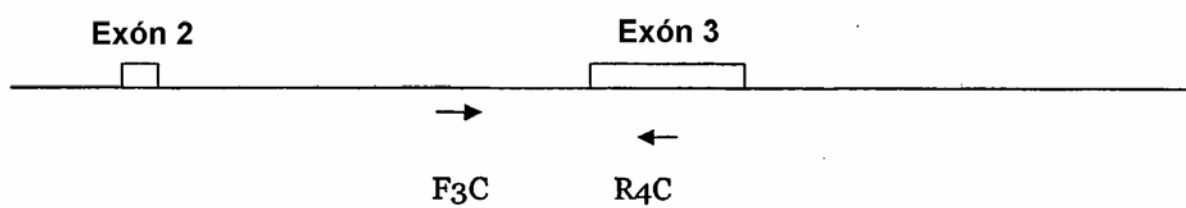


Figura 3



Locus de fusión ratón/humano (el dibujo no es a escala)

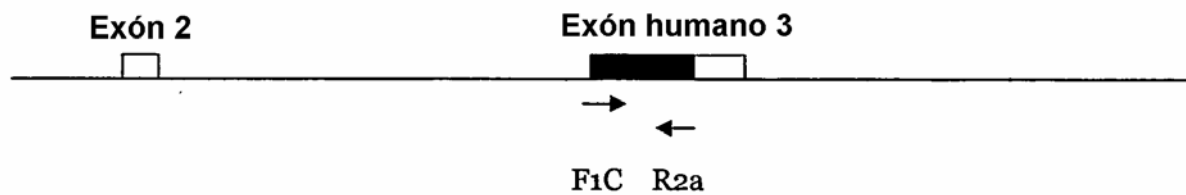


Figura 4

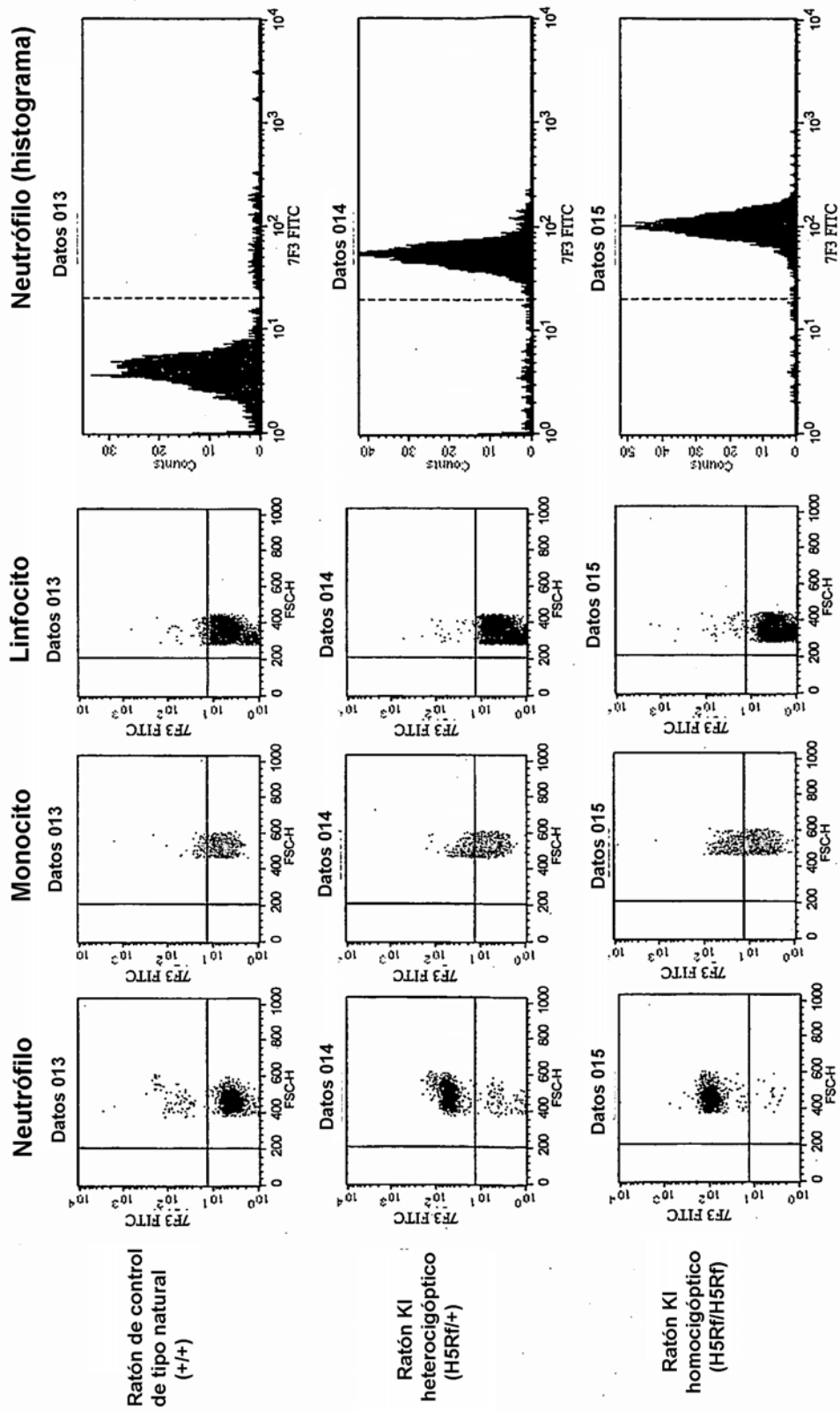


Figura 5

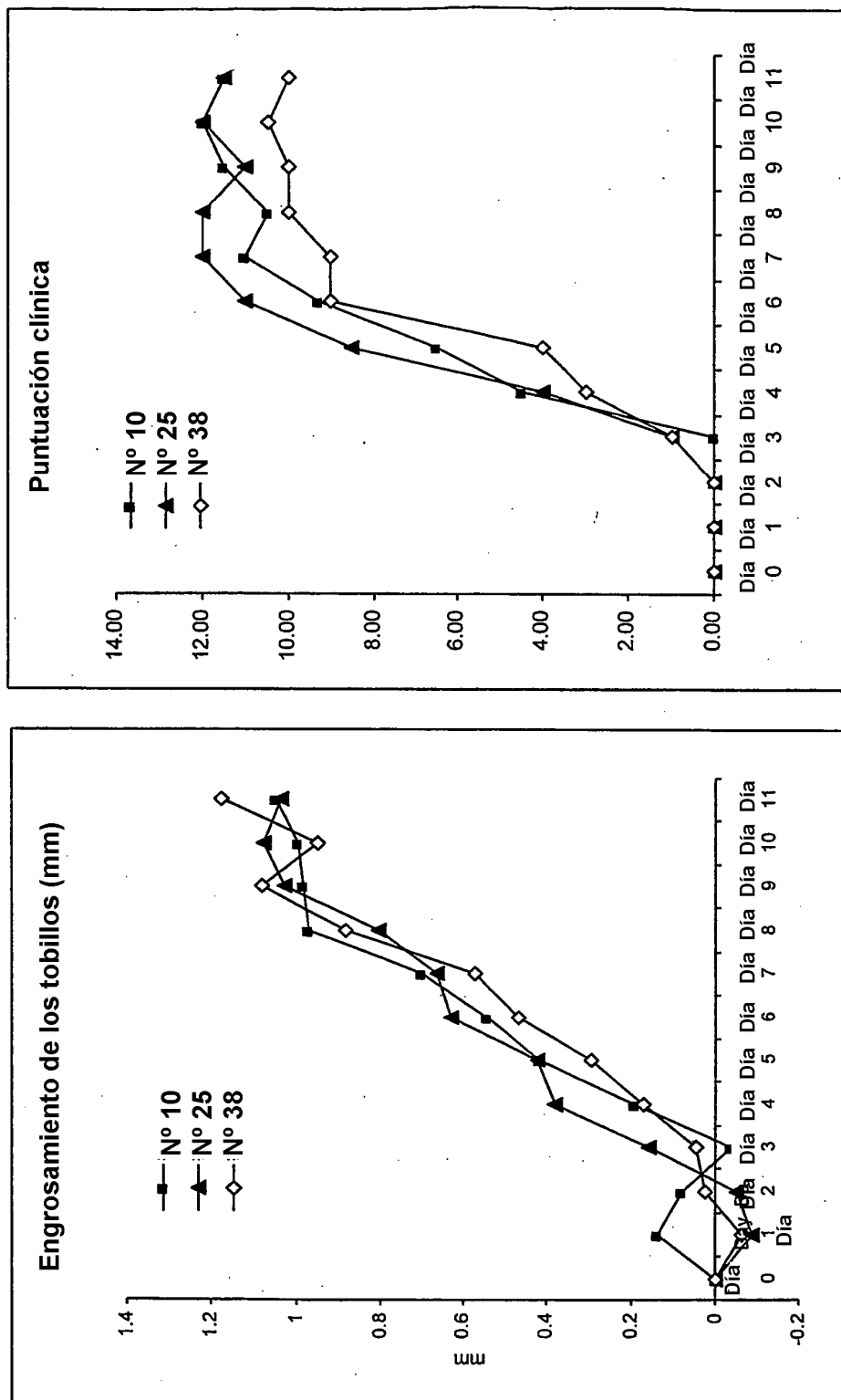


Figura 6

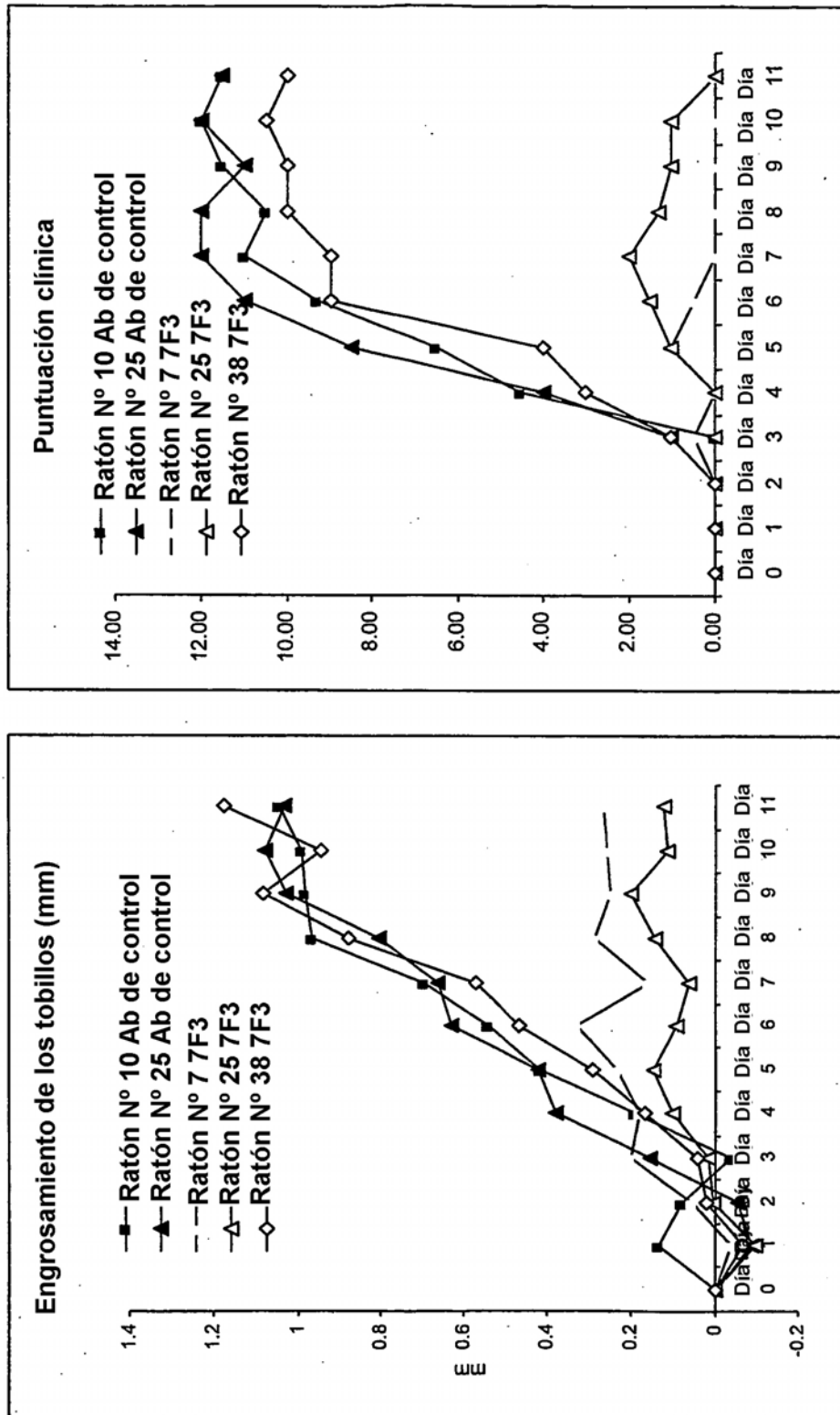


Figura 7