

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 139**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04801190 .2**  
96 Fecha de presentación: **02.12.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1689775**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

54 Título: **PROTEINAS DE UNIÓN A GAG.**

30 Prioridad:  
**04.12.2003 AT 19522003**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.11.2011**

73 Titular/es:  
**PROTAFFIN BIOTECHNOLOGIE AG  
IMPULSZENTRUM GRAZ-WEST  
REININGHAUSSTRASSE 13A  
8020 GRAZ, AT**

72 Inventor/es:  
**KUNGL, Andreas J.**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 369 139 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Proteínas de unión a GAG

5 La presente invención se refiere a métodos y herramientas para la inhibición de la interacción de las quimoquinas y sus receptores de alta afinidad sobre los leucocitos, y a métodos para el tratamiento terapéutico de las enfermedades inflamatorias.

10 Las quimoquinas, derivadas originalmente de las citoquinas quimioatrayentes, actualmente comprenden más de 50 miembros y representan una familia de proteínas pequeñas, inducibles y secretadas de bajo peso molecular (6 a 12 kDa en su forma monomérica) que desempeñan un papel decisivo durante la inmunovigilancia y los procesos inflamatorios. Dependiendo de su función en la inmunidad y la inflamación, pueden agruparse en dos clases. Las quimoquinas inflamatorias son producidas por células de muchos tejidos diferentes, así como por leucocitos inmigrantes en respuesta a toxinas bacterianas y citoquinas inflamatorias como IL-1, TNF e interferones. Su función principal es reclutar leucocitos para la defensa del huésped, y en el proceso de la inflamación. Las quimoquinas de alojamiento, por otra parte, se expresan constitutivamente en áreas definidas de los tejidos linfoides. Dirigen el tráfico y alojamiento de linfocitos y células dendríticas dentro del sistema inmunológico. Estas quimoquinas, tal como se ilustra mediante BCA-1, SDF-1 ó SLC, controlan la relocalización y recirculación de los linfocitos en el contexto de la maduración, diferenciación y activación, y garantizan su alojamiento correcto dentro de los órganos linfoides secundarios. A pesar del gran número de representantes, las quimoquinas muestran pliegues estructurales notablemente similares, aunque la homología de secuencia varía entre el 20 y el 70 por ciento. Las quimoquinas consisten de aproximadamente 70 a 130 aminoácidos con cuatro residuos conservados de cisteína. Las cisteínas forman dos enlaces disulfuro (Cys 1→Cys 3, Cys 2→Cys 4) que son responsables de su estructura tridimensional característica. Las citoquinas quimiotácticas consisten de un dominio aminoterminal corto (3 a 10 aminoácidos) que precede al primer residuo de cisteína, un núcleo formado de cadenas β y bucles conectores presentes entre el segundo y cuarto residuos de cisteína, así como una hélice α carboxi-terminal de 20 a 60 aminoácidos. El núcleo de proteína presenta una estructura bien ordenada, mientras que las partes N-terminal y C-terminal se encuentran desordenadas. Al igual que las proteínas secretorias, se sintetizan con una secuencia líder de 20 a 25 aminoácidos que se escinde antes de la liberación. Las quimoquinas se han subdividido en cuatro familias basándose en la posición relativa de sus residuos cisteína en la proteína madura. En la subfamilia de las quimoquinas α, las primeras dos de las cuatro cisteínas se encuentran separadas por un único aminoácido (CXC), mientras que en las quimoquinas β, los residuos cisteína correspondientes son contiguos (CC). Las quimoquinas α pueden clasificarse adicionalmente en aquellas que contienen la secuencia ELR en el extremo N-terminal, siendo de esta manera quimiotácticas para los neutrófilos (IL-8, por ejemplo), y aquellas que carecen del motivo ELR y que actúan sobre los linfocitos (I-TAC, por ejemplo) Estructuralmente, las quimoquinas β pueden subdividirse en dos familias: la familia de la proteína quimioatrayente de monocitos eotaxina, que contiene las cinco proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCP) y la eotaxina, que son aproximadamente 65 por ciento idénticas entre sí, y las quimoquinas β restantes. Al igual que la familia de CXC, los aminoácidos N-terminales que preceden a los residuos CC son componentes críticas para la actividad biológica y la selectividad de leucocitos de las quimoquinas. Las quimoquinas β, en general, no actúan sobre los neutrófilos pero atraen a los monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos con selectividad variable. Sólo unas cuantas quimoquinas encajan en la familia de CC o de CXC. La linfotactina es hasta el momento la única quimoquina que muestra sólo dos, en lugar de las cuatro, cisteínas características, en su estructura primaria, y de esta manera se clasifica como quimoquina Y o como quimoquina C. Por otra parte, concluyendo esta clasificación, debe mencionarse la fractalquina como único representante de la subfamilia de δ o CXXXXC, con tres aminoácidos que separan las dos primeras cisteínas. Las dos, la linfotaxina y la fractalquina, inducen la quimiotaxis de las células T y de las células asesinas naturales.

50 Las quimoquinas inducen la migración y activación celulares al unirse a una superficie celular específica, sienten receptores transmembranales (7TM) acoplados a proteína G sobre las células diana. Hasta el momento se han clonado dieciocho receptores de quimoquina, entre ellos seis receptores CXC, diez CC, un CX3C y un XC. Los receptores de quimoquina se expresan sobre diferentes tipos de leucocitos, algunos de ellos restringidos a determinadas células (por ejemplo CXCR1 se restringe a los neutrófilos), mientras que otros se expresan más ampliamente (por ejemplo CCR2 se expresa sobre monocitos, células T, células asesinas naturales y basófilos). De manera similar a las quimoquinas, los receptores pueden expresarse constitutivamente sobre determinadas células, mientras que algunas son inducibles. Algunas de ellas incluso pueden regularse negativamente, provocando que las células no respondan a una quimoquina determinada pero sigan siendo sensibles a otra. La mayoría de receptores reconoce más de una quimoquina y viceversa, aunque el reconocimiento se restringe a quimoquinas de la subfamilia correspondiente (ver la Tabla 1).

60

**Tabla 1**

Quimoquina	Receptor	Quimiotáctico para	Enfermedades inflamatorias
------------	----------	--------------------	----------------------------

Quimoquina CXC (+motivo ELR)	IL-8	CXCR1 CXCR2	Neutrófilos	Síndrome del distrés respiratorio Agudo [71]; Neumonía bacteriana [72]; Artritis reumatoide [73]; Enfermedad intestinal inflamatoria [74]; Soriasis [75]; Meningitis bacteriana [76]
Quimoquina CC	MCP-1	CCR2	Basófilos; Monocitos; células T activadas; células dendríticas; células asesinas naturales	Asma [77]; Glomerulonefritis [78]; Aterosclerosis [79]; enfermedad intestinal inflamatoria [80]; Soriasis [81]; Meningitis bacteriana y vírica [82,83]
	RANTES	CCR1	Eosinófilos; Monocitos; Células T activadas; células dendríticas cells	Asma [84];Glomerulonefritis [85]
		CCR3	Eosinófilos; Basófilos; células dendríticas	
		CCR5	Monocitos; células T activadas Células dendríticas; Células asesinas naturales	

Las quimoquinas presentan dos sitios principales de interacción con sus receptores, uno en el dominio aminoterminal y el otro dentro de un bucle expuesto del esqueleto que se extiende entre el segundo y el tercer residuo de cisteína. Ambos sitios son mantenidos en estrecha proximidad por los enlaces disulfuro. El receptor reconoce el primer sitio de unión dentro de la región de bucle que aparentemente funciona como un dominio de anclaje. Esta interacción restringe la movilidad de la quimoquina, facilitando de esta manera la orientación correcta del dominio aminoterminal. Se han llevado a cabo estudios con quimoquinas mutantes que todavía se unían con efectividad a sus receptores pero que no señalizaban. Se obtuvieron estos mutantes mediante delección o modificación de aminoácidos dentro de los extremos N-terminales de, por ejemplo, IL-8, RANTES y MCP-1.

Las múltiples rutas intracelulares de señalización se producen tras la activación de receptores como resultado de la unión de quimoquinas. Las quimoquinas también interactúan con dos tipos de moléculas no señalizadoras. Una es el receptor DARC, que se expresa en eritrocitos y sobre células endoteliales y que se une a CC, así como a quimoquinas CXC, impidiendo su circulación. El segundo tipo son los glucosaminoglucanos heparán sulfato (GAGs), que son parte de los proteoglicanos y que sirven como correceptores de las quimoquinas. Capturan y presentan las quimoquinas sobre la superficie del tejido de alojamiento (por ejemplo las células endoteliales) con el fin de establecer un gradiente local de concentraciones. En una respuesta inflamatoria, tal como en la artritis reumatoide, los leucocitos que ruedan sobre el endotelio en un proceso mediado por selectina se ponen en contacto con las quimoquinas presentadas por los proteoglicanos sobre la superficie celular. De esta manera, las integrinas de los leucocitos resultan activadas, lo que conduce a adhesión firme y extravasación. Los leucocitos reclutados resultan activados por las citoquinas inflamatorias locales y pueden quedar desensibilizadas frente a la señalización posterior de quimoquinas debido a la elevada concentración local de las mismas. Para mantener un gradiente de quimoquinas en el flujo sanguíneo del tejido, el receptor DARC funciona como sumidero del exceso de quimoquinas.

Los proteoglicanos heparán sulfato (HS), que consisten de una proteína nuclear con cadenas laterales de glucosaminoglucano (GAGs) unidas covalentemente, se encuentran en la mayoría de las células y tejidos de mamífero. Aunque la parte proteína determina la localización del proteoglicano en la membrana celular o en la matriz

extracelular, el componente glucosaminoglicano media en interacciones con una diversidad de ligandos extracelulares, tales como factores de crecimiento, quimoquinas y moléculas de adhesión. La biosíntesis de los proteoglicanos ha sido revisada extensamente con anterioridad. Son grupos importantes de los proteoglicanos de superficie celular, la familia sindecán de proteínas transmembranales (cuatro miembros en los mamíferos) y la familia glicán de proteínas unidas a la membrana celular por una cola glucosilfosfatidilinositol (GPI) (seis miembros en los mamíferos). Aunque los glicanes se expresan ampliamente en el sistema nervioso, en el riñón y, en menor grado, en el músculo esquelético y liso, el sindecán-1 es el HSPG principal en las células epiteliales, el sindecán-2 predomina en los fibroblastos y en las células endoteliales, y el sindecán-3 es abundante en las células neuronales, mientras que el sindecán-4 se expresa ampliamente. La mayoría de las cadenas de GAG añadidas a las proteínas nucleares de sindecán a través de una región de enlace tetrasacárido en serinas particulares son cadenas de HS. Aunque las secuencias de aminoácidos de los dominios extracelulares de los tipos específicos de sindecán no se encuentran conservadas en diferentes especies, al contrario que los dominios transmembranales y citoplasmáticos, el número y las posiciones de las cadenas de GAG se encuentran altamente conservadas. Sin embargo, la estructura de las GAGs es específica de especie y, además, es dependiente de la naturaleza del tejido que expresa HSPG.

El heparán sulfato (HS) es el miembro más abundante de la familia de los glucosaminoglicanos (GAG) de polisacáridos lineales, que también incluye la heparina, el condroitín sulfato, el dermatán sulfato y el queratán sulfato. El HS natural se caracteriza por una cadena lineal de 20 a 100 unidades de disacárido compuestas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y ácido D-glucurónico (GlcA) que pueden modificarse para que incluyan la N-sulfatación y la O-sulfatación (sulfatación 6-O y 3-O de la glucosamina y la sulfatación 2-O del ácido urónico), así como la epimerización del ácido  $\beta$ -D-glucurónico en ácido  $\alpha$ -L-idurónico (IdoA).

Las agrupaciones de residuos de azúcar N-sulfatados y O-sulfatos, separadas por regiones de baja sulfatación, se presume que son responsables principalmente de las numerosas propiedades de unión de proteínas y de regulación del HS. Además de las interacciones electrostáticas de los grupos sulfato del HS con aminoácidos básicos, se cree que las interacciones de van der Waals e hidrofóbicas se encuentran implicadas en la unión de proteínas. Además, la presencia de residuos iduronato conformacionalmente flexibles aparentemente favorecen la unión de GAG a proteínas. Otros factores tales como el espaciado entre los sitios de unión de proteínas también desempeñan un papel crucial en las interacciones de unión de proteína-GAG: por ejemplo la dimerización del interferón y inducida por HS requiere cadenas de GAG con dos secuencias de unión de proteínas separadas por una región de 7 kDa con un bajo grado de sulfatación. En ocasiones resultan necesarias secuencias adicionales para la actividad biológica completa de algunos ligandos: para proporcionar soporte a la transducción de señales de FGF-2, HS debe presentar tanto la secuencia de unión mínima como residuos adicionales que se presume interactúan con el receptor de FGF.

Las proteínas de unión a heparina con frecuencia contienen secuencias de consenso que consisten de agrupaciones de residuos de aminoácidos básicos. La lisina, arginina, asparagina, histidina y glutamina se encuentran implicadas con frecuencia en contactos electrostáticos con los grupos sulfato y carboxilo en el GAG. El espaciado de los aminoácidos básicos, en ocasiones determinado por la estructura 3-D de las proteínas, se cree que controla la especificidad y afinidad de unión de GAG. La actividad biológica del ligando también puede resultar afectada por la cinética de la interacción de HS-proteína. La reducción de la magnitud de la difusión del factor de crecimiento es una de las funciones sugeridas para HSPG, para el que el carácter de repetición larga de las cadenas de GAG, así como sus tasas relativamente rápidas de activación y desactivación de unión de proteína resultan idóneas. En algunos casos, la cinética, no la termodinámica, controla la función fisiológica de la unión de la proteína HS. La mayoría de ligandos de HS requieren secuencias de GAG de longitud y estructura bien definidas. La heparina, producida por los mastocitos, es estructuralmente muy similar al heparán sulfato pero se caracteriza por niveles más altos de modificaciones posteriores a la polimerización que resultan en un grado uniformemente alto de sulfatación con un grado relativamente reducido de diversidad estructural. De esta manera, los bloques altamente modificados en el heparán sulfato en ocasiones se denominan "de tipo heparina". Por ello, la heparina puede utilizarse como análogo perfecto del HS en los estudios biofísicos de proteínas, debido a que, además, se encuentra disponible en cantidades más elevadas y, por lo tanto, resulta menos caro que el HS. Se ha demostrado que diferentes tipos celulares sintetizan proteoglicanos de diferente estructura de glucosaminoglicano que cambia durante la patogénesis, durante el desarrollo o en respuesta a señales extracelulares tales como factores de crecimiento. Esta diversidad estructural de los HSPGs conduce a una elevada versatilidad de unión que subraya la gran importancia que presentan los proteoglicanos.

Desde la demostración de que los proteoglicanos heparán sulfato resultan críticos para la señalización de FGF, se han llevado varias investigaciones que demuestran la importancia de la unión de quimoquina-GAG para la estimulación de la actividad de las quimoquinas. En primer lugar, prácticamente todas las quimoquinas estudiadas hasta el momento aparentemente se unen a HS *in vitro*, sugiriendo que esto representa una propiedad fundamental de estas proteínas. En segundo lugar, el descubrimiento de que los linfocitos T secretan *in vivo* quimoquinas-CC en forma de un complejo con glucosaminoglicanos indica que esta forma de interacción es fisiológicamente relevante. Además, es conocido que la asociación de las quimoquinas con el HS ayuda a estabilizar los gradientes de concentración a través de la superficie endotelial, proporcionando de esta manera información direccional para los

leucocitos migrantes. También se cree que el HS protege a las quimoquinas de la degradación proteolítica e induce su oligomerización, estimulando de esta manera concentraciones localmente elevadas en la vecindad de los receptores de señalización acoplados a proteína G. Sin embargo, la relevancia funcional de la oligomerización sigue siendo controvertida, aunque todas las quimoquinas presentan una base estructural clara para la multimerización.

5 Se observa la dimerización a través de la asociación de las hojas  $\beta$  en todas las quimoquinas de la familia de CXC (por ejemplo IL-8), al contrario que la mayoría de miembros de la familia de quimoquinas-CC (por ejemplo RANTES), que se dimeriza a través de sus cadenas N-terminales.

10 Se han acumulado muchos datos sobre la inhibición por parte de compuestos de bajo peso molecular de la interacción entre quimoquinas y sus receptores de alta afinidad presentes sobre los leucocitos. Sin embargo, no se han producido avances sustanciales en el tratamiento terapéutico de las enfermedades inflamatorias mediante este enfoque.

15 La interleuquina-8 (IL-8) es una molécula clave implicada en la atracción de los neutrófilos durante la inflamación crónica y aguda. Hasta hoy se han seguido varios enfoques para bloquear la acción de IL-8, desde la inhibición de la producción de IL-8 mediante, por ejemplo, glucocorticoides, vitamina D3, ciclosporina A, el factor de crecimiento transformante 15, los interferones, etc., todos ellos inhibidores de la actividad de IL-8 al nivel de la producción de ARNm de IL-8. Un enfoque adicional utilizado anteriormente para inhibir la unión de IL-8 a sus receptores mediante la utilización de anticuerpos específicos contra el receptor presente sobre los leucocitos o contra la IL-8 misma, con el fin de actuar como antagonistas específicos y por lo tanto para inhibir la actividad de IL-8.

20

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una estrategia alternativa para la inhibición o alteración de la interacción de quimoquinas/receptores sobre leucocitos. Específicamente, la diana de dicha estrategia debe ser la acción de IL-8, RANTES o MCP-1.

25

La presente invención se refiere a un método para modificar una región de unión a GAG que es una hélice  $\alpha$  C-terminal de una quimoquina, a quimoquinas modificadas, a un ácido polinucleico aislado, a un vector, a una célula recombinante, a una preparación farmacéutica y a una utilización según las reivindicaciones.

30 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para producir nuevas proteínas de unión a GAG, así como proteínas de unión a GAG alternativas que muestran una afinidad (más) alta a un correceptor de GAG (que el tipo salvaje). Dichas proteínas de unión a GAG modificadas pueden actuar como competidores con las proteínas de unión a GAG de tipo salvaje y son capaces de inhibir o regular negativamente la actividad de la proteína de unión a GAG de tipo salvaje, sin embargo sin los efectos secundarios que se producen con las proteínas recombinantes conocidas utilizadas en el estado de la técnica. Las moléculas según la presente invención no muestran las desventajas anteriormente indicadas. Las presentes quimoquinas de unión a GAG modificadas pueden utilizarse en fármacos para diversos usos terapéuticos, en particular para el tratamiento de enfermedades inflamatorias sin las desventajas conocidas que se producen en las quimoquinas recombinantes conocidas del estado de la técnica. La modificación del sitio de unión a GAG según la presente invención resulta ser una estrategia ampliamente aplicable para quimoquinas con un sitio de GAG. Las moléculas preferentes según la presente invención con una afinidad de unión a GAG más elevada demostraron ser específicamente ventajosas con respecto a sus efectos biológicos, especialmente con respecto a su actividad antiinflamatoria, debido a su competición con moléculas de tipo salvaje para el sitio de GAG.

35

40

45 Método para introducir un sitio de unión a GAG en una proteína, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- identificar una región en una proteína que no resulte esencial para el mantenimiento de la estructura,- introducir por lo menos un aminoácido básico en dicho sitio y/o delecionar por lo menos un aminoácido voluminoso y/o ácido en dicho sitio, de manera que dicho sitio de unión a GAG presente una afinidad de unión a GAG de  $K_d \leq 10$  mM, preferentemente  $\leq 1$  mM, todavía más preferentemente  $\leq 0,1$  mM. Mediante la introducción de por lo menos un aminoácido básico y/o la delección de por lo menos un aminoácido voluminoso y/o ácido en dicha región, se introduce un nuevo sitio "artificial" mejorado de unión a GAG en dicha proteína. Ello comprende la introducción completa nueva de un sitio de unión a GAG en una proteína que no mostraba una actividad de unión a GAG antes de dicha modificación. Ello también comprende la introducción de un sitio de unión a GAG en una proteína que ya mostraba actividad de unión a GAG. El nuevo sitio de unión a GAG puede introducirse en una región de la proteína que no mostraba afinidad de unión a GAG, así como en una región que sí mostraba afinidad de unión a GAG. Con la realización de la presente invención, se proporciona una modificación de la afinidad de unión a GAG de una quimoquina de unión a GAG dada, incrementando la capacidad de unión a GAG de la proteína modificada en comparación con la proteína de tipo salvaje. La presente invención se refiere a un método para modificar un sitio de unión a GAG que es una hélice C-terminal de una quimoquina, a una proteína de unión a GAG modificada, así como a una molécula aislada de ADN, un vector, una célula recombinante, una composición farmacéutica y la utilización de dicha proteína modificada.

50

55

60

- La expresión "introducir por lo menos un aminoácido básico" se refiere a la introducción de aminoácidos adicionales, así como la sustitución de aminoácidos. El propósito principal es incrementar la cantidad relativa de aminoácidos básicos, preferentemente Arg, Lys, His, Asn y/o Gln, en comparación con la cantidad total de aminoácidos en dicho sitio, de manera que el sitio de unión a GAG resultante preferentemente comprenda por lo menos 3 aminoácidos básicos, más preferentemente 4, y todavía más preferentemente 5 aminoácidos.
- El sitio de unión a GAG preferentemente se encuentra en una posición expuesta a solvente, por ejemplo en un bucle. Esto garantizará una modificación efectiva.
- Puede someterse a ensayo que una región de una proteína resulte esencial o no para el mantenimiento de la estructura, por ejemplo mediante métodos computacionales con programas específicos conocidos por el experto en la materia. Tras la modificación de la proteína, la estabilidad conformacional preferentemente se somete a ensayo *in silico*.
- La expresión "aminoácido voluminoso" se refiere a aminoácidos con cadenas laterales largas o estéricamente interfirientes; en particular son Trp, Ile, Leu, Phe y Tyr. Los aminoácidos ácidos en particular son Glu y Asp. Preferentemente, el sitio de unión a GAG resultante no presenta aminoácidos voluminosos y ácidos, implicando que todos los aminoácidos voluminosos y ácidos han sido eliminados.
- La afinidad de unión a GAG se determina (para el alcance de protección de la presente solicitud) con la constante de disociación  $K_d$ . Una posibilidad es determinar los valores de la constante de disociación ( $K_d$ ) de cualquier proteína dada a partir del cambio estructural producido con la unión de ligando. Son conocidas por el experto en la materia diversas técnicas, por ejemplo titulaciones isotérmicas de fluorescencia, calorimetría de titulación isotérmica, resonancia de plasmón superficial, ensayo de movilidad en gel e, indirectamente, experimentos de competición con ligandos de GAG marcados radioactivamente. Una posibilidad adicional es predecir las regiones de unión a partir del cálculo utilizando métodos computacionales también conocidos por el experto en la materia, en los que pueden utilizarse varios programas.
- Un protocolo para introducir un sitio de unión a GAG en una proteína es, por ejemplo, el siguiente:
- identificar una región de la proteína que no resulte esencial para el mantenimiento estructural global y que pueda resultar adecuado para la unión de GAG,
  - diseñar un nuevo sitio de unión a GAG mediante la introducción (sustitución o inserción) de residuos básicos de Arg, Lys, His, Asp y Gln en cualquier posición, o mediante la delección de aminoácidos que interfieren con la unión de GAG, - comprobar la estabilidad conformacional de la proteína mutante resultante *in silico*,
  - clonar el ADNc de la proteína de tipo salvaje (alternativamente: adquirir el ADNc)
  - utilizar lo anterior como molde para la mutagénesis asistida por PCR para introducir los cambios anteriormente indicados en la secuencia de aminoácidos, - subclonar el gen mutante en un sistema de expresión adecuado (procariótico o eucariótico, dependiendo de las modificaciones post-traduccionales requeridas biológicamente),
  - expresión, purificación y caracterización de la proteína mutante *in vitro*, - criterio para una afinidad de unión a GAG introducida:  $K_d^{GAG}(\text{mutante}) < 10 \text{ mM}$ .
- Son ejemplos de dichas proteínas manipuladas con nuevos sitios de unión a GAG, por ejemplo, la parte Fc de IgG, así como los factores del complemento C3 y C4 modificados del modo siguiente:
- Fc: (439) KSLSLS (444)-> KSKKLS  
 C3: (1297) KSLSLS (1302)-> KSKKLS  
 C4: (1)MLDAERLK (8)-> MKKAKRLK
- Por lo tanto, la proteína inventiva comprende un nuevo (en comparación con la proteína de tipo salvaje) sitio de unión a GAG tal como se ha definido anteriormente y por lo tanto actuará como competidor con las proteínas de unión a GAG naturales, en particular debido a que la afinidad de unión a GAG de la proteína inventiva es muy alta, por ejemplo  $K_d \leq 10 \text{ mM}$ .
- Un aspecto adicional de la presente invención es una quimoquina modificada de unión a GAG, de manera que se modifica una región de unión a GAG que es una hélice  $\alpha$  C-terminal de dicha proteína, mediante sustitución, inserción y/o delección de por lo menos un aminoácido con el fin de incrementar la cantidad relativa de aminoácidos básicos en dicha región de unión a GAG y/o se reduce la cantidad de aminoácidos voluminosos y/o ácidos en dicha región de unión a GAG, preferentemente en una posición expuesta a solventes, y en la que la afinidad de unión a

GAG de dicha proteína se incrementa en comparación con la afinidad de unión a GAG de una proteína de tipo salvaje respectiva.

5 Inesperadamente se ha encontrado que, mediante el incremento de la cantidad relativa de aminoácidos básicos, en particular de Arg, Lys, His, Asn y Gln, en la región de unión a GAG, la proteína de unión a GAG modificada muestra una afinidad de unión a GAG incrementada en comparación con las proteínas de tipo salvaje, en particular en el caso de que la cantidad relativa de aminoácidos básicos se encuentre incrementada en una posición expuesta a solventes, debido a que se ha demostrado que un área con carga positiva sobre la superficie de la proteína incrementa la afinidad de unión. Preferentemente se encuentran presentes por lo menos 3, más preferentemente 4 y  
10 todavía más preferentemente 5, aminoácidos básicos en la región de unión a GAG.

La expresión "proteína de unión a GAG" se refiere a cualquier proteína que se una a un correceptor de GAG. Puede someterse a ensayo si una proteína se une a un correceptor de GAG o no, con ayuda de protocolos conocidos tales como los indicados anteriormente. Hileman *et al.* (BioEssays 20:156-167, 1998) dan a conocer sitios de consenso en proteínas de unión a glucosaminoglucano. La información dada a conocer en dicho artículo también resulta útil como información inicial para la presente invención. El término "proteína" aclara que las moléculas proporcionadas por la presente invención presenta una longitud de por lo menos 80 aminoácidos. Esto resulta necesario para que sean candidatos adecuados para la presente estrategia antiinflamatoria. No se conocen moléculas de menor tamaño que interactúen con un sitio de unión a GAG y que sean fisiológica o patológicamente relevantes debido a dicha interacción, y por lo tanto no son relevantes para la presente invención. Preferentemente, las moléculas según la presente invención están compuestas de por lo menos 90, por lo menos 100, por lo menos 120, por lo menos 150, por lo menos 200, por lo menos 300, por lo menos 400 ó por lo menos 500 residuos aminoácidos.

Dentro del alcance de la presente solicitud, la expresión "region de unión a GAG" se define como una región que se une a GAG con una constante de disociación (valor de  $K_d$ ) inferior a 100 mM, preferentemente inferior a 50 mM, todavía más preferentemente inferior a 20 mM, determinada mediante titulación isotérmica de fluorescencia (ver los ejemplos, posteriormente).

Cualquier modificación indicada en la presente solicitud puede llevarse a cabo mediante métodos bioquímicos conocidos, por ejemplo la mutagénesis sitio-dirigida. También debe indicarse que la clonación molecular de los sitios de unión a GAG es, evidentemente, de la técnica anterior (ver, por ejemplo, las patentes WO n° 96/34965 A, n° 92/07935, Jayaraman *et al.* (FEBS Letters 482:154-158, 2000), patente WO n° 02/20715 A, Yang *et al.* (J. Cell. Biochem. 56:455-468, 1994), en el que se describe la reorganización molecular o la síntesis de novo de regiones de GAG; Butcher *et al.* (FEBS Letters 4009:183-187, 1997) (se refiere a péptidos artificiales, no a proteínas); JinnoOUE *et al.*, J. Virol. 75:12439-12445, 2001; síntesis *de novo*.

La región de unión a GAG puede modificarse mediante sustitución, inserción y/o delección. Ello implica que puede sustituirse un aminoácido no básico por un aminoácido básico, puede insertarse un aminoácido básico en la región de unión a GAG o puede deleccionarse un aminoácido no básico. Además, se deleciona un aminoácido que interfiere con la unión de GAG, preferentemente con la unión de todos los aminoácidos interfirientes. Dichos aminoácidos son, en particular, aminoácidos voluminosos, tal como se ha indicado anteriormente, así como aminoácidos ácidos, por ejemplo Glu y Asp. Puede examinarse si un aminoácido interfiere con la unión a GAG o no utilizando, por ejemplo, métodos matemáticos o computacionales. El resultado de cualquiera de dichas modificaciones es que se incrementa la cantidad relativa de aminoácidos básicos en dicha región de unión a GAG, en donde "relativa" se refiere a la cantidad de aminoácidos básicos en dicha región de unión a GAG en comparación con el número total de aminoácidos en dicha región de unión a GAG. Además, se delecionan los aminoácidos que interfieren estérica o electrostáticamente con la unión a GAG.

Puede determinarse la presencia o ausencia de un aminoácido en una posición expuesta a solventes, por ejemplo con ayuda de la estructura tridimensional conocida de la proteína o con ayuda de métodos computacionales tal como se ha indicado anteriormente.

Puede determinarse si la afinidad de unión a GAG de dicha proteína modificada se encuentra incrementada o no en comparación con la afinidad de unión a GAG de la proteína de tipo salvaje respectiva, tal como se ha indicado anteriormente con ayuda de, por ejemplo, experimentos de titulación fluorescente que determinan las constantes de disociación. El criterio de afinidad de unión a GAG mejorada será  $K_d$  (mutante) <  $K_d$  (tipo salvaje), preferentemente en por lo menos el 100%. Las proteínas modificadas específicamente mejoradas presentan (en comparación con la  $K_d$  de tipo salvaje), una afinidad de unión a GAG que es superior en un factor de, como mínimo, 5, preferentemente de como mínimo 10, todavía más preferentemente de como mínimo 100. Por lo tanto, la afinidad de unión a GAG incrementada preferentemente muestra una  $K_d$  inferior a 10 mM, preferentemente inferior a 1 mM, todavía más preferentemente inferior a 0,1 mM.

Mediante el incremento de la afinidad de unión a GAG, la proteína modificada actúa como antagonista específica y compite para la unión a GAG con la proteína de unión a GAG de tipo salvaje.

Preferentemente, se inserta por lo menos un aminoácido básico seleccionado de entre el grupo que consiste de Arg, Lys e His en dicha región de unión a GAG. Estos aminoácidos se insertan fácilmente en dicha región de unión a GAG, de manera que el término "insertado" se refiere a una inserción como tal, así como a la sustitución de cualquier aminoácido no básico por arginina, lisina o histidina. Evidentemente resulta posible insertar más de un aminoácido básico, de manera que puede insertarse el aminoácido básico o también una combinación de dos o tres de los aminoácidos anteriormente indicados.

La proteína es una quimoquina, preferentemente IL-8, RANTES o MCP-1. Es conocido que las quimoquinas presentan un sitio de interacción con el correceptor GAG, de manera que la unión de esta quimoquina con frecuencia es una condición para la activación adicional del receptor, tal como se ha indicado anteriormente. Debido a que las quimoquinas con frecuencia se encuentran en las enfermedades inflamatorias, resulta de gran interés bloquear la activación del receptor de quimoquina. Dichas quimoquinas preferentemente son IL-8, RANTES o MCP-1, que son moléculas bien caracterizadas y de las que son bien conocidas las regiones de unión a GAG (ver, por ejemplo, Lortat-Jacob *et al.*, PNAS 99(3):1229-1234, 2002). Mediante el incremento de la cantidad de aminoácidos básicos en la región de unión a GAG de estas quimoquinas, se incrementa su afinidad de unión y por lo tanto las quimoquinas de tipo salvaje se unirán menos frecuentemente o nada en absoluto, dependiendo de la concentración de la proteína modificada con respecto a la concentración de la proteína de tipo salvaje.

Dicha región de unión a GAG es una hélice  $\alpha$  C-terminal. Un monómero químico típico se organiza en torno a un esqueleto de tres cadenas antiparalelas (3 hojas superpuestas por una hélice  $\alpha$  C-terminal). Se ha demostrado que dicha hélice  $\alpha$  C-terminal en las quimoquinas se encuentra implicada mayoritariamente en la unión a GAG, de manera que la modificación de esta hélice  $\alpha$  C-terminal para incrementar la cantidad de aminoácidos básicos resulta en una quimoquina modificada con una afinidad de unión a GAG incrementada.

Preferentemente, la afinidad de unión incrementada es una afinidad de unión incrementada a heparán sulfato y/o a heparina. El heparán sulfato es el miembro más abundante de la familia GAG de polisacáridos lineales, que también incluye la heparina. La heparina es estructuralmente muy similar al heparán sulfato, caracterizada por niveles más altos de modificaciones posteriores a la polimerización que resultan en un grado uniformemente alto de sulfatación con un grado relativamente reducido de diversidad estructural. Por lo tanto, los bloques altamente modificados en el heparán sulfato en ocasiones se denominan "de tipo heparina", y la heparina puede utilizarse como análogo del heparán sulfato para estudios biofísicos de proteínas. En cualquier caso, ambos, el heparán sulfato y la heparina, resultan particularmente adecuados.

Todavía más preferentemente, se modifica una región biológicamente activa adicional, inhibiendo o regulando negativamente de esta manera una actividad biológica adicional de dicha proteína. Esta actividad biológica adicional es conocida para la mayoría de proteínas de unión a GAG, por ejemplo para las quimoquinas.

Ésta es la región de unión a un receptor, por ejemplo al receptor 7TM.

El término "adicional" define una región biológicamente activa que no es la región de unión a GAG que, sin embargo, se une a otras moléculas, células o receptores y/o los activa. Mediante la modificación de esta región biológicamente activa adicional, la actividad biológica adicional de dicha proteína resulta inhibida o regulada negativamente, se proporciona de esta manera una proteína modificada que es una antagonista fuerte de la proteína de tipo salvaje. Esto significa que, por una parte, la afinidad de unión a GAG es más alta que la proteína de unión a GAG de tipo salvaje, de manera que la proteína modificada se une mayoritariamente a GAG en lugar de a la proteína de tipo salvaje. Por otra parte, la actividad adicional de la proteína de tipo salvaje que se produce principalmente en el caso de que la proteína se encuentre unida a GAG, resulta inhibida o regulada negativamente, ya que la proteína modificada no lleva a cabo dicha actividad específica o la lleva a cabo en un grado menor. Con esta proteína modificada se proporciona un antagonista efectivo de las proteínas de unión a GAG de tipo salvaje, que no muestra los efectos secundarios conocidos de otras proteínas recombinantes, tal como se describe en el estado de la técnica. Esta región biológicamente activa adicional puede determinarse, por ejemplo, *in vitro* mediante ensayo de competición de receptores (utilizando quimoquinas de tipo salvaje marcadas fluorescentemente, flujo de entrada de calcio y la migración celular (por leucocitos nativos o líneas celulares establemente transfectadas con 7TM). Son ejemplos de dichas regiones biológicamente activas adicionales, además de sitios de unión a receptor adicionales (tal como en la familia del factor de crecimiento), sitios enzimáticos (tal como de hidrolasas, liasas, sulfotransferasas, N-desacetilasas y copolimerasas), sitios de interacción con proteínas (tal como la antitrombina III) y dominios de unión a membrana (tales como la proteína gD del virus del herpes simplex). Con esta realización preferente de proteínas doblemente modificadas, por lo tanto, se proporcionan mutantes dominantes (respecto a la unión a GAG) negativos (respecto al receptor), que son específicamente ventajosos con respecto a los objetivos fijados por la presente invención.

Todavía preferentemente, dicha región biológicamente activa adicional se modifica mediante delección, inserción y/o sustitución preferentemente con alanina, un residuo estérico y/o electrostáticamente similar. Evidentemente resulta posible deleccionar o insertar o sustituir por lo menos un aminoácido en dicha región biológicamente activa adicional. Sin embargo, también resulta posible proporcionar una combinación de por lo menos dos de dichas modificaciones o de la totalidad de las tres. Mediante la sustitución de un aminoácido dado por alanina o un residuo estéricamente/electrónicamente similar ("similar" se refiere al aminoácido que se sustituye), la proteína modificada

se encuentra modificada estéricamente/electroestáticamente en grado reducido o no modificada. Ello resulta particularmente ventajoso, ya que otras actividades de la proteína modificada, en particular la afinidad con la región de unión a GAG, no resultan modificadas.

5 Dicha proteína es una quimoquina y dicha actividad biológica adicional es ventajosamente la activación de leucocitos. Tal como se ha indicado anteriormente, las quimoquinas se encuentran implicadas en la atracción de los leucocitos durante la inflamación crónica y aguda. Por lo tanto, mediante la inhibición o regulación negativa de la activación de los leucocitos, se reduce o se inhibe la inflamación, lo que convierte a esta proteína modificada particular en una importante herramienta para estudiar, diagnosticar y tratar las enfermedades inflamatorias.

10 Según un aspecto ventajoso, dicha proteína es IL-8 y dicha región biológicamente activa adicional se encuentra localizada dentro de los primeros 10 aminoácidos N-terminales. Los primeros aminoácidos N-terminales se encuentran implicados en la activación leucocitaria, en la que se identificó en particular que Glu-4, Leu-5 y Arg6 resultaban esenciales para la unión y activación del receptor. Por lo tanto, estos tres, o incluso la totalidad de los 10 primeros aminoácidos N-terminales, pueden sustituirse o deletionarse con el fin de inhibir o regular negativamente la unión y activación del receptor. Una proteína ventajosa adicional es un mutante de IL-8 con delección de los primeros 6 aminoácidos N-terminales. Tal como se ha indicado anteriormente, este mutante no se unirá, o se unirá en menor grado, y activará, los leucocitos, de manera que resulta particularmente adecuado para estudiar, diagnosticar y tratar las enfermedades inflamatorias.

20 Un aspecto adicional de la presente invención es una molécula aislada de ácido polinucleico que codifica la proteína inventiva tal como se ha indicado anteriormente. El ácido polinucleico puede ser ADN o ARN. De esta manera, las modificaciones que conducen a la proteína modificada inventiva se llevan a cabo a nivel del ADN o ARN. Esta molécula aislada inventiva de ácido polinucleico resulta adecuada para métodos diagnósticos, así como para la terapia génica y la producción de proteínas modificadas inventivas a gran escala.

30 Todavía preferentemente, la molécula aislada de ácido polinucleico se hibrida con la molécula de ácido polinucleico inventiva anteriormente definida bajo condiciones astringentes. Dependiendo de las condiciones de hibridación, se forman dúplex complementarios entre las dos moléculas de ADN o ARN, en el caso de ser perfectamente correspondientes o también en el caso de que comprendan bases desapareadas (ver Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2a edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Las sondas de longitud superior a aproximadamente 50 nucleótidos pueden incluir hasta 25 a 30% de bases desapareadas. Las sondas de menor tamaño incluirán menos desapareamientos. La tendencia de una diana y una sonda a formar un dúplex que contiene pares de bases desapareados está controlada por la astringencia de las condiciones de hibridación, las cuales son una función de factores tales como la concentración salina o de formamida en el tampón de hibridación, la temperatura de la hibridación y las condiciones de lavado posterior a la hibridación. Mediante la aplicación de principios bien conocidos que se producen durante la formación de dúplex híbridos, el experto en la materia puede conseguir condiciones que presentan la astringencia deseada, mediante la selección de entre una diversidad de tampones de hibridación, temperaturas y condiciones de lavado. De esta manera, pueden seleccionarse condiciones que permitan la detección de dúplex híbridos perfectamente apareados o parcialmente desapareados. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de un dúplex resulta útil para seleccionar las condiciones de hibridación apropiadas. Las condiciones astringentes de hibridación para moléculas polinucleótidas de longitud superior a 200 nucleótidos típicamente implican la hibridación a una temperatura entre 15°C y 25°C inferior a la temperatura de fusión del dúplex esperado. Para sondas oligonucleótidas de más de 30 nucleótidos, que forman dúplex menos estables que las sondas más largas, la hibridación astringente habitualmente se consigue mediante la hibridación a una temperatura 5°C a 10°C inferior a la  $T_m$ . La  $T_m$  de un dúplex de ácidos nucleicos puede calcularse utilizando una fórmula basada en el porcentaje de G+C contenido en los ácidos nucleicos y que considere la longitud de las cadenas, tal como la fórmula  $T_m = 81,5 - 16,6(\log[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ de G+C}) - (600/N)$ , en la que N=longitud de la cadena.

50 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un vector que comprende una molécula aislada de ADN según la presente invención tal como se ha definido anteriormente. El vector comprende todos los elementos reguladores necesarios para la transfección eficiente, así como para la expresión eficiente de las proteínas. Dichos vectores son bien conocidos de la técnica y puede seleccionarse cualquier vector adecuado con este fin.

55 Un aspecto adicional de la presente solicitud se refiere a una célula recombinante que resulta establemente transfectada con un vector inventivo tal como se ha indicado anteriormente. Dicha célula recombinante, así como cualquier célula descendiente de la misma, comprende el vector. De esta manera, se proporciona una línea celular que expresa la proteína modificada continuamente o tras la activación, dependiendo del vector.

60 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína, un ácido polinucleico o un vector según la presente invención tal como se ha definido anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Evidentemente la composición farmacéutica puede comprender además sustancias adicionales que se encuentran habitualmente presentes en composiciones farmacéuticas, tales como sales, tampones, emulgentes, agentes colorantes, etc.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la utilización de la proteína modificada, de un ácido polinucleótido o de un vector según la presente invención tal como se ha definido anteriormente, en un método para inhibir o suprimir la actividad biológica de la proteína de tipo salvaje respectiva. Tal como se ha indicado anteriormente, la proteína modificada actuará como antagonista, de manera que los efectos secundarios que se producen con las proteínas recombinantes conocidas no se producirán con la proteína modificada inventiva. En el caso de las quimoquinas, lo anterior será en particular la actividad biológica implicada en las reacciones inflamatorias.

Por lo tanto, una utilización adicional de la proteína modificada, ácido polinucleico o vector según la presente invención es en un método para producir un medicamento destinado al tratamiento de una condición inflamatoria. En particular, en el caso de que la proteína modificada sea una quimoquina, actuará como antagonista sin efectos secundarios y resultará particularmente adecuada para el tratamiento de una condición inflamatoria. Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente solicitud también es un método para el tratamiento de una condición inflamatoria, en el que una proteína modificada según la presente invención, la molécula aislada de ácido polinucleico o un vector según la presente invención o una composición farmacéutica según la presente invención, se administra en un paciente. Preferentemente, la condición inflamatoria se selecciona de entre un grupo que comprende artritis reumatoide, soriasis, osteoartritis, asma, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple. Debido a que la activación mediante quimoquinas puede resultar inhibida con una proteína modificada según la presente invención, las reacciones inflamatorias pueden inhibirse o regularse negativamente, de manera que pueden prevenirse o tratarse las condiciones inflamatorias anteriormente indicadas.

La presente invención se describe en mayor detalle con ayuda de los ejemplos y figuras siguientes, a los cuales, sin embargo, la invención no se encuentra limitada, en los que la fig. 1 es un espectro de CD; la fig. 2 muestra el contenido de estructura secundaria de diversos mutantes; las figs. 3 y 4 muestran gráficos de resultados de los ensayos de anisotropía de fluorescencia de diversos mutantes; la fig. 5 muestra el gráfico de los resultados de titulaciones isotérmicas de fluorescencia; la fig. 6 muestra los resultados de experimentos de desplegamiento de diversos mutantes; la fig. 7 muestra el índice de quimiotaxis de mutantes de IL-8, y la fig. 8 muestra los resultados del ensayo de quimiotaxis de RANTES.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Generación de genes de IL-8 recombinantes y clonación de los mutantes

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar los ADNc deseados para los mutantes mediante la introducción de las mutaciones utilizando cebadores de mutagénesis de sentido y antisentido. Se utilizó un plásmido sintético que contenía el ADNc para wtIL-8 como molde, la mezcla de polimerasas Clontech Advantage<sup>®</sup> 2 como ADN polimerasa, y la reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un ciclador Mastergradiente de Eppendorf. Los cebadores de mutagénesis utilizados se resumen en

la tabla a continuación, empezando con las secuencias directas (5' a 3'):

- CACC ATG TGT CAG TGT ATA AAG ACA TAC TCC (cebador para la mutación Δ6)
- CACC ATG TGT CAG TGT ATA AAG ACA TAC TCC AAA CCT AGG CAC CCC AAA AGG ATA (cebador para la mutación Δ6 F17R F21R)

Las secuencias inversas (5' a 3') eran:

- TTA TGA ATT CCT AGC CCT CTT (cebador para la mutación E70R)
- TTA TGA ATT CTT AGC CCT CTT (cebador para la mutación E70K)
- TTA TGA CTT CTC AGC CCT CTT (cebador para la mutación N71K)
- TTA TGA CTT CTT AGC CCT CTT (cebador para la mutación E70K N71K)
- TTA TGA CTT CCT AGC CCT CTT (cebador para la mutación E70R N71K)
- TTA TGA CCT CTT AGC CCT CTT (cebador para la mutación E70K N71R)
- TTA TGA CCT CCT AGC CCT CTT (cebador para la mutación E70R N71R)

Se purificaron los productos de PCR, se clonaron en el vector pCR<sup>®</sup> T7/NT-TOPO<sup>®</sup> TA (Invitrogen) y se transformaron en E. coli competentes TOP10F (Invitrogen). Como etapa siguiente, se llevó a cabo una confirmación de la

secuencia mediante secuenciación de ADN de doble cadena utilizando un secuenciador ABI PRISM CE1.

### Ejemplo 2: Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

5 Tras confirmar las secuencias, se transformaron los constructos en *E. coli* BL21(DE3) de competencia preparada con calcio, para la expresión. Se cultivaron las células bajo agitación en 1 litro de caldo Lennox (Sigma) que contenía 100 mg/l de ampicilina a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,8. Se llevó a cabo la inducción de la expresión de proteínas mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM. Cuatro horas después, se recolectaron las células mediante centrifugación a 6.000g durante 20 minutos. A continuación, se resuspendió el pellet celular en un tampón que contenía Tris/HCl 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8, se sonicó a 100 vatios durante 5x20 s y finalmente se centrifugó nuevamente durante 20 minutos a 10.000g. Debido a que la fracción principal de las proteínas IL-8 recombinantes se encontró en cuerpos de inclusión, se seleccionaron condiciones desnaturalizantes para la purificación adicional. De esta manera, se resuspendió el pellet celular en un tampón de Gua/HCl 6 M y MES 50 mM, pH 6,5. A continuación, se agitó la suspensión a 4°C durante 4 horas, seguido de una etapa de diálisis frente a MES 50 mM, pH 6,5. Seguidamente, la suspensión resultante se centrifugó y se filtró para cargarse en una columna de intercambio catiónico fuerte (SP Sepharose® de Pharmacia Biotech). Se consiguió la elución mediante un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en un tampón MES 50 mM, pH 6,5 durante 60 minutos. Tras la liofilización de las fracciones que contenían la proteína deseada, se llevó a cabo una segunda etapa de purificación mediante HPLC de fase inversa utilizando una columna C18. En el caso, se seleccionó un gradiente no lineal de 10% a 90% de acetonitrilo para eluir la proteína deseada. El repliegamiento de la proteína desnaturada se consiguió finalmente con la misma columna de intercambio catiónico bajo las mismas condiciones que las indicadas anteriormente.

25 A continuación, se comprobó la pureza e identidad de la proteína mediante análisis de tinción con plata en el primer caso y análisis de transferencia western con un anticuerpo monoclonal específico contra wIL-8, en el segundo. También se confirmó el repliegamiento de las proteínas mediante mediciones del dicroísmo circular (CD).

### Ejemplo 3: Caracterización biofísica de los mutantes

#### 30 3.1 Mediciones del dicroísmo circular y análisis

Con el fin de investigar los cambios de estructura secundaria de la proteína mutante en presencia y en ausencia de heparán sulfato (HS), se llevó a cabo la espectroscopía de CD. Se registraron las mediciones en un espectropolarímetro Jasco J-710 en un intervalo de 195 a 250 nm, y se utilizó una célula de 0,1 cm de longitud de camino óptico. Se registraron los espectros de las soluciones de proteínas con una concentración de 5 mM con un tiempo de respuesta de 1 s, resolución de paso de 0,2 nm, velocidad de 50 nm/minuto, anchura de banda de 1 nm y una sensibilidad de 20 mdeg. Se calculó el promedio de tres escaneos para obtener espectros suavizados. A continuación, se corrigieron los espectros de proteína para el fondo de la señal de CD, debido al tampón mismo o al tampón/HS. El análisis de estructura secundaria de la proteína en presencia y en ausencia de HS se llevó a cabo finalmente utilizando el programa SELCON.

Debido a la modificación de un gran número de aminoácidos en algunas de las nuevas combinaciones, se intentó encontrar la dimensión de los cambios de estructura secundaria resultantes mediante métodos de dicroísmo circular.

45 Se obtuvieron diferentes estructuras dependiendo de las mutaciones introducidas. Excepto por un mutante expresado (Δ6 F17R F21R E70K N71R) que no mostró ninguna estructura, todos los mutantes mostraron hélices α, hojas β y bucles medibles. En comparación con IL-8wt, únicamente un mutante (Δ6 E70R) mostró una estructura prácticamente similar, mientras que otros diferían principalmente en su hélice α, que comprendía entre 17,2% y 45,2% de la estructura total. Sin embargo, este hecho sugiere que la estructura global de IL-8wt se había mantenido a pesar de las numerosas modificaciones producidas dentro de la secuencia de las proteínas. Esto no podía haberse previsto anteriormente. Tras encontrar que sólo los oligosacáridos de heparán sulfato, y no la heparina, eran capaces de afectar a la estructura secundaria de IL-8wt, la atención se centró en los efectos inducidos por el heparán sulfato no fraccionado. Todos los mutantes examinados mostraron cambios estructurales tras la unión de HS, lo que puede considerarse evidencia de la formación de complejos.

55 Para demostrar los cambios estructurales tras la introducción de mutaciones y la adición de heparán sulfato, se resumen algunos de los datos obtenidos en los gráficos proporcionados anteriormente y posteriormente.

#### 60 3.2 Mediciones de fluorescencia

Para estudiar los cambios de estructura cuaternaria dependiente de la concentración y de ligando, se utilizó la espectroscopía de fluorescencia. Debido a su elevada sensibilidad, que requiere cantidades de tan solo nanogramos de proteína, la técnica de fluorescencia fue el método de elección para llevar a cabo las investigaciones deseadas. Se llevaron a cabo mediciones utilizando un fluorímetro LS50B de Perkin-Elmer (Beaconsfield, Inglaterra).

### 3.3 Anisotropía de fluorescencia

Mediante el registro de la anisotropía de fluorescencia dependiente de la concentración de la quimoquina resultante del cromóforo extrínseco bisANS se intentó encontrar la constante de dimerización de los mutantes. Las mediciones se llevaron a cabo en PBS partiendo de concentraciones altas (hasta 4 mM de proteína), seguido de la dilución por etapas. Para cada punto de datos, se calculó el promedio de las señales de anisotropía ( $r$ ) registradas a 507 nm durante 60 segundos. Se ha informado de que la oligomerización de IL-8 influye relevantemente sobre las propiedades de unión a GAG. A concentración monomérica, el tamaño de la IL-8 unida definió que los oligosacáridos se unían con 1.000 veces más fuerza que a concentración dimerica. Por lo tanto, se investigaron las propiedades de oligomerización de los mutantes de IL-8 a partir de la anisotropía de fluorescencia. Debido a que el fluoróforo intrínseco de IL-8 (Trp57) no era suficientemente sensible para todos los mutantes, se utilizó el fluoróforo extrínseco bis-ANS para estas mediciones. Nuevamente, tal como ya se había advertido para la estructura secundaria, el mutante  $\Delta 6$  E70R mostró una elevada similitud también en la constante de oligomerización ( $k_{\text{oligo}}=350$  nM) respecto a IL-8wt ( $k_{\text{oligo}}=379$  nM). El mutante con la  $k_{\text{oligo}}$  más alta ( $k_{\text{oligo}}=460$  nM), que por lo tanto era el que dimerizaba peor, era  $\Delta 6$  F17RF21R E70RN71K. Algunos estudios anteriores identificaron que las hojas  $\beta$  se encontraban implicadas principalmente en el proceso de dimerización, un hecho que se correlaciona con los resultados para la estructura secundaria de este mutante, que mostraba una contribución muy baja de hoja  $\beta$ , de tan sólo 11,4%. Se encontró que el mutante con la  $k_{\text{oligo}}$  más baja ( $k_{\text{oligo}}=147$  nM) era  $\Delta 6$  F17RF21R E70RN71K, que nuevamente mostró la contribución más alta de estructura de hoja  $\beta$  (29,8%) de entre todos los mutantes investigados. También se investigó el impacto de la adición de heparán sulfato. Al igual que para IL-8wt, con el que el heparán sulfato provocó un desplazamiento de la constante de oligomerización a niveles mucho más altos ( $k_{\text{oligo}}=1,075$  mM), esto también se observó para los mutantes de IL-8 investigados.  $\Delta 6$  F17RF21R E70K se desplazó de 0,147 mM a 1,162 mM, y el mutante  $\Delta 6$  E70R, de 0,350 mM a 1,505 mM, en presencia de heparán sulfato. Algunos de los resultados obtenidos se muestran en las figs. 3 y 4, en donde la fig. 3 muestra la dependencia de la anisotropía de fluorescencia de los mutantes de IL-8 en PBS sobre la concentración de quimoquina y la fig. 4 muestra la dependencia de la anisotropía de fluorescencia de  $\Delta 6$  F17RF21R E70K en PBS sobre la concentración de quimoquina en presencia (exceso de diez veces) y en ausencia de HS (concentración de proteína  $p_c=10$  xy exceso). 3.4 Experimentos de titulación isotérmica de fluorescencia (IFT)

Las constantes de disociación (valores de  $K_d$ ) son una medida de la afinidad de unión de un ligando a una proteína y por lo tanto para la determinación de  $K_d$  se utilizó el cambio dependiente de la concentración de las propiedades de emisión de fluorescencia de la proteína (inhibición de fluorescencia) tras la unión de ligando. Debido a que estos mutantes contienen un cromóforo intrínseco de triptófano que se encuentra situado en el sitio de unión a GAG propuesto o próximo al mismo y por lo tanto deberían ser sensible a cambios estructurales tras la unión de ligando, los experimentos de IFT aparentemente resultaban adecuados para este tipo de investigación. Se llevó a cabo la titulación de la intensidad de fluorescencia en PBS utilizando una concentración de proteína de 700 nM. Se registró la emisión de la solución de proteína tras la excitación a 282 nm en un intervalo de 300 a 400 nm tras la adición de una alícuota del ligando respectivo de GAG y un periodo de equilibrado de 60 segundos.

Se investigó la unión a heparina no fraccionada y a heparán sulfato. Se fijaron los mutantes a concentración dimerica para garantizar una sensibilidad suficiente. Se registró una inhibición de la intensidad de fluorescencia de Trp57 tras la unión a GAG de entre 25% y 35%. Se observó una mejora significativa de la unión a ligando, especialmente para la unión de la heparina.  $\Delta 6$  F17RN71R E70K ( $K_d=14$  nM) y  $\Delta 6$  F17RF21R N71K ( $K_d=14,6$  nM) mostraron una unión 2.600 veces mejor, mientras que  $\Delta 6$  E70K N71K ( $K_d=74$  nM) mostró una unión 1.760 veces mejor en comparación con IL-8wt ( $K_d=37$  mM). También se obtuvieron buenos resultados para la unión del heparán sulfato. Para  $\Delta 6$  F17RN71R E70K se encontró una  $K_d$  de 107 nM; para  $\Delta 6$  F17RF21R N71K la  $K_d$  era de 95 nM y el mutante  $\Delta 6$  E70K N71K mostró una  $K_d$  de 34 nM. Debido a que IL-8wt se une a una  $K_d$  de 4,2 mM, las  $K_d$  encontradas para los mutantes representan una mejora extraordinaria de la unión; ver la fig. 5.

### 3.5 Experimentos de desplegamiento

Con el fin de obtener información sobre la estabilidad de las proteínas y si la estabilidad resultaba modificada por la unión del ligando de GAG, se llevaron a cabo experimentos de desplegamiento. Tal como se ha indicado anteriormente, las técnicas de fluorescencia son muy sensibles para observar los cambios de la estructura cuaternaria y por lo tanto también son un método de elección para investigar los cambios de estructura térmica de la proteína. Se realizaron mediciones tal como se ha descrito para la IFT en la que no se modificó la concentración de ligando sino la temperatura. Se observó la estructura de la proteína a una concentración de 0,7 mM entre las temperaturas de 15°C y 85°C en ausencia y en presencia de un exceso de 10 veces de heparán sulfato o de heparina.

El máximo de emisión de las proteínas se encontraba comprendido entre 340 nm y 357 nm, valores que son típicos para un residuo triptófano expuesto a solvente. Partiendo de experimentos de desplegamiento a 15°C, el máximo de emisión de los mutantes variaba entre 340 y 351 nm. En comparación con IL-8wt, cuyo máximo de emisión se

observó a 340 nm, lo anterior implica valores ligeramente más altos. Tras incrementarse la temperatura, se redujo la intensidad máxima de emisión, acompañado de un desplazamiento del máximo a una longitud de onda más alta o más baja. El máximo de emisión de  $\Delta 6$  E70R y de  $\Delta 6$  E70K N71K se desplazó de 352,5 a 357 nm y de 343 a 345 nm, lo que es típico de una exposición adicional del residuo Trp57 al solvente debido al incremento de temperatura, pero resulta interesante que los mutantes  $\Delta 6$  F17RN71R E70K y  $\Delta 6$  F17RF21R E70R N71K mostraron un desplazamiento al azul, de 350 a 343 nm y, menos pronunciado, de 350 a 348 nm (ver la fig. 6). Mediante la reducción lenta de la temperatura el proceso de desplegamiento resultó parcialmente reversible, tanto respecto al desplazamiento de longitud de onda como a los cambios de intensidad. La adición de un exceso de 5 veces de heparán sulfato condujo a un incremento de la estabilidad de las proteínas, probablemente a través de la formación de complejo. Esto pudo observarse por una parte en un desplazamiento del punto de fusión a una temperatura más alta, y por otra parte en un desplazamiento significativamente menos pronunciado del máximo de emisión al incrementarse la temperatura.

#### **Ejemplo 4: Ensayo basado en células de la función "negativa para receptor" de los mutantes de IL-8 dominantes-negativos**

Con el fin de caracterizar la función alterada de receptor de los mutantes de IL-8 con respecto a la atracción de los neutrófilos, se sometió a ensayo la quimiotaxis basada en transfilto de los neutrófilos en respuesta a los mutantes de IL-8 en una cámara de microquimiotaxis dotada de una membrana de policarbonato sin PVP de 5 mm.

Preparación de las células:

Brevemente, se preparó una fracción de neutrófilos a partir de sangre humana recién recolectada. Lo anterior se llevó a cabo mediante la adición de una solución de dextrano al 6% a sangre tratada con heparina (1:2) que seguidamente se dejó que sedimentase durante 45 minutos. La solución celular transparente en la parte superior se recogió y se lavó dos veces con HBSS sin Ca ni Mg. Se realizó un recuento de las células y finalmente se diluyeron con HBSS a razón de 2 millones/ml de células en suspensión, considerando que únicamente 60% de las células contadas eran neutrófilos.

Ensayo de quimiotaxis:

Se diluyeron mutantes de IL-8 a concentraciones de 10 mg/ml, 1 mg/ml y 0,1 mg/ml y se introdujeron por triplicado en el compartimiento inferior de la cámara (26 ml por pocillo). Los neutrófilos recién preparados se sembraron en la cámara superior (50 ml por pocillo) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, se desmontó la cámara, se lavó la parte superior del filtro y las células enganchadas a la parte inferior se fijaron con metanol y se tiñeron con soluciones de Hemacolor (Merck). A continuación se contaron las células a una magnificación de 400x en 4 campos de microscopía seleccionados aleatoriamente de cada pocillo. Finalmente, se realizó un gráfico de la media de tres experimentos independientes frente a la concentración de quimoquina. En la figura 7, se muestra el índice de quimiotaxis para diversos mutantes de IL-8. Tal como se esperaba, todos los mutantes mostraban una actividad de unión de receptor significativamente reducida.

#### **Ejemplo 5: Generación de genes RANTES recombinantes, expresión, biofísica y caracterización de la actividad de los mutantes**

El concepto de mutantes dominantes-negativos de quimoquina "enmascaradores de GAG" también se utilizó con RANTES, una quimoquina implicada en reacciones de hipersensibilidad de tipo IV como el rechazo del trasplante, la dermatitis atópica, así como en otros trastornos inflamatorios como la artritis, la glomerulonefritis progresiva y la enfermedad pulmonar inflamatoria.

Se alteró la capacidad de unión a receptor mediante la introducción en la proteína wt de un residuo de metionina iniciador. La expresión de RANTES wt en *E. coli* condujo a la retención de este residuo de metionina, que convierte RANTES wt en un potente inhibidor de la migración de los monocitos, el denominado Met-RANTES. Se introdujeron diferentes mutantes que potenciaban la afinidad de unión a GAG mediante métodos de mutagénesis sitio-dirigida basados en la PCR.

Por estos medios se han clonado, expresado y purificado 9 mutantes de RANTES hasta el momento: Met-RANTES A22K, Met-RANTES H23K, Met-RANTES T43K, Met-RANTES N46R, Met-RANTES N46K, Met-RANTES Q48K, Met-RANTES A22K/N46R, Met-RANTES V49R/E66S y Met-RANTES <sup>15</sup>LSALA<sup>18</sup> V49R/E66S.

Se llevaron a cabo experimentos de titulación isotérmica de fluorescencia para medir las constantes de afinidad relativa (valores de K<sub>d</sub>) de los mutantes de RANTES para heparina de tamaño definido. Tal como puede observarse en la tabla, todas las proteínas mutantes RANTES mostraban afinidades más altas para esta heparina, mostrando los resultados más prometedores Met-RANTES A22K, Met-RANTES H23K, Met-RANTES T43K y Met RANTES A22K/N46R.

	K <sub>d</sub> en nM
RANTES Wt	456,2 ± 8,5
Met-Rantes V49R/E66S	345,5 ± 21,7
Rantes 15LSLA18 V49R/66S	297,3 ± 14,1
Rantes N46R	367,7 ± 11,7
Rantes N46K	257,4 ± 10,2
Rantes H23K	202,5 ± 12,8
Rantes Q48K	383,4 ± 39,6
Rantes T43K	139,2 ± 30,1
Rantes A22K	202,1 ± 9,8
Rantes A22K/N46R	164,0 ± 16,6

5 Ensayo de quimiotaxis de RANTES

Se investigó la migración celular dirigida por un mutante de RANTE utilizando el sistema de cámara Boyden de 48 pocillos dotado de membranas de policarbonato recubiertas de PVP de 5 mm. Se introdujeron diluciones de RANTES y de mutante de RANTES, en RPMI 1640 que contenía HEPES 20 mM, pH 7,3 y 1 mg/ml de BSA, en los pocillos inferiores de la cámara. Se introdujeron 50 ml de suspensiones de células THP-1 (línea celular promonocítica de la colección europea de cultivos celulares) en el mismo medio a razón de 2x10<sup>6</sup> células/ml en los pocillos superiores. Tras un periodo de incubación de 2 horas a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, se lavó la superficie superior del filtro en solución de HBSS. Las células que habían migrado se fijaron en metanol y se tiñeron con solución Hemacolor (Merck). Se contaron cinco magnificaciones 400x por pocillo y se realizó un gráfico de la media de tres experimentos realizados independientemente, frente a la concentración de quimoquina, en la figura 8. Las barras de error representan el error estándar de la media de los tres experimentos. Nuevamente, tal como en el caso de los mutantes de IL-8, todos los mutantes de RANTES mostraban una actividad de unión a receptor significativamente reducida.

20 **Ejemplo 6: Proteínas con regiones de unión a GAG**

Por medios bioinformáticos y proteómicos, se caracterizaron las proteínas de unión a GAG conjuntamente con sus regiones de unión a GAG. En las tablas 2 y 3 a continuación, se muestran quimoquinas con sus regiones de unión a GAG (Tabla 2), y se proporcionan ejemplos de otras proteínas con sus regiones de unión a GAG (Tabla 3).

25

Tabla 2:

Quimoquinas y sus dominios de unión a GAG

Quimoquinas-CXC
<p><u>IL-8</u>: <sup>18</sup>HPK<sup>20</sup>, (R47) <sup>60</sup>RVVEKFLKR<sup>68</sup></p> <p><b>SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR</b></p> <p><b>VVEKFLKRAENS</b></p>
<p><u>MGSA/GROα</u>: <sup>19</sup>HPK<sup>21</sup>, <sup>45</sup>KNGR<sup>48</sup>, <sup>60</sup>KKIIIEK<sup>66</sup></p> <p><b>ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNGRKACLNPASPIVK</b></p> <p><b>KIIEKMLNSDKSN</b></p>
<p><u>MIP-2α/GROβ</u>: <sup>19</sup>HLK<sup>21</sup>, K45, <sup>60</sup>KKIIIEKMLK<sup>68</sup></p> <p><b>APLATELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKNGQKACLNPASPMVK</b></p> <p><b>KIIEKMLKNGKSN</b></p>

NAP-2: <sup>15</sup>HPK<sup>18</sup>, <sup>42</sup>KDGR<sup>45</sup>, <sup>57</sup>KKIVQK<sup>62</sup>

AELRCLCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTNCQVEVIATLKDGRKICLDPDAPRIKKIVQ  
KKLAGDESAD

PF-4: <sup>20</sup>RPRH<sup>23</sup>, <sup>46</sup>KNGR<sup>49</sup>, <sup>61</sup>KKIIKK<sup>66</sup>

EAEEDGDLQCLCVKTTSQVRPRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNRKCICLDLQAPLY  
KKIIKLLES

SDF-1α:K1, <sup>24</sup>KHLK<sup>27</sup>, <sup>41</sup>RLK<sup>43</sup>

KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE  
YLEKALN

quimoquinas-CC

RANTES: (<sup>17</sup>RPLPRAH<sup>23</sup>)<sup>44</sup>RKNR<sup>47</sup>

SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKGCSNPAVVFVTRKNRQVCANPEKKWVRE  
YINSLEMS

MCP-2: <sup>18</sup>RKIPIQR<sup>24</sup>, <sup>46</sup>KRGK<sup>49</sup>  
QPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKERWVRDSMKHLDQIFQN  
LKP MCP-3: <sup>22</sup>KQR<sup>24</sup>, <sup>47</sup>KLDK<sup>50</sup>, <sup>66</sup>KHLDKK<sup>11</sup>

QPVGINSTTCCYRFINKKIPKORLESYRRTTSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKWV  
QDFMKHLDKKTQTPKL

MIP-1α: R17, <sup>44</sup>KRSR<sup>47</sup>

SLAADTPTACCFYSYTSRQIPQNFADYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQK  
YVSDLELSA

MIP-1β:R18, <sup>45</sup>KRSK<sup>48</sup>

APMGSDPPTACCFYSYTARKLPRNFVVDYYETSSLCSQPAVVFQTKRSKQVCADPSESWWQEYVDLEL  
N MPIF-1: R18, <sup>45</sup>KKGR<sup>48</sup>

MDRFHATSADCCISYTPRSIPCSLLESYFETNSECSKPGVIFLTKKGRRFCANPSDKQVQ  
VCMRMLKLDTRIKTRKN

MIP-5 / HCC-2: <sup>40</sup>KKGR<sup>43</sup>

HFAADCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKK  
LKPYSI

Tabla 3:

Factor 1 de biogénesis de peroxisomas

181 TRRAKE 186  
367 QKKI RS 372  
1263 PKRRKN 1268

## ES 2 369 139 T3

	181 TRRAKE 186
	367 QKKIRS 372
	1263 PKRRKN 1268
MLTK-beta	415 SKRRGKKV 422
	312 ERRLKM 317
	416 KRRGKK 421
	312 ERRLKM 317
	416 KRRGKK 421
BHLH factor Hes4	43 EKRRRARI 50
	43 EKRRRA 48
	43 EKRRRA 48
Protocadherina 11	867 MKKKKKKK 874
	867 MKKKKK 872
	867 MKKKKK 872
	899 MKKKKKKK 906
	899 MKKKKK 904
	899 MKKKKK 904
Catenina (proteína asociada a cadherina), delta 1	315 RRRLRS 320
	404 VRKLGK 409
	460 LRKARD 465
	545 RRKLRE 550
	621 AKKGKG 626
	787 AKKLRE 792
	315 RRRLRS 320
	404 VRKLGK 409
	460 LRKARD 465
	545 RRKLRE 550
	621 AKKGKG 626
	787 AKKLRE 792
Receptor muscarínico M5 de la acetilcolina	221 EKRTKD 226
	427 TKRKRV 432
	514 WKKKKV 519
	221 EKRTKD 226
	427 TKRKRV 432
	514 WKKKKV 519
	147 PRRIKA 152
Receptor adrenérgico alfa-2A	224 KRRTRV 229
	147 PRRIKA 152
	224 KRRTRV 229
	440 TKKKTRRR 447
	569 GKRRRRRG 576
	38 ARKGKR 43
	437 GKKTKK 442
Proteína de unión a región REII del promotor de IL-5	444 TRRRRA 449
	569 GKRRRR 574
	38 ARKGKR 43
	437 GKKTKK 442
	444 TRRRRA 449
	569 GKRRRR 574
	291 ARKQKA 296
Mitofusina 1	395 KKKIKE 400
	291 ARKQKA 296
	395 KKKIKE 400

## ES 2 369 139 T3

Proteína N-cym	71 VRRCKI 76 71 VRRCKI 76
Factor 1 regulador de la ubiquitinación de Smad	672 ERRARL 677 672 ERRARL 677
CUG-BP y factor 5 de tipo ETR3	468 MKRLKV 473 475 LKRPKD 480 468 MKRLKV 473 475 LKRPKD 480
EWS-Fli1 del sarcoma de Ewing	347 QRKSKP 352 347 QRKSKP 352
NUF2R	455 LKRKMFKM 462 331 LKKLKT 336 347 VKKEKL 352 331 LKKLKT 336 347 VKKEKL 352
Proteína GLIS2 de dedos de cinc de tipo Kruppel	22 EKREERT 27 22 EKREERT 27
FKSG32	15 LKRVRE 20 431 VRRGRI 436 15 LKRVRE 20 431 VRRGRI 436
PROTEÍNA 1 DE TIPO BARH	175 LKKPRK 180 228 NRRTKW 233 175 LKKPRK 180 228 NRRTKW 233 393 SRKKRED 400 624 GKRKAGKK 631 48 MRKVVF 53 141 IKRQKQ 146 383 ARRKRM 388 393 SRKKRE 398 490 KKKLKI 495 543 ARRSRS 548 550 TRKRKR 555 586 VKKAKT 591 629 GKKDRR 634 48 MRKVVF 53 141 IKRQKQ 146 383 ARRKRM 388 393 SRKKRE 398 490 KKKLKI 495 543 ARRSRS 548 550 TRKRKR 555 586 VKKAKT 591 629 GKKDRR 634 17RRRPKT22
Proteína 1 nucleolar de unión a GTP	138 ERKRKA 143 17 RRRPKT 22 138 ERKRKA 143
EVG1	282 PKKSKS 287 282 PKKSKS 287
ASPL	282 PKKSKS 287 282 PKKSKS 287
Transportador 1 de cinc	477 EKKPRR 482 477 EKKPRR 482

## ES 2 369 139 T3

Autoantígeno uveal	603 EKKGRK 608 995 ERKFKA 1000 1023 VKKNKQ 1028 603 EKKGRK 608 995 ERKFKA 1000 1023 VKKNKQ 1028
RAB39	7 VRRDRV 12 7 VRRDRV 12
Molécula de adhesión celular del síndrome de Down	320 PRKVKS 325 387 VRKDKL 392 320 PRKVKS 325 387 VRKDKL 392
Proteína tirosina fosfatasa, no receptora tipo 12	139 GRKKCERY 146 59 VKKNRY 64 59 VKKNRY 64
Proteína 11 de repetición WD	752 VRKIRF 757 752 VRKIRF 757
Proteína VRG107 relacionada con el cáncer gástrico	20 SRKRQTRR 27 25 TRRRRN 30 25 TRRRRN 30
Proteína 4 de respuesta de crecimiento temprano	356 ARKGRRG 363 452 EKRRHSKV 459 357 RRKGRR 362 357 RRKGRR 362 309 PKRKNKKS 316 226 DKKLRE 231 310 KRKNKK 315
Proteína relacionada con el transporte de vesículas	355 VKRLKS 360 226 DKKLRE 231 310KRKNKK315 355 VKRLKS 360 140 AKKKTKKR 147 141 KKKTKK 146 217 ERRRRE 222 225 RKRQRE 230 233 RRKWKE 238 240 EKRRRK 245 296 DKREKA 301 373 RRRQKE 378 393 MKKEKD 398
UPF3X	426 VKRDRI 431 140 AKKKTKKRD 148 141 KKKTKK 146 217 ERRRRE 222 225 RKRQRE 230 233 RRKWKE 238 240 EKRRRK 245 296 DKREKA 301 373 RRRQKE 378 393 MKKEKD 398 426 VKRDRI 431
Proteína CGI-201, tipo IV	49 ARRTRS 54 49 ARRTRS 54
Proteína 23 de dedo RING	98 KRKIRD 103 98 KRKI RD 103

ES 2 369 139 T3

FKSG17	72 EKKARK 77 95 IRKSKN 100 72 EKKARK 77 95 IRKSKN 100
P83	681 ARKERE 686 681 ARKERE 686
Proteína 1 relacionada con el cáncer ovárico	62 LKRDRF 67 62 LKRDRF 67
Transactivador CIITA del MHC de clase II	407 HRRPRE 412 741 PRKKRP 746 783 DRKQKV 788 407 HRRPRE 412 741 PRKKRP 746 783 DRKQKV 788
Glucoproteína VI-2 de plaquetas	275 SRRKRLRH 282 275 SRRKRL 280 275 SRRKRL 280
Proteína 5 de tipo ubiquitina	11 GKKVRV 16 11 GKKVRV 16
Proteína quinasa D2	191 ARKRRL 196 191 ARKRRL 196
Proteína GSH-2 de caja homeótica	202 GKRMRT 207 252 NRRVKH 257 202 GKRMRT 207 252 NRRVKH 257
Proteína ULBP3	166 ARRMKE 171 201 HRKKRL 206 166 ARRMKE 171 201 HRKKRL 206
Yodotironina desyodinasas de tipo II	87 SKKEKV 92 87 SKKEKV 92 299 SKRCKK 304 299 SKRCKK 304
Antígeno espermático	160 LKKYKE 165 478 IKRLKE 483 160 LKKYKE 165 478 IKRLKE 483
UDP-GalNAc: Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa	4 ARKIRT 9 44 DRRVRS 49 138 PRKCRQ 143 4 ARKIRT 9 44 DRRVRS 49 138 PRKCRQ 143
NCBE	62 HRRHRH 67 73 RKRDRE 78 1012 SKKKKL 1017 62 HRRHRH 67 73 RKRDRE 78 1012 SKKKKL 1017
Proteína de repetición WD	372 LKKKEERL 379 384 EKKQRR 389 400 AKKMRP 405 384 EKKQRR 389 400 AKKMRP 405

## ES 2 369 139 T3

Fosfodiesterasa 11A	27 MRKGGKQ 32 27 MRKGGKQ 32
ATPasa 2 probable transportadora de cationes	891 ERRRRPRD 898 306 SRKWRP 311 891 ERRRRP 896 306 SRKWRP 311 891 ERRRRP 896 420 GKKKKRKR 427 399 ARKERQ 404 420 GKKKKR 425 420 GKKKKRKRE 428 399 ARKERQ 404 420 GKKKKR 425
Factor transcripcional TCF-3 de HMG-box	
HVPS11	793 VRRYRE 798 793 VRRYRE 798
PIST	165 NKKEKM 170 165 NKKEKM 170
Proteína de unión a FYN	473 KKREKE 478 501 KKKFKL 506 682 LKKLKK 687 696 RKKFKY 701 473 KKREKE 478 501 KKKFKL 506 682 LKKLKK 687 696 RKKFKY 701
C1orf25	620 GKKQKT 625 620 GKKQKT 625
C1orf14	441 LRRRKGKR 448 70 LRRWRR 75 441 LRRRKG 446 70 LRRWRR 75 441 LRRRKG 446 144 DKKAKY 149 309 GRREKR 314 144 DKKAKY 149 309 GRREKR 314 121 AKRQRL 126 216 EKRARI 221 230 RKKAKI 235 121 AKRQRL 126 216 EKRARI 221 230 RKKAKI 235
Factor transcripcional TBX3 de T-box	
Proteína ribosómica L47 de 39S mitocondrial	
CGI-203	33 VRRIRD 38 33 VRRIRD 38
Jagged1	1093 LRKRRK 1098 1093 LRKRRK 1098
Proteína membranal 1 secretoria asociada a portador	102 DRRERE 107 102 DRRERE 107

## ES 2 369 139 T3

	673 KKKKSSRL 680
	672 TTKKKS 677
	954 QKRVKE 959
	978 GKRSRT 983
	995 PKRKA 1000
	1338 GKREKS 1343
	1482 HKKHKK 1487
	1489 KKKVKD 1494
Componente DRIP204 de complejo de proteína interactuante con receptor de vitamina D	672 TTKKKS 677
	954 QKRVKE 959
	978 GKRSRT 983
	995 PKRKA 1000
	1338 GKREKS 1343
	1482 HKKHKK 1487
	1489 KKKVKD 1494
Proteína membranal 2 secretoria asociada a portador	100 ERKERE 105
	100 ERKERE 105
Receptor Nogo	420 SRKNRT 425
	420 SRKNRT 425
FLAMINGO 1	169 GRRKRN 174
	2231 ARRQRR 2236
	169 GRRKRN 174
	2231 ARRQRR 2236
Receptor de quimoquina-CC	58 CKRLKS 63
	58 CKRLKS 63
Proteína de unión a elemento regulador de la prolactina	271 HKRLRQ 276
	271 HKRLRQ 276
Proteína de unión a secuencias de señal de recombinación de Kappa B y V(D)J	17 PRKRLTKG 24
	713 RKRRKEKS 720
	903 PPKKRLRL 910
	180 HKKERK 185
	629 TKKTKK 634
	712 LRKRRK 717
	903 PPKKRL 908
	1447 QKRVKE 1452
	1680 SRKPRM 1685
	180 HKKERK 185
	629 TKKTKK 634
	712 LRKRRK 717
	903 PPKKRL 908
	1447 QKRVKE 1452
	1680 SRKPRM 1685
	200 SKRKA 205
Supresor 1 de la metástasis de cáncer de mama	229 IKKARA 234
	200 SKRKA 205
	229 IKKARA 234
Proteína P3 de "Forkhead box"	414 RKKRSQRP 421
	413 FRKKRS 418
	413 FRKKRS 418
PROTEÍNA DE UNIÓN A FAS	228 LKRKLIRL 235
	391 RKKRRARL 398
	358 ARRLRE 363
	390 ERKKRR 395
	629 CKKSRK 634
	358 ARRLRE 363
	390 ERKKRR 395

# ES 2 369 139 T3

	629 CKKSRK 634
Hidrolasa 12 carboxilo-terminal de la ubiquitina	228 HKRMKV 233 244 LKRFKY 249 228 HKRMKV 233 244 LKRFKY 249
Proteína KIAA0472	110 HRKPKL 115 110 HRKPKL 115
PNAS-101	68 LKRSRP 73 106 PRKSRR 111 68 LKRSRP 73 106 PRKSRR 111
PNAS-26	118 DRRTRL 123 118 DRRTRL 123
Factor transcripcional 2 de la mielina	176 GRRKSERQ 183
Cadena gamma de la ATPasa transportadora de sodio/potasio	47 SRRFRC 52 55 NKKRRQ 60 47 SRRFRC 52 55 NKKRRQ 60
Proteína Mdm4	441 EKRPRD 446 464 ARRLKK 469 441 EKRPRD 446 464 ARRLKK 469
Proteína D2 de la familia del antígeno G	87 QKKIRI 92 87 QKKIRI 92
Proteína NipSnap2	153 FRKARS 158 153 FRKARS 158
Estanina	73 ERKAKL 78 73 ERKAKL 78
Cotransportador del bicarbonato sódico	973 EKKKKKKK 980 165 LRKHRH 170 666 LKKFKT 671 966 DKKKKE 971 1 973 EKKKKK 978 165 LRKHRH 170 666 LKKFKT 671 966 DKKKKE 971 973 EKKKKK 978 683 YKRYKV 688 828 EKKKRE 833 1653 LKRIRE 1658 1676 LKKT KC 1681
Miosina X	683 YKRYKV 688 828 EKKKRE 833 1653 LKRIRE 1658 1676 LKKT KC 1681
PNAS-20	21 RKRKSVRG 28 20 ERKRKS 25 20 ERKRKS 25

## ES 2 369 139 T3

Pellino	36 RRKSRF 41 44 FKRPKA 49 36 RRKSRF 41 44 FKRPKA 49
Receptor de motilidad mediado por hialuronano	66 ARKVKS 71 66 ARKVKS 71
Canal de potencial 7 de receptor transitorio corto	753 FKKTRY 758 753 FKKTRY 758
Liprin-alfa2	825 PKKKGIKS 832 575 IRRPRR 580 748 LRKHRR 753 839 GKKEKA 844 875 DRRLKK 880 575 IRRPRR 580 748 LRKHRR 753 839 GKKEKA 844 875 DRRLKK 880 904 DKRKCEERL 911 1035 PRKKRLKS 1042
Factor 1-alfa intermediario de transcripción	321 NKKGKA 326 1035 PRKKRL 1040 321 NKKGKA 326 1035 PRKKRL 1040
PROTEÍNA DE CAPA INTERMEDIA DE CARTÍLAGO	719 QRRNKR 724 719 QRRNKR 724
Proteína 1 que contiene dominio UBX	194 YRKIKL 199 194 YRKIKL 199
Araquidonato 12-lipooxigenasa, tipo 12R	166 VRRHRN 171 233 WKRLKD 238 166 VRRHRN 171 233 WKRLKD 238 159 LRRRRGRE 166 698 LKKRSGKK 705
Proteína hematopoyética de interacción con PBX	159 LRRRRG 164 703 GKKDKH 708 159 LRRRRG 164 703 GKKDKH 708
NAG18	28 LKKKKK 33 28 LKKKKK 33
Proteína de dominio POU 5	222 ARKRKR 227 222 ARKRKR 227
PROTEÍNA NRCAM	2 PKKKRL 7 887 SKRNRR 892 1185 IRRNKG 1190 1273 GKKEKE 1278 2 PKKKRL 7 887 SKRNRR 892 1185 IRRNKG 1190 1273 GKKEKE 1278
Agrupación protocadherina gamma	11 TRRSRA 16 11 TRRSRA 16

ES 2 369 139 T3

Proteína SKD1	288 IRRRFEKR 295 251 ARRI KT 256 362 FKKVRG 367 251 ARRIKT 256 362 FKKVRG 367
PROTEÍNA ANTI-MUERTE	58 HRKRSRRV 65 59 RKRSRR 64 59 RKRSRR 64
Centrin-3	14 TKRKKRRE 21 14 TKRKKR 19 14 TKRKKR 19
Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 3	512 TRRKRH 517 512 TRRKRH 517
Proteína de caja homeótica profeta de PIT-1	12 PKKGRV 17 69 RRRHRT 74 119 NRRAKQ 124 12 PKKGRV 17 69 RRRHRT 74 119 NRRAKQ 124 77 YRRRESKR 84 389 MRKRRLRE 396
RECEPTOR EP3 DE PROSTAGLANDINA	82 SKRKKS 87 389 MRKRRL 394 82 SKRKKS 87 389 MRKRRL 394 58 LKKKQRRQ 65 59 KKKQRR 64 112 NRRAKW 117 118 RKRERS 123 59 KKKQRR 64 112 NRRAKW 117 118 RKRERS 123
Caja homeótica pituitaria 3	112 NRRAKW 117 118 RKRERS 123 59 KKKQRR 64 112 NRRAKW 117 118 RKRERS 123
HPRL-3	136 KRRGRI 141 136 KRRGRI 141
Advilina	812 MKKEKG 817 812 MKKEKG 817
Factor de interacción 1 con interactor LIM nuclear	32 GRRARP 37 109 LKKQRS 114 32 GRRARP 37 109 LKKQRS 114 5 GKKKSTKT 12 114 AKKRGSKG 121 70 NKKGRV 75 132 AKKAKS 137 154 ARKSJK 159 302 DKKLKS 307 70 NKKGRV 75 132 AKKAKS 137 154 ARKSJK 159 302 DKKLKS 307
Histona nuclear macro-H2A.1	132 AKKAKS 137 154 ARKSJK 159 302 DKKLKS 307 70 NKKGRV 75 132 AKKAKS 137 154 ARKSJK 159 302 DKKLKS 307
Proteína de tipo vilina	180 KRRRNQKL 187 179 EKRRRN 184 179 EKRRRN 184

ES 2 369 139 T3

BETA-FILAMINA	254 PKKARA 259 2002 ARRAKV 2007 254 PKKARA 259 2002 ARRAKV 2007
Proteína de motivo tripartito TRIM31-alfa	290 LKKFKD 295 290 LKKFKD 295
Correpresor 1 de receptor nuclear	106 SKRPRL 111 299 ARKQRE 304 330 RRKAKE 335 349 IRKQRE 354 412 QRRVKF 417 497 KRRGRN 502 580 RRKGRI 585 687 SRKPRE 692 2332 SRKSKS 2337 106 SKRPRL 111 299 ARKQRE 304 330 RRKAKE 335 349 IRKQRE 354 412 QRRVKF 417 497 KRRGRN 502 580 RRKGRI 585 687 SRKPRE 692 2332 SRKSKS 2337
PROTEÍNA DE DEDO-RING DE EXPRESIÓN CEREBRAL	432 KRRVKS 437 432 KRRVKS 437
PB39	231 TKKIKL 236 231 TKKIKL 236
Proteína acrosómica espermática	48 FRKRMEKE 55 24 RRKARE 29 135 KRKLKE 140 213 KKRLRQ 218 24 RRKARE 29 135 KRKLKE 140 213 KKRLRQ 218
PROTEÍNA DE TRÁFICO VESICULAR SEC22B	177 SKKYRQ 182 177 SKKYRQ 182
Factor 1 de transcripción nucleolar	79 VRKFRT 84 102 GKLLKK 107 125 EKRAKY 130 147 SKKYKE 152 156 KKKMKY 161 240 KKRLKW 245 451 KKKAKY 456 523 EKKEKL 528 558 SKKMKF 563 79 VRKFRT 84 102 GKLLKK 107 125 EKRAKY 130 147 SKKYKE 152 156 KKKMKY 161 240 KKRLKW 245 451 KKKAKY 456 523 EKKEKL 528 558 SKKMKF 563

## ES 2 369 139 T3

Plexina-B3	248 FRRRGARA 255
Junctofilina tipo 3	626 QKRRYSKG 633
Proteína quinasa de linaje mixto plausible	773 YRKKPHRP 780 312 ERRLKM 317 312 ERRLKM 317
Proteína 4 de unión a ácidos grasos, adipocito	78 DRKVKS 83 105 IKRKRE 110 78 DRKVKS 83 105 IKRKRE 110
Exóstosis (múltiple) 1	78 SKKGRK 83 78 SKKGRK 83
Proteína rica en cisteínas que contiene dominio DHHC	64 HRRPRG 69 64 HRRPRG 69
Proteína del protooncogén Myb	2 ARRPRH 7 292 EKRIKE 297 523 LKKIKQ 528 2 ARRPRH 7 292 EKRIKE 297 523 LKKI KQ 528
Ácido graso largo-CoA ligasa 2	259 RRKPKP 264 259 RRKPKP 264
Sintaxina 1B2	260 ARRKKI 265 260 ARRKKI 265
Dachshund 2	162 ARRKRQ 167 516 QKRLKK 521 522 EKTKR 527 162 ARRKRQ 167 516 QKRLKK 521 522 EKTKR 527
DEAD/DEXH helicasa DDX31	344 EKRKSEKA 351 760 TRKKRK 765 760 TRKKRK 765
Receptor de andrógeno	628 ARKLKK 633 628 ARKLKK 633
Receptor alfa del ácido retinoico	364 RKRRPSRP 371 163 NKKKKE 168 363 VRKRRP 368 163 NKKKKE 168 363 VRKRRP 368 340 WKKKYEKE 347 605 VKRCKQ 610 864 EKRLRA 869 605 VKRCKQ 610 864 EKRLRA 869
Cadena pesada de la quinesina	

ES 2 369 139 T3

DIUBIQUITINA	30 VKKIKE 35 30 VKKIKE 35
PROTEÍNA BING1	519 NKKFKM 524 564 ERRHRL 569 519 NKKFKM 524 564 ERRHRL 569
Quinasa 1 de adhesión focal	664 SRRPRF 669 664 SRRPRF 669
PROTEÍNA EBN2	20 TKRKKPRR 27 13 PKKDKL 18 20 TKRKKP 25 47 NKKNRE 52 64 LKKSRI 69 76 PKKPRE 81 493 SRKQRQ 498 566 VKRKRK 571 13 PKKDKL 18 20 TKRKKP 25 47 NKKNRE 52 64 LKKSRI 69 76 PKKPRE 81 493 SRKQRQ 498 566 VKRKRK 571
PROTEÍNA CO16	33 ARRLRR 38 115 PRRCKW 120 33 ARRLRR 38 115 PRRCKW 120
QUINURENINA 3-MONOOXIGENASA	178 MKKPRF 183 178 MKKPRF 183
Proteína MLN 51	4 RRRQRA 9 255 PRRIRK 260 407 ARRTRT 412 4 RRRQRA 9 255 PRRIRK 260 407 ARRTRT 412
Antígeno del MHC de clase II	99 QKRGRV 104
Antígeno del MHC de clase II	99 QKRGRV 104
Proteína 1 transformante ácida que contiene doble espiral	225 SRRSKL 230 455 PKKAKS 460 225 SRRSKL 230 455 PKKAKS 460
Proteína VGF neuroendocrina específica	479 EKRNRK 484 479 EKRNRK 484
Transportador de cationes orgánicos	230 GRRYRR 235 535 PRKNKE 540 230 GRRYRR 235 535 PRKNKE 540 215 KRRKHLKR 222
ADN polimerasa theta	214 WKRRKH 219 220 LKRSRD 225 1340 GRKLRL 1345

## ES 2 369 139 T3

	1689 SRKRKL 1694
	214 WKRRKH 219
	220 LKRSRD 225
	1340 GRKLRL 1345
	1689 SRKRKL 1694
	169 MRRRQRRE 176
	155 EKRTTL 160
	170 RRRQRR 175
Proteína relacionada con CDC45	483 NRRCKL 488
	155 EKRTTL 160
	170 RRRQRR 175
	483 NRRCKL 488
Proteína 2 de los canales intracelulares del cloro	197 AKKYRD 202
	197 AKKYRD 202
	85 KRKKPSRP 92
	83 SKKRKK 88
Proteína de unión a metilo-CpG	318 QKRQKC 323
	354 YRRRKR 359
	83 SKKRKK 88
	318 QKRQKC 323
	354 YRRRKR 359
Proteína quinasa C, tipo eta	155 RKRQRA 160
	155 RKRQRA 160
Ribonucleoproteína nuclear heterogénea H	71 LKKDRE 76
	169 LKKHKE 174
	71 LKKDRE 76
	169 LKKHKE 174
	11 SRRTRW 16
	155 ERRRKF 160
	185 LRRCRA 190
	530 SRRSRS 535
	537 GRRRKS 542
ORF2	742 ERRAKQ 747
	11 SRRTRW 16
	155 ERRRKF 160
	185 LRRCRA 190
	530 SRRSRS 535
	537 GRRRKS 542
	742 ERRAKQ 747
	9 LRRRRV 14
	9 LRRRRV 14
Proteína 24 específicamente de F-box	29 EKRGKG 34
	9 LRRRRV 14
	29 EKRGKG 34
Proteína neuronal rica en leucinas	51 NRRLKH 56
	51 NRRLKH 56
Proteína RER1	181 KRRYRG 186
	181 KRRYRG 186
	3 ARRQRD 8
	430 PKKPKT 435
	557 NRRSRN 562
Nefrocistina	641 EKRDKE 646
	3 ARRQRD 8
	430 PKKPKT 435
	557 NRRSRN 562
	641 EKRDKE 646

## ES 2 369 139 T3

Adenilato quinasa isoenzima 2, mitocondrial	60 GKLLKA 65 116 KRKEKL 121 60 GKLLKA 65 116 KRKEKL 121
Clordecona reductasa	245 AKKHKR 250 245 AKKHKR 250
Metaxina 2	166 KRKMKA 171 166 KRKMKA 171
Proteína 1 mesodérmica emparejada de la caja homeótica	89 KKKRKQRR 96 88 EKKKPK 93 94 QRRNRT 99 144 NRRAKF 149 88 EKKKPK 93 94 QRRNRT 99 144 NRRAKF 149 174 LKRKWIRC 181
Proteína de dedo-Ring	8 TRKIKL 13 95 MRKQRE 100 8TRKIKL13 5 MRKQRE 100 55 PRRTRP 60 377 GRRKRF 382 704 GKKRKN 709
Ataxina 7	834 GKKRKC 839 55 PRRTRP 60 377 GRRKRF 382 704 GKKRKN 709 834 GKKRKC 839
Proteína 1 específica de detención del crecimiento	169 ARRCRDRD 176
Proteína SKAP55	115 EKSKD 120 115 EKSKD 120
Serina palmitoiltransferasa 1	232 PRKARV 237 232 PRKARV 237
Serina palmitoiltransferasa 2	334 KKKYKA 339 450 RRRLKE 455 334 KKKYKA 339 450 RRRLKE 455
Sinaptopodina	405 KRRQRD 410 405 KRRQRD 410
Alfa-tectorina	1446 TRRCRC 1451 2080 IRRKRL 2085 1446 TRRCRC 1451 2080 IRRKRL 2085
FACTOR TRANSCRIPCIONAL DE FORMA LARGA C-MAF	291 QKRRTLKN 298
Proteína tipo IIa del síndrome de Usher	1285 MRRLRS 1290 1285 MRRLRS 1290

## ES 2 369 139 T3

Polipéptido p30 asociado a MSin3A	95 QKKVKI 100 124 NRRKRK 129 158 LRRYKR 163 95 QKKVKI 100 124 NRRKRK 129 158 LRRYKR 163
Región de cadena C de Ig-delta	142 KKKEKE 147 142 KKKEKE 147
COMPONENTE TRAP100 DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADO AL RECEPTOR DE LA HORMONA TIROIDEA	383 AKRKADRE 390 833 KKRHRE 838 833 KKRHRE 838
Catanina P60	369 LRRRLEKR 376 326 SRRVKA 331 326 SRRVKA 331
Factor transcripcional jun-D	286 RKRKLERI 293 273 RKRLRN 278 285 CRKRKL 290 273 RKRLRN 278 285 CRKRKL 290
Esterol/retinol deshidrogenasa	152 VRKARG 157 152 VRKARG 157
Glucógeno [almidón] sintasa, hígado	554 DRRFRS 559 578 SRRQRI 583 554 DRRFRS 559 578 SRRQRI 583 173 TKRRRK 178
Receptor gamma relacionado con estrógenos	353 VKKYKS 358 173 TKRRRK 178 353 VKKYKS 358
Proteína de cremallera de leucinas específica de la retina neural	162 QRRRTLKN 169
Fosfolipasa A2-gamma citosólica	514 NKKKILRE 521 31 LKKLRI 36 218 FKKGRL 223 428 CRRHKI 433 31 LKKLRI 36
Fosfolipasa A2-gamma citosólica	218 FKKGRL 223 428 CRRHKI 433
GLE1	415 AKKIKM 420 415 AKKI KM 420
Proteína EXT2.1 de tipo II de la exostosis múltiple	296 VRKRCHKH 303 659 RKKFKC 664 659 RKKFKC 664
Factor transcripcional ATF-7 dependiente del AMPc cíclico	86 EKKARS 91 332 GRRRRT 337 344 ERRQRF 349 86 EKKARS 91 332 GRRRRT 337 344 ERRQRF 349

## ES 2 369 139 T3

Proteína quinasa/endorribonucleasa	886 LRFKRT 891 886 LRFKRT 891
Factor transcripcional E2F6	23 RRRCRD 28 59 VKRPRF 64 98 VRKRRV 103 117 EKKSKN 122 23 RRRCRD 28 59 VKRPRF 64 98 VRKRRV 103 117 EKKSKN 122 1333 IRKKVRRRL 1340 160 KRRAKA 165 943 MKKVRR 948 1034 DKRKRS 1039 1334 RKKVRR 1339
Proteína de dominio muerte activadora de la MAP quinasa	1453 TKKCRE 1458 160 KRRAKA 165 943 MKKVRR 948 1034 DKRKRS 1039 1334 RKKVRR 1339 1453 TKKCRE 1458 126 KRKKSERT 133
Receptor nuclear huérfano PXR	87 TRKTRR 92 125 IKRKKS 130 87 TRKTRR 92 125 IKRKKS 130 149 RKRKAQEK 156 286 KKRKGGRN 293 145 ARRGRK 150 178 PKRGRP 183 285 EKRRKG 290 313 DRKRKQ 318 400 LKKIRR 405
FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DEL EPITELIO DEL CRISTALINO	337 VKKVEKKRE 345 145 ARRGRK 150 178 PKRGRP 183 285 EKRRKG 290 313 DRKRKQ 318 400 LKKIRR 405
Cofactor de proteína de la caja homeótica LIM	255 TKRRKRKN 262 255 TKRRKR 260 255 TKRRKR 260
RECEPTOR TRC8 TRANSMEMBRANAL MÚLTIPLE	229 WKRIRF 234 229 WKRIRF 234
Factor transcripcional SUPT3H	172 DKKKLRRRL 179 169 MRKDKK 174 213 NKRQKI 218 169 MRKDKK 174 213 NKRQKI 218 50 KRKHRN 55 104 EKRRKA 109 50 KRKHRN 55 104 EKRRKA 109 165 EKKKVSKA 172 124 IKRKKF 129 188 TKRVKK 193 381 DRRQKR 386 124 IKRKKF 129 188 TKRVKK 193 381 DRRQKR 386
GEMININA	
Factor p78 regulado por el ciclo celular	

ES 2 369 139 T3

Complejo del antígeno linfocitario 6, locus D	61 QRKGRK 66 85 ARRLRA 90 61 QRKGRK 66 85 ARRLRA 90
Delta 1-pirrolín-5-carboxilato sintetasa	455 LRRTRI 460 455 LRRTRI 460
PROTEÍNA CONECTOR BLNK DE CÉLULAS B	36 IKKLV 41 36 IKKLV 41
PROTEÍNA CONECTORA BLNK-S DE CÉLULAS B	36 IKKLV 41 36 IKKLV 41
Antígeno fetal de Alzheimer	5 ARRRKRR 12 16 PRRRRRT 23 93 WKKKTSRP 100 5 ARRRK 10 16 PRRRRR 21 26 PRRPRI 31 35 TRRMW 40 5 ARRRK 10 16 PRRRRR 21 26 PRRPRI 31 35 TRRMW 40 505 CKKKMRRK 512 506 KKKMRR 511 676 HRRSKQ 681 506 KKKMRR 511 676 HRRSKQ 681
Variante zeta de procesamiento del canal 4 receptor de potencial transitorio	505 CKKKMRRK 512 506 KKKMRR 511 676 HRRSKQ 681 506 KKKMRR 511 676 HRRSKQ 681
Regulador MR-2 de la miofibrillogénesis	65 RKRGN 70 65 RKRGN 70
Proteína de anclaje 2c fosfatasa que contiene dominio SH2	269 IKKRSLRS 276
Superfamilia de las inmunoglobulinas, miembro 3	394 SKRPKN 399 394 SKRPKN 399
Homólogo 3 de meis (ratón)	112 PRRSRR 117 120 WRRTRG 125 112 PRRSRR 117 120 WRRTRG 125 105 GKLLKL 110 114 IRKQKL 119 105 GKLLKL 110 114 IRKQKL 119
Delecionado en azoospermia 2	114 IRKQKL 119 105 GKLLKL 110 114 IRKQKL 119
Centaurina gamma3	543 NRKKHRRK 550 544 RKKHRR 549 544 RKKHRR 549
Factor transcripcional 1 de la leucemia de células pre-B	233 ARRKRR 238 286 NKRIRY 291 233 ARRKRR 238 286 NKRIRY 291 112 DKKKRM 117 158 KRKEKA 163 167 YRKKKQ 172 112 DKKKRM 117 158 KRKEKA 163
Proteína LENG1	167 YRKKKQ 172 112 DKKKRM 117 158 KRKEKA 163

# ES 2 369 139 T3

	167 YRKKKQ 172
Proteína 3 que contiene dominios WD40 y FYVE	388 IKRLKI 393 388 IKRLKI 393
Proteína LENG1	34 RKRRLRS 41 84 SRKKTRRM 91 1 MRRSRA 6 33 ERKRRG 38 85 RKKTRR 90 1 MRRSRA 6 33 ERKRRG 38 85 RKKTRR 90
MRIP2	375 NKKKHLKK 382
Receptor acoplado a proteína G	430 EKKKLRH 437 290 WKKKRA 295 395 RKKAKF 400 431 KKKLKR 436 290 WKKKRA 295 395 RKKAKF 400 431 KKKLKR 436 143 LKKFRQ 148 228 LRKIRT 233 143 LKKFRQ 148 228 LRKIRT 233 232 QKRRRHRA 239 232 QKRRRH 237 232 QKRRRH 237
Canal iónico espermático	402 QKRKTGRL 409
Proteína de anclaje de la quinasa A	2232 KRKKLVRD 2239 2601 EKRRRERE 2608 2788 EKKKKNKT 2795 370 RKKNKG 375 1763 SKKSKE 1768 2200 EKKVRL 2205 2231 LKRKKL 2236 2601 EKRRRE 2606 2785 EKKEKK 2790 1992 QKKDWKRQ 2000 370 RKKNKG 375 1763 SKKSKE 1768 2200 EKKVRL 2205 2231 LKRKKL 2236 2601 EKRRRE 2606 2785 EKKEKK 2790
Proteína LSP1 específica de linfocitos	315 GKRYKF 320 315 GKRYKF 320
Similar a la molécula de activación linfocítica de señalización (H. sapiens)	261 RRRGKT 266 261 RRRGKT 266

## ES 2 369 139 T3

Dermatán-4-sulfotransferasa-1	242 VRRYRA 247 242 VRRYRA 247
Moesina	291 MRRRKP 296 325 EKKKRE 330 291 MRRRKP 296 325 EKKKRE 330 288 KKKVKN 293
Serina/treonina-proteína quinasa del protooncogén A-Raf	358 LRKTRH 363 288 KKKVKN 293 358 LRKTRH 363 117 GKRWKE 122 117 GKRWKE 122
Citocromo P450 2C18	117 GKRWKE 122 156 LRKTKA 161 117 GKRWKE 122 156 LRKTKA 161 594 IRRRAVRS 601 263 FKRKKF 268 388 IRKPRH 393
Proteína tirosina fosfatasa, no receptora tipo 3	874 VRKMRD 879 263 FKRKKF 268 388 IRKPRH 393 874 VRKMRD 879
Similar a calicreína 7 (quimotriptica, estrato córneo)	15 VKKVRL 20 15 VKKVRL 20
Lipasa sensible a hormonas	703 ARRLRN 708 703 ARRLRN 708
Proteína ribosómica 40S S30	25 KKKKTGRA 32 23 EKKKKK 28 23 EKKKKK 28
Proteína 91 de dedo de cinc	617 LRRHKR 622 617 LRRHKR 622
Proteína NNP-1	320 NRKRLYKV 327 387 ERKRSRRR 394 432 QRRRTPRP 439 454 EKKKKRRE 461 29 VRKLRK 34 355 GRRQKK 360 361 TTKQKR 366 388 RKRSRR 393 454 EKKKKR 459 29 VRKLRK 34 355 GRRQKK 360 361 TTKQKR 366 388 RKRSRR 393 454 EKKKKR 459
Metionil-ARNt sintetasa	725 WKRI KG 730 725 WKRIKG 730
ELMO2	560 NRRRQERF 567

## ES 2 369 139 T3

Antígeno 6/11 de expresión en meningioma	432 RKRAKD 437 432 RKRAKD 437
Inositol polifosfato 4-fosfatasa tipo 1-beta	375 LRKKLHKF 382 829 ARKNKN 834 829 ARKNKN 834 815 SKKRKN 820 815 SKKRKN 820 40 SRRYRG 45 338 HRKNKP 343 40 SRRYRG 45 338 HRKNKP 343 138 SRRFRKI 145 1071 QRKKRWRS 1078 1099 HKKRARRS 1106 139 RRRFRK 144 661 SKKVKA 666 930 LKRMKI 935
C7ORF12	1071 QRKKRW 1076 1100 KKRARR 1105 1121 ARKVQ 1126 139 RRRFRK 144 661 SKKVKA 666 930 LKRMKI 935 1071 QRKKRW 1076 1100 KKRARR 1105 1121 ARKVQ 1126
Factor de intercambio de nucleótido guanina de Rap	1071 QRKKRW 1076 1100 KKRARR 1105 1121 ARKVQ 1126 139 RRRFRK 144 661 SKKVKA 666 930 LKRMKI 935 1071 QRKKRW 1076 1100 KKRARR 1105 1121 ARKVQ 1126
Adaptina sigma 1C	27 ERKKITRE 34
Alsina	883 GRKRKE 888 883 GRKRKE 888
NOPAR2	14 LKRPRL 19 720 VKREKP 725 14 LKRPRL 19 720 VKREKP 725 294 SKRPKT 299 961 EKKNKL 966 1231 NKRPR 1236 1727 DKRLRT 1732 2032 QKRFRT 2037 2087 EKSKL 2092 2317 QRKDKD 2322 2343 PKKEKG 2348
Factor transcripcional 1 de unión a AT	294 SKRPKT 299 961 EKKNKL 966 1231 NKRPR 1236 1727 DKRLRT 1732 2032 QKRFRT 2037 2087 EKSKL 2092 2317 QRKDKD 2322 2343 PKKEKG 2348
Supresina	232 YKRRKK 237 232 YKRRKK 237
Proteína 1 de la línea media	100 TRRERA 105 494 HRKLV 499 100 TRRERA 105 494 HRKLV 499

Proteína 2a del grupo de alta movilidad

6 PKKPKG 11  
84 GKKKKD 89  
6 PKKPKG 11  
84 GKKKKD 89

## REIVINDICACIONES

1. Método para modificar una región de unión a GAG (glucosaminoglicano) que es una hélice  $\alpha$  C-terminal de una quimoquina, caracterizado porque comprende las etapas de introducir por lo menos un aminoácido básico en dicha hélice  $\alpha$  C-terminal y/o delecionar por lo menos un aminoácido voluminoso y/o ácido en dicha hélice  $\alpha$  C-terminal, de manera que dicha quimoquina presenta una afinidad de unión a GAG de  $K_d \leq 10$  mM, preferentemente  $\leq 1$  mM, todavía más preferentemente  $\leq 0,1$  mM, y en el que la afinidad de unión a GAG de dicha quimoquina se encuentra incrementada en comparación con la afinidad de unión a GAG de la quimoquina de tipo salvaje respectiva.
2. Quimoquina modificada, **caracterizada porque** una región de unión a GAG que es una hélice  $\alpha$  C-terminal en dicha quimoquina se modifica mediante sustitución, la inserción de por lo menos un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de Arg, Lys e His, y/o la delección de por lo menos un aminoácido con el fin de incrementar la cantidad relativa de aminoácidos básicos en dicha hélice  $\alpha$  C-terminal, y/o reducir la cantidad de aminoácidos voluminosos y/o ácidos en dicha hélice  $\alpha$  C-terminal, de manera que se incrementa la afinidad de unión a GAG de dicha quimoquina en comparación con la afinidad de unión a GAG de la quimoquina de tipo salvaje respectiva.
3. Quimoquina modificada según la reivindicación 2, caracterizada porque la quimoquina es IL-8, RANTES o MCP-1.
4. Quimoquina modificada según la reivindicación 2, caracterizada porque la quimoquina es SDF-1 $\alpha$ , MGSA/GRO $\alpha$ , MIP2 $\alpha$ / GRO $\beta$ , NAP-2, PF-4, MCP-2, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MPIF-1 ó MIP-5/HCC-1.
5. Quimoquina modificada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada porque la afinidad de unión a GAG incrementada es una afinidad de unión incrementada a heparán sulfato y/o a heparina.
6. Quimoquina modificada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizada porque una región biológicamente activa adicional se modifica, inhibiendo o regulando negativamente de esta manera una actividad biológica adicional de dicha proteína.
7. Quimoquina modificada según la reivindicación 6, caracterizada porque dicha región biológicamente activa adicional se modifica mediante delección, inserción y/o sustitución preferentemente con alanina, un residuo estérica y/o electrostáticamente similar.
8. Quimoquina modificada según la reivindicación 6 ó 7, caracterizada porque dicha actividad biológica adicional es la activación de los leucocitos.
9. Molécula aislada de ácido polinucleico, caracterizada porque codifica una quimoquina según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.
10. Vector, caracterizado porque comprende una molécula aislada de ADN según la reivindicación 9.
11. Célula recombinante que comprende un ácido polinucleico según la reivindicación 9, en la que la célula recombinante no es de origen humano.
12. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende una quimoquina según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, un ácido polinucleico según la reivindicación 9 ó un vector según la reivindicación 10, y un portador farmacéuticamente aceptable.
13. Quimoquina según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, un ácido polinucleico según la reivindicación 9 ó un vector según la reivindicación 10, destinada al tratamiento de una condición inflamatoria, en la que la quimoquina se selecciona de entre el grupo que consiste de IL-8, MGSA/GRO $\alpha$ , MIP2 $\alpha$ , GRO $\beta$ , NAP-2, PF-4, SDF-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MPIF-1 y MIP-5.
14. Quimoquina según la reivindicación 13, caracterizada porque la condición inflamatoria se selecciona de entre un grupo que comprende artritis reumatoide, soriasis, osteoartritis, asma, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple.

---

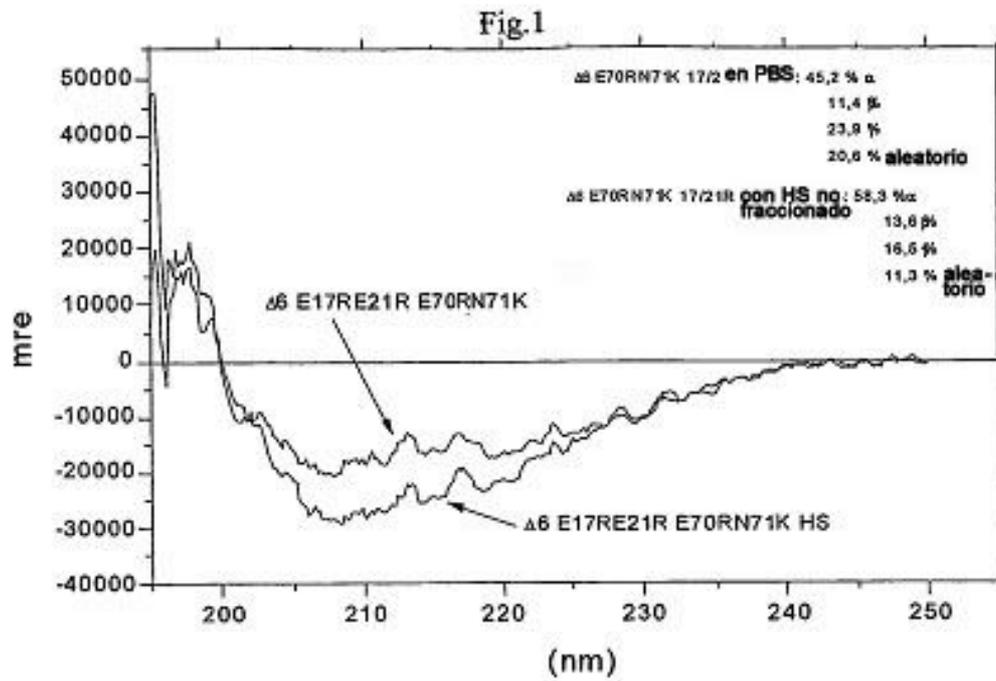


Fig.2

estructura sec.	IL-8 $\Delta 6$ E70R	IL-8 $\Delta 6$ E70R HS	IL-8 $\Delta 6$ F17RF21R E70K	IL-8 $\Delta 6$ F17RF21R E70K HS
<b>hélice <math>\alpha</math></b> [%]	24,9	37	17,4	28,7
<b>hoja <math>\beta</math></b> [%]	23,6	23	29,8	22
<b>giros</b> [%]	20,9	27,3	25,9	29,7
<b>otras</b> [%]	40,7	12,7	26,9	19,6

Fig.3

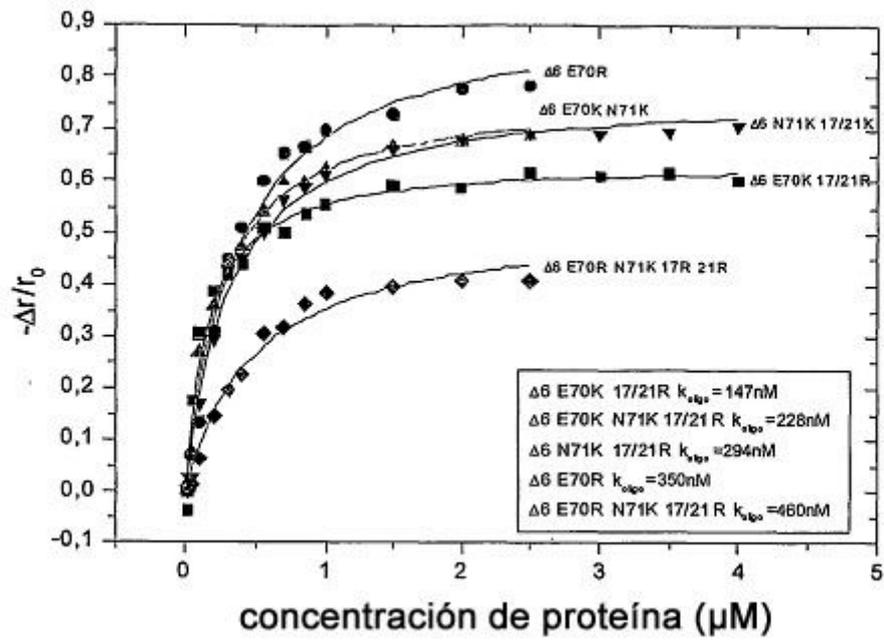


Fig.4

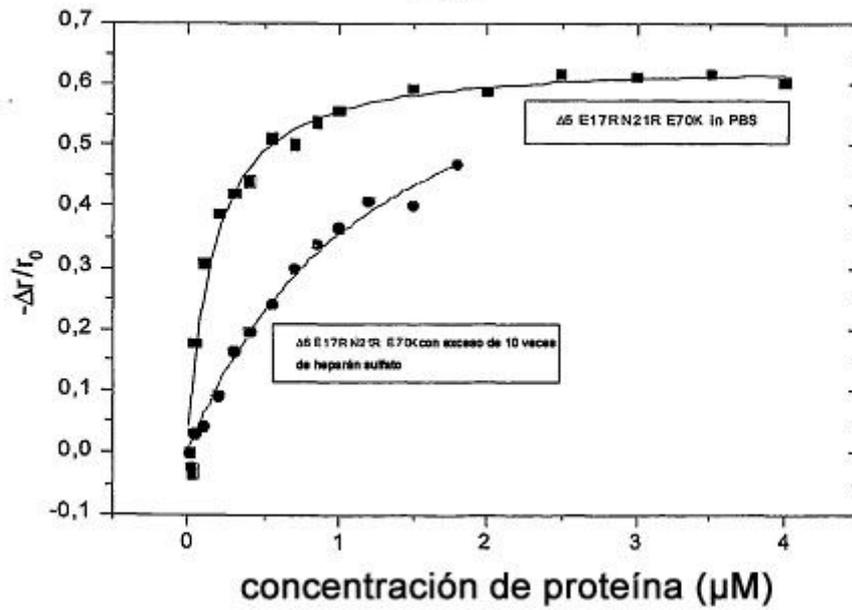


Fig.5

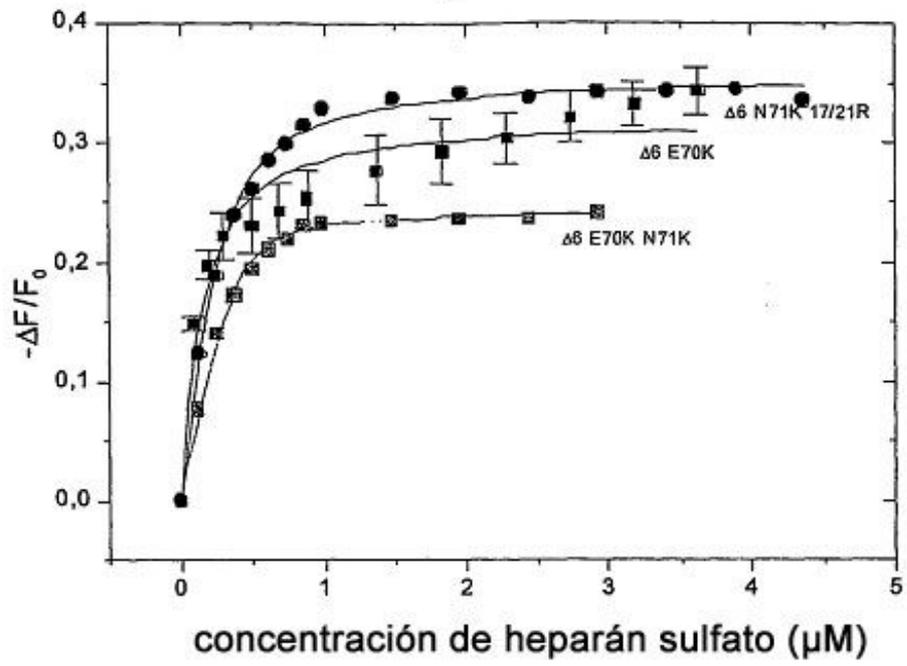


Fig.6

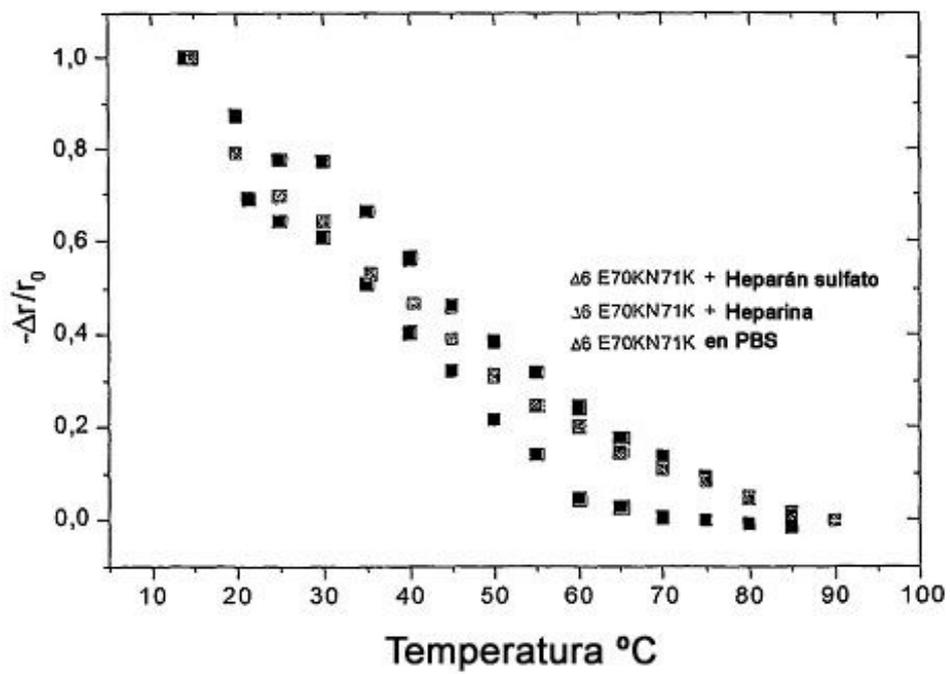


Fig. 7

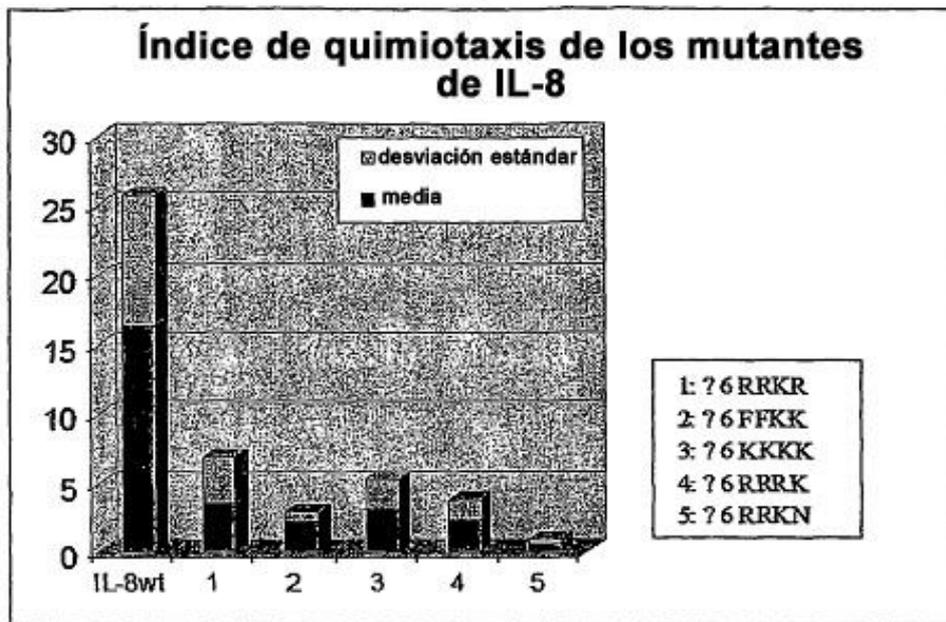


Fig.8

