

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 354**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02774915 .9**  
96 Fecha de presentación: **09.09.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1435993**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **UTILIZACIÓN DE UNA PROTEINA DE LA FAMILIA DE LAS CRMPs PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES LIGADAS AL SISTEMA INMUNITARIO.**

30 Prioridad:  
**07.09.2001 FR 0111627**  
**16.10.2001 FR 0113342**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.11.2011**

73 Titular/es:  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
101, RUE DE TOLBIAC  
75013 PARIS, FR**

72 Inventor/es:  
**GIRAUDON, Pascale;**  
**BELIN, Marie-Françoise;**  
**MALCUS, Christophe;**  
**COLAS, Pierre;**  
**ANTOINE, Jean-Christophe y**  
**HONNORAT, Jérôme**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 369 354 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**

- [0001]** La presente solicitud se refiere a una nueva utilización de proteínas llamadas "CRMPs" (Collapsin Response Mediator Proteins) para el diagnóstico y la terapia de patologías ligadas a un disfuncionamiento del sistema inmunitario.
- 5 **[0002]** Las CRMPs, también conocidas bajo las denominaciones TOAD-64 (Minturn y otros, 1995, J Neurosci 15:6757-6766), DRP (Dihydropyrimidinase related protein, Hamajima y otros, 1996, Gene 180:157-163), C-22 (Quach y otros, 1997, Mol Brain Res 46:329-332) o ULIP (Unc-33-Like protein, Byk y otros, 1998, Eur J Blochem 254:14-24 y solicitud internacional WO 98/37 192), son moléculas de señalización intracelular a día de hoy reconocidas como específicas del sistema nervioso. Estas proteínas se han descrito en especial como estando implicadas en el control del desarrollo neuronal y el crecimiento axonal.
- 10 **[0003]** A día de hoy, se han identificado cinco proteínas de esta familia, CRMP1, CRMP2, CRMP3, CRMP4 y CRMP5.
- [0004]** Determinados miembros de la familia se han asociados a desórdenes neurodegenerativos humanos. En la enfermedad de alzhéimer, se observan niveles elevados de CRMP2 fosforilados en asociación con placas de neurofibrillas (Yoshida y otros, 1998, J Biol Chem 273:9761-9768).
- 15 **[0005]** En los síndromes neurológicos paraneoplásicos (SNP), que son desórdenes neurodegenerativos, unos pacientes desarrollan auto-anticuerpos (anticuerpos anti-CV2) que reconocen a las proteínas CRMP (Honorat y otros, 1999, Eur J Neurosci 11:4226-4232).
- [0006]** A continuación, se ha propuesto utilizar estas proteínas en el diagnóstico y la terapia de los cánceres y de los SNP (FR 2 805 540 y WO 98137192).
- 20 **[0007]** Yu y otros, 2001 (Annals of Neurology, 49(2):146-154) informan por otro lado de la presencia de auto-anticuerpos neuronales anti-CRMP5 en casos de cáncer de pulmón y de timoma.
- [0008]** De manera inesperada, los inventores han puesto en evidencia la presencia de las CRMP en los linfocitos T. Más especialmente, han mostrado CRMPs 1, 2 y 4 a concentraciones elevadas en los linfocitos T en pacientes con patologías disímunes. En este caso, ocurre que la presencia de estas proteínas aumenta cuando está asociada a una anomalía de muerte o de proliferación de los linfocitos.
- 25 **[0009]** Por otro lado, los inventores también han observado una translocación nuclear muy aumentada de la CRMP2 de los linfocitos infectados por HTLV-1 y los hace probablemente hiperproliferativos, o de linfocitos T de pacientes que presentan una deficiencia inmune ligada al sistema ligante Fas-Fas. Esta translocación correspondería a una forma muy fosforilada de CRMP2, más especialmente reconocida por su anticuerpo específico.
- 30 **[0010]** Finalmente, como se verá a partir de los ejemplos siguientes, la presencia de estas proteínas también se ha caracterizado en células epiteliales tímicas desde el estadio embrionario. Este descubrimiento de CRMPs en las células epiteliales inmaduras es uno de los escasos ejemplos de proteína de señalización intracelular en el timo.
- [0011]** Por otro lado, la desaparición de los CRMPs en el timo adulto y su inducción en las células T tras estimulación del TCR indica una relación con la "recolocación" del receptor de las células T, TCR, y la educación de los timocitos.
- 35 **[0012]** Consecuentemente, el conjunto de estos nuevos datos testimonia acerca de la intervención de las proteínas CRMPs en una vía de señalización que conduce a la proliferación, la muerte, la maduración y la educación de los linfocitos y por lo tanto de su implicación en la regulación de la respuesta inmunitaria.
- [0013]** Estas observaciones son tanto más inesperadas debido a que, hasta el día de hoy, las CRMPs solamente se consideraban sobre todo desde un punto de vista terapéutico como blancos potenciales para tratar patologías del sistema nervioso central (SNC).
- 40 **[0014]** Está claro que este descubrimiento abre nuevas perspectivas terapéuticas. A partir de ahora es concebible actuar sobre la proliferación o la muerte de células T y/o actuar sobre las células del timo y la auto-inmunidad mediante una intervención al nivel de las proteínas CRMPs en los linfocitos.
- 45 **[0015]** En este caso, la presente solicitud propone utilizar las CRMPs como dianas para el tratamiento, el pronóstico y/o el diagnóstico de patologías ligadas a un disfuncionamiento del sistema inmunitario y en especial de la proliferación de las células T.
- [0016]** Se trata en particular de modular la expresión o la actividad de una o varias CRMPs, de tal manera que pueda modular la apoptosis, la proliferación o la migración de las células.
- 50 **[0017]** Así, una alteración de las CRMPs, como por ejemplo una modificación de la fosforilación de CRMP2, es susceptible de conducir a una hiperproliferación o a una muerte celular.

**[0018]** Asimismo, una estimulación de las CRMPs parece constituir un medio eficaz para restaurar una señalización deficiente y mejorar la supervivencia linfocitaria como en el caso de la infección por el VIH.

**[0019]** Finalmente, un control de la hiper-expresión de las CRMPs parece determinante para reducir la proliferación de linfocitos que se han vuelto "hiper" proliferativos como en el caso de una infección por HTLV-1 o una mutación de Fas. Esta inhibición podría también mejorar los procesos autoinmunes que implican linfocitos T que reconocen determinantes de uno mismo (auto reactivos), y los ataques del SNC ligados a la invasión del SNC por estos linfocitos T (TSP/HAM ligada a HTLV-1, encefalitis ligada a la rubéola, esclerosis en placas).

**[0020]** En determinados casos, se busca por lo tanto preferentemente aumentar o estimular la expresión o la actividad de las CRMPs (por ejemplo en el caso de una infección de los linfocitos por el virus VIH del SIDA). En otros casos, en cambio, se busca reprimir o inhibir la expresión o la actividad de las CRMP, por ejemplo para reducir la proliferación o la migración de los linfocitos, por ejemplo en el caso de un linfoma.

**[0021]** Bloquear la actividad CRMP también puede ser ventajoso para bloquear el efecto de la proteína príon PrP patológica.

**[0022]** La solicitud describe ante todo la utilización de al menos una proteína de la familia de las CRMPs, fragmento polipeptídico o derivado biológicamente activo de esta, o de una secuencia o fragmento de secuencia nucleotídica que codifica a dicha proteína para la fabricación de un medicamento destinado a tratar patologías ligadas a un disfuncionamiento del sistema inmunitario.

**[0023]** La solicitud describe a continuación la utilización de una secuencia anti-sentido capaz de hibridarse específicamente con una secuencia nucleotídica que codifica a dicha proteína o a un anticuerpo dirigido contra dicha proteína para la fabricación de un medicamento destinado a tratar patologías ligadas a un disfuncionamiento del sistema inmunitario.

**[0024]** La solicitud describe también la utilización de una secuencia peptídica capaz de actuar con dicha proteína, o compuestos farmacéuticos capaces de controlar la expresión de dicha proteína, y/o de sus parejas y/o de sus interacciones, para la fabricación de un medicamento destinado a tratar patologías ligadas a un disfuncionamiento del sistema inmunitario.

**[0025]** La solicitud describe por otro lado un método de prevención y/o tratamiento de una patología ligada a un disfuncionamiento del sistema inmunitario, comprendiendo esta método la administración a un paciente que necesita un tal tratamiento en una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente modulador de la expresión o de la actividad de una CRMP, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0026]** Estos modos de realización se detallan a continuación.

**[0027]** Más concretamente, la presente invención se refiere a un ácido nucleico antisentido capaz de hibridarse con un ácido nucleico que codifica a una proteína CRMP, o anticuerpo anti-CRMP, para su utilización en el tratamiento de una patología que implica un disfuncionamiento de los linfocitos T, seleccionándose dicha patología de entre:

- las enfermedades de priones;

- las enfermedades neuroinflamatorias desmielinizantes; y

- la esclerosis en placas.

**[0028]** La presente invención también tiene por objeto un método de cribado *in vitro* de moléculas útiles para el tratamiento de enfermedades de priones, en el cual se ponen en contacto una molécula a verificar con una proteína príon PrP y una proteína CRMP, y se evalúa la capacidad de la molécula para inhibir la interacción de la CRMP, o de un dímero de CRMP, con la proteína PrP, siendo una acción inhibidora de esta interacción indicativa de una molécula útil para el tratamiento de enfermedades de priones.

**[0029]** La presente invención también se refiere a un método *in vitro* de pronóstico y/o de diagnóstico de una patología ligada a un disfuncionamiento del sistema inmunitario, comprendiendo el método la puesta en evidencia en células del sistema inmunitario extraídas de un paciente, de una expresión o localización anormal de una proteína CRMP con respecto a células de control, en la cual dichas células del sistema inmunitario son unos linfocitos, seleccionándose dicha patología de entre:

a. Las enfermedades de priones;

b. La esclerosis en placas;

c. y las enfermedades neuroinflamatorias desmielinizantes.

50

*Patologías objetivo:*

**[0030]** Tal como se describe en la presente solicitud, las patologías objetivo desde un punto de vista terapéutico o diagnóstico, están ligadas a un disfuncionamiento del sistema inmunitario, y en especial a un disfuncionamiento de la proliferación de las células del sistema inmunitario, en particular células T.

5 **[0031]** Más concretamente, estas patologías comprenden:

- las leucemias T (en particular la del adulto) y los linfomas (es decir la proliferación maligna de las células T) ;

10 - las infecciones virales, tales como una infección por el virus del herpes, de la rubéola, el virus de epstein-Barr, HTLV- 1 (se habla entonces de alcances neuro-inflamatorios asociados a la infección por el retrovirus HTLV1, paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada a HTLV-1 - TSP/HAM), o una infección por el virus VIH (virus del SIDA también llamado neurosida). Más generalmente, es un objetivo cualquier infección vírica que pueda resultar en una invasión del SNC por los linfocitos T (encefalitis ligada a la rubéola, etc).

- las enfermedades de priones.

**[0032]** Por otro lado también concierne a las enfermedades disinmunes ligadas a la mutación de Fas y FasL ; y a los alcances neuro-inflamatorios asociados a una activación de los linfocitos.

15 **[0033]** Es también concebible tratar enfermedades auto-inmunes (y en especial las ligadas a Fas), actuando mediante las proteínas CRMPs y sus diferentes parejas biológicas, en la maduración de los linfocitos T al nivel del timo.

20 **[0034]** A título representativo de estas patologías auto-inmunes, se puede también especialmente citar la artritis reumatoide, la miastenia, el lupus eritematoso, el asma, la esclerosis en placas, o cualquier desorden inmune que implique un reconocimiento inmune y el blanco de las propias células o de los tejidos y resultante en una o varias respuestas inflamatorias. La esclerosis en placas es la más frecuente de las enfermedades auto-inmunes.

**[0035]** Más generalmente, la invención se refiere a la terapia o al diagnóstico de las enfermedades neuroinflamatorias desmielinizantes.

25 **[0036]** Según un modo preferido de la invención, el paciente es un humano, preferentemente un adulto, aunque el método de tratamiento de la invención también puede aplicarse a mamíferos u otros vertebrados.

*Modulación de las CRMPs:*

**[0037]** De acuerdo con la presente invención, se busca modular la actividad o la expresión de las CRMPs. Esta modulación puede ser directa o indirecta.

30 **[0038]** Una modulación directa de la actividad proteica CRMP es una modulación que se realiza por acción directa sobre la actividad y/o la expresión de la propia proteína. Unos agentes capaces de modular directamente la actividad proteica CRMP son o bien agonistas o bien antagonistas y pueden también ser llamados « activadores directos » o « inhibidores directos » respectivamente.

**[0039]** Por lo tanto, por « agonista », se entiende un agente que aumenta la actividad mientras que un antagonista significa un agente que inhibe la actividad de la proteína.

35 **[0040]** Preferentemente, estos agonistas o antagonistas son capaces de modular la interacción de la proteína CRMP con moléculas endógenas que actúan habitualmente directamente aguas arriba o aguas abajo de la proteína CRMP en una cascada de señalización. Puede tratarse por ejemplo de una interacción CRMP-semaforina, CRMP plexina, CRMP-quinasa o también CRMP-proteína del citoesqueleto.

**[0041]** Estos agentes son por ejemplo anticuerpos dirigidos contra la proteína CRMP o aptámeros.

40 **[0042]** Una alteración de la interacción entre dos proteínas CRMPs homólogas o heterólogas es otro ejemplo de modulación de la actividad CRMP. Una interacción entre proteínas « homólogas » significa una interacción entre al menos dos mismos tipos de proteínas CRMP tales como por ejemplo homodímeros CRMP2-CRMP2.

**[0043]** La interacción entre proteínas CRMPs « heterólogas » significa una interacción entre al menos dos proteínas CRMPs diferentes, por ejemplo heterodímeros CRMP2-CRMP5.

45 **[0044]** Entre los agentes capaces de modular directamente la expresión de una CRMP, se pueden citar agentes que alteran (es decir aumentan o disminuyen) el nivel de producción de la proteína CRMP. Estos agentes pueden ser por ejemplo un polipéptido CRMP o una secuencia de ácido nucleico que codifica a esta proteína, o agentes capaces de modular la transfección y/o la traducción de los genes CRMP tales como secuencias de ácido nucleico antisentido o ARN doble hebra inhibidora.

- 5 [0045] Una modulación indirecta de la actividad proteica CRMP es una modulación que se realiza por acción sobre la actividad y la expresión de agentes endógenos extracelular o intracelular que actúan habitualmente aguas arriba (inductor) o aguas abajo (efector) de la proteína CRMP como cascada de señalización. Un inductor de una proteína CRMP es por ejemplo una semaforina, en particular la semaforina 3A (Sema 3A) o la semaforina 4D (Sema 4D). Los ejemplos de efectores incluyen tirosinas quinasas, GTPasa de la familia Rho o Rac, transferasas (transglutaminasa).
- 10 [0046] Son también interesantes otras proteínas capaces de interactuar con proteínas CRMPs, que pueden ser identificadas en muestras patológicas, tales como líquido cefalorraquídeo o biopsias de cerebro, en un paciente (humano o animal) afectado por un desorden inmunológico. Unos agentes que permiten obtener una modulación indirecta de actividad o de la expresión de una CRMP pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo a la luz de los tipos de modulador directo descritos más arriba.
- 15 [0047] Tal como se divulga en la presente solicitud, y excepto que se describa de otro modo, los términos « agente » o « compuesto de prueba » pueden referirse a una o varias moléculas estructuralmente definidas tales como polipéptidos, oligonucleótidos, molécula mineral u orgánica, de naturaleza endógena o exógena. Estos agentes pueden también ser compuestos indefinidos tales como extractos celulares, tisulares, o líquidos biológicos de origen animal o vegetal.
- [0048] La utilización de proteínas CRMPs o de ácido nucleico que codifican para una CRMP es interesante cuando se busca aumentar la cantidad en al menos una de las CRMPs. Se puede también concebir utilizar un compuesto o una mezcla de compuestos de origen sintético o natural que activa o inhibe la expresión o la acción de estas CRMPs.
- 20 [0049] A título ilustrativo de este tipo de compuestos, se pueden más especialmente citar las moléculas susceptibles de entenderse como un pareja biológica de las CRMPs, utilizando por ejemplo las CRMPs como molécula de señalización intracelular.
- Proteínas CRMP:*
- 25 [0050] Las proteínas CRMPs más especialmente consideradas según la invención son las proteínas CRMP1, CRMP2, CRMP3, CRMP4 y CRMP5.
- [0051] La presente invención se refiere a de manera preferente a la utilización de al menos una proteína CRMP escogida entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas humanas CRMP1, CRMP2, CRMP3, CRMP4 y CRMP5 que se representan en la figura 8.
- [0052] Según la presente invención:
- 30 - La proteína CRMP1 se refiere en especial a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la figura 8 así como todos los fragmentos polipeptídicos o derivados correspondientes.
- La proteína CRMP2 se refiere en especial a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la figura 8 así como todos los fragmentos polipéptidos o derivados correspondientes.
- 35 - La proteína CRMP3 se refiere en especial a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la figura 8 así como todos los fragmentos polipéptidos o derivados correspondientes.
- La proteína CRMP4 se refiere en especial a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la figura 8 así como todos los fragmentos polipéptidos o derivados correspondientes.
- La proteína CRMP5 se refiere en especial a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la figura 8 así como todos los fragmentos polipéptidos o derivados correspondientes.
- 40 [0053] Los polipéptidos derivados hacen referencia a cualquier variante polipeptídica de las proteínas de más arriba o cualquier otro molécula resultante de una modificación genética y/o de naturaleza química de una de las secuencias descritas anteriormente, es decir obtenida por mutación, supresión, adición, sustitución y/o cualquier modificación química de un único o de un número limitado de aminoácidos, así como cualquier secuencia isoforme, habiendo dicha secuencia derivada, modificada o isomorfa conservado al menos una de las propiedades que la
- 45 hacen biológicamente activa.
- [0054] De este modo se incluyen las secuencias homólogas, definidas como
- i) las secuencias similares a al menos 70%, preferentemente 80 %, aún más preferentemente 90 % de las secuencias humanas de CRMP (tales como las representadas en la figura 8) ;
- 50 ii) las secuencias codificadas por una secuencia de ácido nucleico homóloga es decir una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia que codifica a las CRMPs humanas o su secuencia complementaria, en condiciones astringentes de hibridación.

- [0055]** El término "similares" se refiere al parecido perfecto o identidad entre los aminoácidos comparados y también al parecido no perfecto que se califica de similitud. Esta búsqueda de similitudes en una secuencia polipeptídica tiene en cuenta las sustituciones conservativas que son unas sustituciones de aminoácidos de la misma clase, tales como sustituciones de aminoácidos en las cadenas laterales no cargadas (tales como la asparagina, la glutamina, la serina, la treonina, y la tirosina), de aminoácidos en las cadenas laterales básicas (tales como la lisina, la arginina, y la histidina), de aminoácidos en las cadenas laterales ácidas (tales como el ácido aspártico y el ácido glutámico) ; de aminoácidos en las cadenas laterales apolares (tales como la glicina, la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, la metionina, el triptofano, y la cisteína).
- [0056]** Más generalmente, por « secuencia de aminoácidos homóloga », se entiende por lo tanto cualquier secuencia de aminoácidos que difiera de la secuencia humana de la figura 8, por sustitución, supresión y/o inserción de un aminoácido o de un número reducido de aminoácidos , en especial por sustitución de aminoácidos naturales por aminoácidos no naturales o pseudoaminoácidos en posiciones tales que estas modificaciones no tengan significativamente alcance en la actividad biológica de la CRMP.
- [0057]** La homología se determina generalmente utilizando un programa de análisis de secuencia (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Se alinean unas secuencias de aminoácidos similares para obtener el grado máximo de homología (es decir identidad o similitud, tal como se ha definido más arriba). Con esta finalidad, puede ser necesario introducir de manera artificial espacios (« gaps ») en la secuencia. Una vez realizada la alineación óptima, se establece el grado de homología por grabación de todas las posiciones para las cuales los aminoácidos de las dos secuencias comparadas son idénticos, con respecto al número total de posiciones.
- [0058]** La « actividad biológica » de las proteínas CRMPs incluye cualquier propiedad biológica de estas proteínas. Por ejemplo, la actividad puede determinarse evaluando la inhibición de crecimiento axonal en respuesta a las semaforinas, en particular la Sema 3A o la Sema4D y/o evaluando la inhibición del crecimiento de las oligodendrocitas, y/o incluso la migración de las células del sistema inmunitario en respuesta a las semaforinas. También se incluyen las propiedades inmunológicas de las CRMPs, en particular la capacidad de provocar la producción de anticuerpos, del tipo de los anticuerpos anti-CV2 en las SNP. También se incluye una actividad enzimática CRMP directa o indirecta, o como sustrato de otra enzima.
- [0059]** También están implicadas las diferentes formas de proteínas consideradas susceptibles de ser reconocidas por sus anticuerpos respectivos. Puede tratarse de sus formas diméricas, fosforiladas y/o truncadas.
- [0060]** En la figura 5, Western Blot demuestra, con ayuda de un anticuerpo específico, la presencia de una forma particular de CRMP2 fosforilada en los linfocitos T hiperproliferativos infectados por el retrovirus HTLV1 (C91PL), comparados con los linfocitos de control (Jurkat).
- [0061]** Son más especialmente preferidas en el marco de la presente invención a título de blancos terapéuticos, las proteínas CRMP2 y CRMP5. La proteína CRMP5 parece en especial constituir un blanco especialmente interesante para el diagnóstico y/o el tratamiento de las patologías de tipo enfermedades de priones.
- [0062]** Las proteínas CRMPs, solas o mezcladas, pueden ser asociadas a un vehículo farmacéuticamente aceptable en el seno de una composición farmacéutica, útil para la prevención o el tratamiento de un disfuncionamiento del sistema inmunitario.
- Ácidos nucleicos:*
- [0063]** La solicitud describe también la utilización de cualquier secuencia de ácidos nucleicos aislados que codifica a una de las proteínas CRMP1, CRMP2, CRMP3, CRMP4 y CRMP5, o fragmentos nucleotídicos o secuencias que derivan de una de las secuencias, debido a la degeneración del código genético o debido a la mutación, supresión, o inserción de al menos un nucleótido, teniendo dichas secuencias derivadas una actividad biológica prácticamente idéntica a la de la proteína considerada.
- [0064]** Las diferentes secuencias nucleotídicas o peptídicas descritas en la solicitud pueden ser de origen artificial o no. Puede tratarse de secuencias de ADN o de ARN, obtenidas por cribado de bancos de secuencias mediante sondas elaboradas a partir de secuencias de origen. Estos bancos pueden ser preparados mediante unas técnicas clásicas de biología molecular conocidas por el experto en la materia.
- [0065]** Las secuencias nucleotídicas descritas en la solicitud pueden también prepararse mediante síntesis química o también con métodos mixtos que incluyan la modificación química o enzimática de secuencias obtenidas por cribado de las bandas. Estas secuencias nucleotídicas permiten la realización de sondas nucleotídicas capaces de hibridarse fuertemente y específicamente con una secuencia de ácidos nucleicos, de un ADN genómico o de un ARN mensajero que codifica a un péptido según la invención o un fragmento biológicamente activo de este.
- [0066]** Están comprendidas las secuencias homólogas, definidas como:

i) des secuencias similares a al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, aún más preferentemente el 90 %, de una secuencia que codifica a una CRMP humana (tal como aquella representada en la figura 8) ; o

ii) secuencias hibridadoras con una secuencia que codifica a una CRMP humana o su secuencia complementaria, en condiciones astringentes de hibridación.

5 **[0067]** De manera preferente, una tal secuencia nucleotídica homóloga híbrida específicamente a las secuencias complementarias de la secuencia que codifica a una CRMP de la figura 8 en condiciones astringentes. Los parámetros que definen las condiciones de astringencia dependen de la temperatura a la cual el 50% de las hebras apareadas se separan ( $T_m$ ).

10 **[0068]** Para las secuencias que comprenden más de 30 bases,  $T_m$  se define como la relación:  $T_m = 81,5 + 0,41 (\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentración en cationes}) - 0,63 (\% \text{ formamida}) - (600/\text{número de bases})$  (Sambrook y otros, 1989). Para las secuencias de longitud inferior a 30 bases,  $T_m$  se define mediante la relación:  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ .

15 **[0069]** En condiciones de astringencia apropiadas, en las cuales las secuencias no específicas no se hibridan, la temperatura de hibridación puede ser preferentemente de 5 a 10°C por debajo de  $T_m$ , y los tampones de hibridación utilizados son preferentemente soluciones de fuerza iónica elevada tal como una solución 6xSSC por ejemplo.

**[0070]** El término "secuencias similares" empleado más arriba se refiere al parecido perfecto o identidad entre los nucleótidos comparados y también al parecido no perfecto que se califica de similitud. Esta búsqueda de similitudes en las secuencias nucleicas distingue por ejemplo los purinas y las pirimidinas.

20 **[0071]** Entre estas secuencias homólogas, están comprendidas las secuencias de los genes de mamíferos diferentes del hombre, que codifican a una CRMP, preferentemente de un primate, de un bovino, ovino o cerdo, o incluso de un roedor, así como las variantes alélicas.

**[0072]** Un ácido nucleico que codifica a una CRMP es en especial útil en el marco de una terapia génica, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el seno de una composición farmacéutica.

*Antisentido:*

25 **[0073]** Por su parte, se privilegia la utilización de secuencias anti-sentido anti- CRMP1, CRMP2, CRMP3, CRMP4 y/o CRMP5 cuando se busca bloquear la expresión de la proteína CRMP considerada.

**[0074]** Las secuencias nucleotídicas que codifican a las proteínas CRMP1, CRMP2, CRMP3, CRMP4 o CRMP5 son útiles para la producción de secuencias anti-sentido capaces de hibridarse específicamente con una secuencia de ácidos nucleicos que incluyen el ARN mensajero que puede utilizarse en terapia génica.

30 **[0075]** La solicitud describe por lo tanto también la utilización de secuencias anti-sentido capaces de inhibir al menos parcialmente la producción de las proteínas CRMPs identificadas de más arriba.

**[0076]** Estas secuencias se pueden formular en composiciones farmacéuticas, útiles en terapia génica.

*Anticuerpo anti-CRMP:*

35 **[0077]** La solicitud describe también la utilización de anticuerpos mono- o policlonales o sus fragmentos, anticuerpo quiméricos o inmunconjugados obtenidos a partir de una CRMP escogidas de entre las proteínas CRMP1, CRMP2, CRMP3, CRMP4 o CRMP5, derivados o fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de CRMPs.

**[0078]** Estos anticuerpo son útiles para bloquear la expresión de la proteína CRMP considerada.

**[0079]** Los anticuerpo policlonales pueden ser obtenidos según el protocolo descrito en los ejemplos. Sin embargo, estos anticuerpos pueden obtenerse también con ayuda de métodos convencionales.

40 **[0080]** Los anticuerpos policlonales pueden ser obtenidos a partir del suero de un animal inmunizado contra un polipéptido según los modos operatorios usuales.

45 **[0081]** Más especialmente, se puede utilizar como antígeno un fragmento peptídico apropiado, tal como se ha definido más arriba, que puede ser acoplado mediante un residuo reactivo a una proteína o a otro péptido. Se inmunizan unos conejos con el equivalente de 1 mg de el antígeno peptídico según el proceso descrito por Benoit y otros., PNAS USA, 79, 917-921 (1982). A intervalos de cuatro semanas, los animales son tratados con unas inyecciones de 200mg de antígeno y sangrados de 10 a 14 días más tarde. Tras la tercera inyección, se examina el anti-suero para determinar su capacidad de ligarse al péptido antígeno radiomarcado con yodo, preparado con el método cloramina-T y a continuación se purifica con una cromatografía en columna intercambiadora de ión carboximetilcelulosa (CMC). A continuación, se recogen las moléculas de anticuerpos en los mamíferos y se aíslan  
50 hasta la concentración deseada con los métodos bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, utilizando DEAE Sephadex para obtener la fracción IgG.

- 5 **[0082]** Con la finalidad de aumentar la especificidad del suero policlonal, los anticuerpos pueden ser purificados con una cromatografía de inmutio-afinidad utilizando polipéptidos inmutizantes en fase sólida. El anticuerpo se pone en contacto con el polipéptido inmutizante en fase sólida durante una duración suficiente de tal manera que pueda hacer inmutio-reaccionar el polipéptido con la molécula de anticuerpos con el fin de formar un complejo inmutiológico en fase sólida.
- [0083]** A título representativo de las secuencias utilizadas para producir estos anticuerpos, se pueden especialmente citar aquellos representados en la figura 8.
- [0084]** Se trata de:
- péptido 6 (CMRP1): SEQ ID n° 22 ;
- 10 - péptido 3 (CMRP2): SEQ ID n° 23 ;
- péptido 4 (CMRP2): SEQ ID n° 24 ;
  - péptido 7 (CRMP4): SEQ ID n° 25 ;
  - péptido 8 (CRMP3): SEQ ID n° 26 ;
  - péptido 5 (CRMP5): SEQ ID n° 27 ;
- 15 - péptido 9 (CRMP2 C-terminal): SEQ ID n° 28.
- [0085]** El anti-pep4 es más específico de CRMP2, lo cual es especialmente ventajoso teniendo en cuenta la fuerte homología entre las proteínas CRMPs que hace difícil la producción de anticuerpos específicos. El péptido comprende una serina que es un sitio de fosforilación potencial y que, aparentemente, facilita la detección de la forma fosforilada.
- 20 **[0086]** El anti-pep 9 (CRMP2 C-terminal) es también específico de una parte de la proteína CRMP2 que se trunca en determinadas circunstancias patológicas.
- [0087]** El anti-pep5 es específico de CRMP5 y por lo tanto permite ventajosamente diferenciar CRMP5 de las otras CRMPs.
- 25 **[0088]** Se pueden también utilizar anticuerpos monoclonales, que pueden por ejemplo ser obtenidos por el método clásico de cultura de hibridomas de Köhler y Milstein, naturaleza, 256, 495-497, (1975).
- [0089]** Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>. También pueden presentarse en forma de inmutio-conjugados o de anticuerpos marcados.
- [0090]** Los anticuerpos anti-CRMP son útiles en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable en composiciones farmacéuticas útiles para la prevención o el tratamiento del disfuncionamiento del sistema inmutio. También son útiles como herramientas de diagnóstico.
- 30 *Interacción con otras parejas:*
- [0091]** Se puede también concebir intervenir en la cascada de señalización empleando un compuesto o mezcla de compuestos de origen sintético o natural capaz de inhibir la acción de dichas proteínas CRMPs y más especialmente de bloquear la interacción o bien entre dos de entre ellas, o bien entre una de entre ellas y sus parejas biológicas naturales.
- 35 **[0092]** De manera más general, es posible concebir también la realización de las proteínas CRMPs como cebadores para identificar nuevos blancos terapéuticos en extractos biológicos, de tipo lipídico o biopsias, de pacientes aquejados de enfermedades autoinmunes, neuroinflamatorias, linfomas o leucemias T.
- 40 **[0093]** La solicitud describe también la utilización de al menos una proteína CRMP a título de herramienta de diagnóstico para detectar, identificar y/o dosificar al menos una pareja biológica de una proteína CRMP en extractos biológicos de pacientes aquejados de enfermedades autoinmunes, neuroinflamatorias, linfomas o leucemias T.
- [0094]** De este modo los inventores han puesto de manifiesto que las CRMPs, que son por lo tanto moléculas de señalización intracelular, reaccionaban con la proteína príon PrP, implicada en la señalización membranaria.
- 45 **[0095]** Aparentemente, la modulación de la expresión de las CRMPs en los linfocitos mediante la proteína PrP intervendría en el proceso de degeneración al nivel de la transferencia de información patógena del sistema inmutio hacia el sistema nervioso central. Este aspecto de la invención se ilustra en el ejemplo 4 a continuación.
- [0096]** En calidad de pareja biológica de las CRMP, la proteína PrP puede también ser un blanco interesante de modulación de la actividad de las CRMP.

**[0097]** El enfoque terapéutico a considerar consistiría por lo tanto en bloquear la interacción entre PrP y la proteína CRMP, y en especial CRMP5.

**[0098]** En este caso, se describe en la solicitud una composición farmacéutica que comprende precisamente a título de principio activo un compuesto o mezcla de compuestos, de origen sintético o natural capaz de tomar como diana al menos una proteína CRMP y/o de inhibir la interacción natural de al menos una proteína CRMP y/o un dímero de CRMP con la proteína príon PrP.

**[0099]** Preferentemente, la proteína CRMP considerada es la CRMP5.

**[0100]** Tal como se describe aquí, el compuesto o mezcla de compuestos actúa más especialmente bloqueando la interacción entre las dos proteínas consideradas. Conviene muy especialmente a este efecto los compuestos llamados aptámeros. Se trata de moléculas que tienen la facultad de ligarse a otras moléculas con una gran afinidad y especificidad. A título representativo de este tipo de compuestos, se pueden además especialmente proponer los aptámeros peptídicos.

**[0101]** Las patologías susceptibles de ser tratadas según esta variante son las enfermedades de príon, esporádica, adquirida o genética o, de manera más general, cualquier enfermedad que implique a la PrP en la señalización celular.

**[0102]** En lo que respecta a los compuestos que tienen una actividad estimuladora o inhibidora frente a las proteínas CRMPs, pueden ser seleccionados con ayuda de un método de screening en el cual el compuesto a verificar se pone en contacto con una proteína CRMP y la interacción entre las dos proteínas determinadas.

**[0103]** Otro objeto de la invención es por otro lado un método de cribado *in vitro* de moléculas útiles para el tratamiento de enfermedades de priones, en el cual se ponen en contacto una molécula a verificar con una proteína príon PrP y una proteína CRMP, y se evalúa la capacidad de la molécula para inhibir la interacción de la CRMP, o de un dímero de CRMP, con la proteína PrP, siendo una acción inhibidora de esta interacción indicativa de una molécula útil para el tratamiento de enfermedades de priones.

*Administración:*

**[0104]** Los modos de administración, posologías y formas galénicas óptimos de las composiciones farmacéuticas descritas en la solicitud pueden ser determinados según los criterios generalmente considerados en el establecimiento de un tratamiento terapéutico adaptado a un paciente, como por ejemplo la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento, los efectos secundarios constatados, etc.

**[0105]** Preferentemente, las composiciones farmacéuticas descritas en la solicitud pueden ser administradas por vía sistémica, preferentemente por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica o por vía oral.

**[0106]** De manera general, se puede administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz que varía desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 1 mg de proteína CRMP a adultos humanos.

**[0107]** La solicitud describe también una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico tal como el definido anteriormente, que codifica a una CRMP o un ácido nucleico antisentido y un vehículo farmacéuticamente aceptable, estando dicha composición destinada a ser utilizada en terapia génica. El ácido nucleico preferentemente insertado en un vector generalmente viral (tales como los adenovirus y los retrovirus) puede ser administrado en forma pura, exento de cualquier vehículo que favorezca la transferencia a la célula diana, tales como liposomas aniónicos, lípidos catiónicos, micro-partículas, por ejemplo micro-partículas de oro, agentes de precipitación, por ejemplo fosfato de calcio, o cualquier otro agente que facilita la transfección. En este caso, el polinucleótido puede simplemente diluirse en una solución fisiológicamente aceptable, tal como una solución estéril o una solución estéril tampón, en presencia o en ausencia de un vehículo.

**[0108]** De manera alternativa, un ácido nucleico tal como se describe en la solicitud puede ser asociado a unos agentes que faciliten la transfección. Puede asociarse, entre otros, (i) a un agente químico que modifique la permeabilidad celular tal como la bupivacaína ; (ii) encapsulado en liposomas, eventualmente en presencia de sustancias suplementarias que faciliten la transfección: o (iii) asociado a unos lípidos catiónicos o micro-partículas de silicio, de oro o de tungsteno.

**[0109]** Cuando las construcciones de ácido nucleico descritas en la solicitud incluyen micro-partículas, estas pueden ser inyectadas por vía intradérmica o intraepidérmica por la técnica del pistola de genes, "gene gun" (WO 94/24263).

**[0110]** La cantidad a utilizar como medicamento depende en especial de la construcción del propio ácido nucleico, del individuo al cual se administre este ácido nucleico, del modo de administración y del tipo de formulación, y de la patología. De manera general, se puede administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz que varía desde aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg, preferentemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 800 mg y, de manera preferente de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 250 mg, a adultos humanos.

**[0111]** Las construcciones de ácidos nucleicos descritas en la solicitud pueden ser administradas por cualquier vía de administración convencional tal como en especial por vía parenteral. La selección de la vía de administración depende en particular de la formulación escogida.

*Métodos diagnósticos:*

5 **[0112]** La solicitud describe también un método *in vitro* de pronóstico y/o de diagnóstico de una patología ligada a un disfuncionamiento del sistema inmunitario, comprendiendo el método la puesta en evidencia en células del sistema inmunitario, a saber en especial de los linfocitos, células dendríticas y monocitos extraídos de un paciente, (por ejemplo de la sangre o del cerebro) de una expresión o localización anormal de una proteína CRMP con respecto a de los linfocitos de control.

10 **[0113]** La solicitud describe más concretamente un método para el pronóstico y/o diagnóstico de enfermedades auto-inmunes, de linfomas, leucemia del adulto, enfermedades neuro-inflamatorias ligadas o no a una infección vírica y/o de enfermedades de priones, caracterizada por el hecho de que se ponen en evidencia en linfocitos recogidos en un individuo, la presencia de al menos una proteína CRMP cuya expresión, secuencia o localización está modificada con respecto a de los linfocitos de control obtenidos en sujetos sanos.

15 **[0114]** De este modo se puede diagnosticar cualquier patología ligada a un disfuncionamiento de los linfocitos T, tal como se describe más arriba.

**[0115]** Se puede en particular determinar si un individuo es portador o es susceptible de desarrollar una patología escogida entre:

- las leucemias T y los linfomas (T) ;

20 - las infecciones virales tal que virus del herpes, de la rubéola, el virus de epstein-Barr, HTLV-1 o VIH ;

- las enfermedades de priones ;

- y las enfermedades neuroinflamatorias desmielinizantes.

La evaluación de la expresión de las proteínas CRMPs puede ser realizada con diferentes técnicas bien conocidas por el experto en la materia. EL ARN que codifica a las proteínas puede ser detectado y cuantificado con ayuda de sondas nucleotídicas específicas.

25

**[0116]** La solicitud describe así un método de diagnóstico *in vitro* de una patología ligada a un disfuncionamiento del sistema inmunitario o de una predisposición a desarrollar una patología ligada a un disfuncionamiento del sistema inmunitario, que comprende las etapas consistentes en:

- poner en presencia una muestra biológica que contiene ARNm obtenido a partir de linfocitos en un paciente, con oligonucleótidos específicos que permiten la amplificación de todo o parte del transcrito del gen que codifica a una CRMP ;

30

- amplificar dicho transcrito ;

- detectar y cuantificar los productos de amplificación ; siendo una modificación de la concentración de transcrito de la CRMP con respecto al control normal indicador de una patología ligada a un disfuncionamiento del sistema inmunitario o de una predisposición a desarrollar una tal patología.

35

**[0117]** Los productos de los genes que codifican para las proteínas CRMPs también pueden dosificarse con ayuda de anticuerpos correspondientes tales como los definidos más arriba y localizados en la célula.

**[0118]** La solicitud describe también un método de diagnóstico *in vitro* de una patología ligada a un disfuncionamiento del sistema inmunitario o de una predisposición a desarrollar una patología ligada a un disfuncionamiento del sistema inmunitario, para la detección o la medida de la concentración de expresión y/o de la actividad de CRMP en una muestra de linfocitos de un paciente, con ayuda de anticuerpos anti-CRMP. Este método comprende la puesta en contacto de al menos un anticuerpo dirigido contra la CRMP con dicha muestra en condiciones que permiten la formación eventual de complejos inmunológicos específicos entre la CRMP y el o dichos anticuerpos y la detección de los complejos inmunológicos específicos eventualmente formados y/o la inhibición de

40

45 la actividad de la CRMP por el anticuerpo.

**[0119]** Alternativamente, la presencia de los anticuerpos anti-CRMP puede determinarse con ayuda de las proteínas CRMPs o de sus fragmentos epitópicos que pueden ser marcados para que los complejos formados entre las proteínas y dichos anticuerpos sean a continuación fácilmente detectables en muestras biológicas.

**[0120]** Los ejemplos y figuras siguientes se presentan a título ilustrativo y no limitativo de la presente invención.

50

figuras:

**[0121]**

Figura 1: Comparación por análisis RT-PCR del nivel de expresión de los ARNm que codifican a la CRMP -4, -2 y -1 en linfocitos y células mononucleadas, de control o provenientes de pacientes aquejados de patologías disímunes.  
5 El nivel de expresión de las ARNm de las CRMP está normalizado con respecto al nivel de expresión del gen-ubícuo GAPDH. Los resultados se expresan en valor relativo como una relación de píxeles entre el amplicón de cada CRMP y el amplicón de G3PDH.

Figura 2: perfil electroforético de las proteínas CRMP1, 2 y 4 en un linaje linfocitario Jurkat comparado con un linaje de célula nerviosa Dev.

10 Figura 3: Detección inmunocitoquímica de la situación subcelular de la proteína CRMP2 en células mononucleadas sanguíneas (PBL) de pacientes de control o infectados por HTLV-1 o que presentan una deficiencia inmune ligada al sistema de ligandos Fas/Fas, o infectados por el VIH.

Figuras 4: caracterización de la presencia nuclear reconocida por el anti CRMP-2 (péptido 4) en los linfocitos T hiperproliferativos.

15 Figuras 4a: examen tras inmuno-detección de CRMP-2 y contracoloración por el intercalante del ADN Dapi en las células Jurkat T (de control) y las células C 8166 (T infectadas por HTLV-1 no productoras de virus).

Figuras 4b: examen de la inmuno-detección de CRMP-2 en microscopia confocal en las células CEM (linaje T control) y las células C91PL (linaje infectado por HTLV-1).

20 Figura 5: Demostración por Western Blot con ayuda del anticuerpo específico anti-CRMP2 (péptido 4) de la presencia de una forma particular de CRMP2 fosforilada en los linfocitos T hiperproliferativos (C91 PL) comparada con los linfocitos de control (Jurkat).

Figura 6: Análisis inmunohistoquímico de la expresión de las proteínas CRMP5 y CRMP2 al nivel del timo humano fetal (A, B, C) y en un tímoma (D, E, F).

25 Figura 7: Caracterización mediante ensayos de doble-híbrido por conjugación de la interacción entre las proteínas PrP bovina y CRMP5 humana.

Figura 8: Secuencias en aminoácidos de las proteínas humanas CRMP1, CRMP2, CRMP3, CRMP4 y CRMP5. Están también presentes en esta figura las secuencias de los péptidos escogidos para producir anticuerpos específicamente dirigidos contra las CRMPs.

30 La figura 9 muestra una cinética de migración de linfocitos T transfectados o no con un vector que codifica a la CRMP-2.

La figura 10 da cuenta del número de células T que han migrado en tres experimentos, tras la sobre-expresión de CRMP- 2 gfp.

La figura 11 da cuenta del número de células T que han migrado en dos experimentos, tras la transfección de plásmidos CRMP-2 asociada a cmyc y CRMP-2 mutada (Delta 381CRMP2-cmyc).

35 **MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS**

1. Células y Cultura celular

**[0122]**

40 -Células del SI: Los linfocitos T son o bien linfocitos establecidos en linajes (IL-2 independiente), o bien linfocitos en cultivo primario y cuyo crecimiento necesita la presencia de iL-2. Estos linfocitos se cultivan (37°C, 5% CO2) en suspensión en un medio salino enriquecido: o bien en SVF (10%) en el caso de los linajes linfocitarios, o en suero humano de tipo AB (SAB 10%) y en IL-2 en el caso de los cultivos primarios de linfocitos T. Unos linfocitos periféricos (PBL para peripheral blood lymphocytes) también se han aislado en condiciones recién preparadas a partir de sangre de pacientes o de sujetos control, separados en un gradiente de Ficoll y recuperados tras una fase de adhesión de los monocitos/ macrófagos.

45 - Tratamientos de los linfocitos T: para determinados experimentos, los PBL aislados en condiciones recién preparadas han sido tratados por unos anticuerpos agonistas CD3 (10 mg/ml) que fomentan la activación de los linfocitos mediante un antígeno a través del receptor T (TCR) o mediante la fitohemaglutinina (PHA - 10 mg/ml) (C. Malcus).

2. Examen de los transcritos (ARNm) por el método de RT-PCR (reverse transcription y polimerase chain reaction).

**[0123]**

- Aislamiento de los ARN totales: este experimento se hace sistemáticamente a 4°C para evitar una degradación de los ARN por las Rnasas. Las extracciones de aRN han sido efectuadas a partir de cultivos celulares o de linfocitos aislados en condiciones recién preparadas a los cuales se añade una solución de RNazol (2 ml para 106 células). El RNazol contiene el fenol y el isotiocianato de guanidio y realiza la lisis de las células. La separación de fase se realiza con ayuda de cloroformo (400 ml por cada 2 ml de RNazol). Tras la homogeneización (vortex) y tras 5 min de reposo, la muestra se centrifuga en reposo (5 minutos) luego se centrifuga a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Los ARN presentes en la fase acuosa (volumen medido) se precipitan una primera vez mediante adición de un volumen idéntico de isopropanol (15 min a 4°C) y luego centrifugación (12000 rpm durante 15 minutos a 4°C). Una segunda precipitación se realiza añadiendo al vaso un volumen de acetato de sodio 0,3 M pH 5,2 así como tres volúmenes de etanol absoluto a -20°C. El precipitado se recoge por centrifugado (12000 rpm, 15 minutos, 4°C). La eliminación de las sales se efectúa por adición al vaso de 800 ml de etanol 80% a -20°C seguido de una centrifugación. Tras eliminación de cualquier rastro de etanol, se disuelve el vaso en 100 ml de agua destilada y se almacena a -80°C. La dosificación de los ARN se hace por medida de la densidad óptica con espectrofotómetro a 260 y 280 nm (1 unidad de DO a 260 nm = 40 mg de aRN). La relación entre los DO obtenidos a 260 nm y aquellos obtenidos a 280 nm debe ser cercana a 2, índice de una buena extracción de aRN sin rastro de proteínas.

- La transcripción inversa: La transcripción inversa (RT siglas de reverse transcription) es la etapa preliminar a la polimerización iterativa que utiliza una ADN polimerasa incapaz de polimerizar ADN a partir de aRN. La RT se efectúa gracias a una transcriptasa inversa la Rtase del virus MuLV y se inicia por un cebador que permite la elongación y la síntesis de una hebra de aDN complementario del ARN por la enzima. En una perspectiva de estudio comparativo de los productos de amplificación de diferentes ARNm, la utilización de los cebadores no-específicos (oligoDT) se ha mostrado más adaptada, ofreciendo la posibilidad de llevar las diversas PCR específicas a partir de una misma muestra de RT. 500 ng de aRN totales diluidos en 7 ml de agua (qsp) se incuban 10 minutos a 70°C para permitir la desnaturalización de las estructuras secundarias y luego unos tubos se sumergen inmediatamente en el hielo para evitar cualquier renaturalización. A estos 70 ml de aRN totales se añaden entonces 1 ml de oligoDT (100 ng/ml) y 12 ml de medio "de incubación" que contiene 0,5 mM de dNTP, 4 mM de tampón RT, 40 U de RNAsina (inhibidora de Rnasas), 10 mM de ditiotreitolo o DTT (desnaturalizante), 1 ml de MuLV-Rtase (200 U/ml). La mezcla reactiva se incuba 90 minutos a 42°C. A continuación los productos de RT se diluyen al 10/100 en agua destilada y se almacena a -20°C.

- La reacción de polimerización en cadena (PCR): La polimerización iterativa (PCR siglas de polimerase chain reaction) es una técnica que consiste en repetir ciclos de polimerización de un segmento de un ADN de interés. La primera etapa de cada ciclo es una etapa de desnaturalización efectuada a 95°C. La segunda etapa es una etapa de hibridación o enganche con cebadores específicos del segmento que encuadran a la región a amplificar a una temperatura a la cual 50% de los ADN están en forma de doble hebra y los 50% restante en la forma simple hebra (Tm). La tercera etapa es la etapa de elongación a 72°C, temperatura óptima para la actividad de la ADN polimerasa ADN dependiente termoestable, la Taq polimerasa. Los parámetros que se deben considerar prioritariamente para optimizar la PCR son la selección de los cebadores (realizados por el programa Primer3 y validados por comparación con las secuencias humanas indexadas, Blast), la temperatura de hibridación o Tm, la concentración en MgCl2 y el número de ciclos. Todas estas condiciones se han puesto a punto antes de realizar las PCR y se resumen en la tabla siguiente:

Cebadores para la Sonda RT-PCR para el Southern-blot				Tm	[MgCl <sub>2</sub> ]	número de ciclos
CRMP-4	sentido : gcaagtgtaggaaggcaagcct SEQ ID N°1	Anti-sentido : ggcagctctggaacgfgaaga SEQ ID N°2	Sonda : cctcagccctgtcttcacg SEQ ID N°3	62 °C	2 mM	28
CRMP-2	sentido : tcacatcagaactcctgtgg SEQ ID N°4	Anti-sentido : catgagtgaggaaacttc SEQ ID N°5	Sonda : ccataccaccctgtctct SEQ ID N°8	62 °C	3 mM	22
CRMP-1	sentido : tcatgctgaatccacactcgg SEQ ID N°7	Anti-sentido : cctctgaggcagttgacgg SEQ ID N°8	Sonda : gacatgccaaggactgact SEQ ID N°9	62 °C	3 mM	26
CRMP-3	sentido : gccgcccctaccagagacc SEQ ID N°10	Anti-sentido : gtgcagcgacagccagat SEQ ID N°11	Sonda : cggagaaaaccctcatcgt SEQ ID N°12	62 °C	3 mM	30
CRMP-5	sentido : ctgggagagaggagtgttg SEQ ID N°13	Anti-sentido : gaagtcctcctccctggacct SEQ ID N°14	Sonda : gttttggccgttaccagt SEQ ID N°15	62 °C	3 mM	28
Actina	sentido : ggacttcgagcaagagatgg SEQ ID N°16	Anti-sentido : acatctcgtggaaggaggac SEQ ID N°17	Sonda : aagtactcgtgtgtggatcgg SEQ ID N°18	62 °C	3 mM	25
G3PDH	sentido : ggctctccagaacatcatcc SEQ ID N°19	Anti-sentido : ggagattcagtggtggg SEQ ID N°20	Sonda : gacatcaagaagggtggaagcag SEQ ID N°21	62 °C	3 mM	23

Cada muestra de PCR contiene 10 ml de RT diluida al 1/10ème y 40 ml de Mix (5 ml de tampón PCR 1X, 2 o 3 ml de MgCl<sub>2</sub>, 4x1 ml de dNTP, 1 ml de cada cebador (sentido y anti-sentido), 0,4 ml de Taq polimerasa, qsp 50 ml de agua destilada. La PCR comprende una primera etapa de desnaturalización de 5 min a 95°C y luego un número de ciclos determinado para cada par de cebadores (Cf. TABLA) (1 min a 95°C, 1 min 15 a 62°C, 1 min 30 a 72°C). La PCR se termina con una etapa de elongación de 15 min a 72°C. Los productos de PCR son almacenados a -20°C.

- Visualización de los RT-PCR: Southern-blot: Se realiza después de la separación de los productos de amplificación por electroforesis y luego transferencia en membrana e hibridación con una sonda interna radiomarcada. La migración de los diferentes productos de PCR se hace por deposición de 10 ml de cada muestra en un gel de 1,5% de agarosa en un tampón TBE (Tris-Borate-EDTA) 0,5X que contiene Bromuro de etidio (0,5 mg/ml al final) y aplicación de 100 V. Una vez realizada la migración, los ADNc son transferidos según un método de electrotransferencia semi-seca en membrana de nylon en tampón TBE 0,5X. Tras la transferencia (15V-45 min), el ADN se fija a la membrana mediante una solución de NaOH (0,4N-2 min) y luego se neutraliza (SSC 6X-10 min). La sonda interna, específica del fragmento de aDN amplificado mediante PCR (Cf. TABLA) se radiomarca en 5' con una terminal quinasa (T4 Quinasa) con  $\square$ 32P-ATP. Se incuban 2 ml 10 min a 37°C con 5 ml de tampón forward, 1 ml de T4 quinasa, 2 ml de  $\square$ 32P-ATP y 15 ml de agua destilada. La quinación se detiene a 4°C. A continuación, se purifica la sonda radiomarcada en una columna de exclusión (Bio-Rad Laboratories) que retiene los nucleótidos libres. Las membranas de transferencia se prehibridan 30 min a 42°C por incubación en el medio de hibridación (SSC 6X, Denhardt 2X, tampón fosfato 25 mM, disodio etileno diamina tetra-acetato o EDTA 25 mM, SDS 0,1%, ADN de esperma de salmón 250 mg/ml) con el fin de saturar todos los sitios no específicos. La hibridación se efectúa durante 30 min a 42°C con la sonda interna. A continuación se lavan las membranas a 42°C en medios de astringencia creciente: en SSC6X/0,1% SDS 10 min, SSC 2X/SDS 0,1% 20 min y SSC 0,5X/0,1% SDS 10 min. Las membranas radiomarcadas y selladas en hoja plástica se disponen a continuación en una caja de autoradiografía provista de una pantalla amplificadora. La visualización de las bandas de aDNc radiomarcadas se hace por lectura con Phosphorimager y la cuantificación por utilización de un programa informático (Image Quant).

### 25 3. Inmuno-detección de las proteínas CRMP.

#### [0124]

- Los anticuerpos anti-péptidos: Se han preparado unos anticuerpos policlonales anti-péptidos específicos de las 5 CRMP tras selección de un inmunógeno situado en una zona no homóloga para las otras CRMP e inyección en un conejo. La especificidad de cada suero para una proteína CRMP determinada se ha controlado mediante Western-blot en las proteínas CRMP recombinantes. Los sueros extraídos de cada uno de estos conejos antes de su inmunización (sueros pre-inmunes) son negativos en Western-blot en las proteínas recombinantes obtenidas en Ecoli transformadas o células Hela transfectadas y se utilizan como control. Previamente, se han determinado las diluciones óptimas para su utilización en Western-blot o en inmunocitoquímica.

- Western-blot: esta técnica consiste en la separación electroforética de las proteínas y luego en la transferencia en membrana que permite la visualización de una proteína de interés después de la fijación de un anticuerpo específico revelado por un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa. Los Western-blot se realizan en extractos proteicos de lisatos de células inmunes o nerviosas en cultivo o aisladas en condiciones recién preparadas. En general, se realiza la lisis de las células en un tampón sin detergente (20mMTris-HCl, 10% sacarosa, 1mMde eDTA, 5mMde eGTA y un cóctel de anti-proteasas (Complete™ 1X) y a veces en tampón RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,2, 150 mM de NaCl, 1% de Triton 100X, 0,1% de SDS, 1 mM de eDTA, 1% desoxicolato de sodio, Completa 1X). La homogeneización de los lisatos celulares se completa a continuación con una sonicación a 80Hz. Después de una dosificación proteica, se conserva una solución de 1 o 2 mg/ml de proteínas a -20°C. La muestra de deposición (40 mg finales de proteínas) se desnaturaliza mediante adición de un tampón reductor (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS 1 %, glicerol 10%, ditiotretitol DTT 0,1 M, azul de bromofenol) y calefacción (5 min a 95°C). La separación de las proteínas se realiza en gel de acrilamida-SDS (10%-0,1%, respectivamente). Tras la migración a 100V, las proteínas son electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa por transferencia discontinua que utiliza 3 tampones: Tampón 1 (0,3M Tris base, 20% Metanol) ; Tampón 2 (25 mM Tris base, 20% Metanol) ; Tampón 3 (25 mM Tris base, 40 mM EACA, 20% Metanol) que permite una mejor transferencia de todas las proteínas, cualquiera que sea su peso molecular. Las membranas se incuban 5 min en una solución de rojo Ponceau-ácido tricloroacético que permite fijar y visualizar las proteínas. A continuación, se saturan las membranas durante 1 h a temperatura ambiente en una solución de Tampón fosfato (PBS)-Tween 20 0,1% - leche desnatada 5%. La inmuno-detección de las CRMP con los sueros policlonales de conejo anti-CRMP diluidos en PBS-Tween 20 0,1%-leche 1% (CRMP-4: 1/100 ; CRMP-2: 1/500 ; CRMP-1: 1/500 ; CRMP-3: 1/500 ; CRMP-5: 1/200) o pre-inmun (1/200) se realiza a 4°C-una noche. Entonces se aclaran los blots (3x5 min) en PBS-Tween 20 0,1 %-leche 1 % y luego se incuban 1 h con un anticuerpo secundario específico de los IgG de conejo y se acoplan con la peroxidasa (1/50000e-1h-temperatura ambiente). Después de 3 aclarados (5 min) en PBS-Tween 20 0,1%-leche 1%, el blot se revela en cámara oscura gracias a un kit de electroquimioluminiscencia (Covalab) y tras impresión en film fotográfico. Durante un experimento, las muestras se han tratado con una fosfatasa durante 1h a 37°C antes de su separación en un gel de acrilamida-SDS: 2 ml de fosfatasa alcalina CIP (Calf intestine phosphatase a 20 unidades/ml) se añaden a 20 ml de muestra proteica y a 2 ml de tampón que permiten la actividad de la enzima.

- Inmunoquímica (ICC): La detección de las CRMP se ha realizado a escala celular por inmunocitoquímica. Los linfocitos, células no adherentes, se extienden por centrifugado (cyospin- 600 rpm-5 min) mientras que las células nerviosas Dev se cultivan en hojas de Permanox (Labteck). Una fijación de las células mediante acetona (-20°C, 5 min) tiene como objetivo el de fijar las proteínas y de permeabilizar las células a la entrada de los anticuerpos reactivos. Estas condiciones han permitido la detección de las CRMP 1, 2, 3, 4 y 5. El bloqueo de los lugares no específicos se hace con una solución de BSA 0,1% (30 minutos a temperatura ambiente). Un primer contacto de las células fijadas en hojas se realiza con el anticuerpo primario (anti-CRMP productos del conejo diluidos en PBS pH 7,4) (1h-37°C en cámara húmeda). Tras 3 aclarados en tampón fosfato (PBS pH 7,4, 5 min), el anticuerpo secundario específico de los IgG del conejo se pone en contacto (1h - temperatura ambiente) y se aclara 3 veces en PBS 5 min. La contracoloración de los núcleos se hace a continuación mediante una incubación en solución de Dapi (intercalando nucleico-0,025 mg/ml-1min). Las hojas se montan en glicerol tampón de pH 7,4. Los resultados de estos análisis se representan en las figuras 2-8.

**EJEMPLO 1:**

15 **[0125]** Evaluación de la expresión de las CRMP 1, 2 y 4 en los linfocitos y células mononucleadas, de control o provenientes de pacientes aquejados de patologías disímunes.

- ARNm (con respecto a GAPDH) una primera evaluación valorando los ARNm correspondientes. Los resultados se presentan de manera detallada en la figura 1 y se resumen en la TABLA I siguiente.

Perfil comparativo, considerando todas las muestras para una misma CRMP:

TABLA I

	CRMP2	CRMP4	CRMP1
linajes T control	+	0	0
Linfocitos T/HTLV-1	++	+++	+++
Lympho. Pacientes "control"	±	0	±
Lympho. Pacientes défic. Apopt.	±	0	+/++
Pacientes VIH	++	++	++

20

**[0126]** El análisis precedente se completa por detección de las proteínas CRMP1, 2 y 4 en linfocitos T y de las células nerviosas mediante Western Blot en el lisato celular (Dev: células nerviosas ; Jurkat: linaje linfocitario T) en tampón no detergente y utilizando los anticuerpos policlonales antipeptidos específicos de cada CRMP.

**[0127]** Los resultados se presentan en la figura 2.

25 **[0128]** Se destaca que los anti CRMP-1, -2 y -4 detectan varias isoformas compartidas por los linfocitos T y las células nerviosas.

**EJEMPLO 2:**

30 **[0129]** Detección inmunocitoquímica de la localización subcelular de la proteína CRMP2 en células mononucleadas sanguíneas (PBL) de pacientes de control o infectados por el HTLV-1 o que presentan una deficiencia inmune ligada al sistema de ligandos Fas/Fas o infectados por el VIH.

**[0130]** El anticuerpo anti CRMP-2 se ha preparado previamente y se ha aislado según el protocolo descrito en el punto 3 del preámbulo « materiales y método ».

**[0131]** Los resultados se ilustran en la figura 3.

**[0132]** Se destaca que:

35 - la localización de CRMP-2 es esencialmente citoplásmica en linfocitos (PBL) aislados de un sujeto de control o de un sujeto infectado con el VIH-1 ; también puede ser nuclear en los linfocitos aislados de pacientes infectados por HTLV-1 o en los PBL de un paciente disímune (deficiencia Fas) ;

- CRMP-2 se expresa más en los linfocitos de los pacientes comparados con los del sujeto de control cultivados en IL2, por lo tanto preactivados.

40 **[0133]** Mediante examen tras inmuno-detección de CRMP-2 y contracoloración mediante el intercalante del ADN Dapi, se destaca que la expresión es mayoritariamente nuclear en los linfocitos T crónicamente infectados por HTLV-

1 e hiperproliferativos. En lo que se refiere al examen de la inmuno-detección de CRMP-2 con microscopia confocal, se revela una presencia nuclear muy reducida en los linfocitos T de control y mayoritaria en los linfocitos T crónicamente infectados por HTLV-1 (figura 4).

5 **[0134]** Como conclusión, La expresión de CRMP2 se aumenta en núcleos de los linfocitos proliferativos. En cambio en los pacientes infectados por el VIH, la CRMP2 permanece citoplásmica. En los pacientes disímunes (deficientes en Fas), la localización es nuclear en algunas células. Las figuras 3 y 4 dan cuenta de los resultados obtenidos.

**[0135]** Asimismo, se ha verificado la presencia nuclear de una proteína reconocida por este mismo anticuerpo en los linfocitos T hiperproliferativos mediante Western Blot en fraccionamientos celulares enriquecidos en núcleos.

EJEMPLO 3:

10 **[0136]** Caracterización por inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas CRMP5 y CRMP2 al nivel del timo.

**[0137]** Las proteínas se han caracterizado con ayuda de sus anticuerpos respectivos.

**[0138]** Las células analizadas son células de timo normal de feto humano y en un timoma de un paciente adulto.

15 **[0139]** A título testimonial, la misma inmunohistoquímica se ha realizado en el timo humano de un embrión de 6 semanas. El timo se ha sobrecongelado y cortado en criostato (15 mm). Los trozos se han fijado durante 15 minutos en acetona. La inmunohistoquímica se realiza en las mismas condiciones que en el cerebro.

**[0140]** Este análisis revela una expresión de CRMP2 y CRMP5 en las células epiteliales del timo normal en el estadio embrionario. La expresión desaparece en el adulto normal y puede inducirse en el caso de patología tumoral (timoma).

EJEMPLO 4:

20 **[0141]** Caracterización de la interacción entre las proteínas PrP bovina y CRMP5 humana.

**[0142]** La interacción entre las proteínas PrP bovina y CRMP5 humana se ha caracterizado mediante ensayos doble-híbrido mediante conjugaciones.

25 **[0143]** Los ADNc que codifican a estas dos proteínas (completas o diferentes formas derivadas) se han clonado en un vector "cebador" y un vector "de presa". El vector cebador pEG202 (Gyuris y al, 1993, Cell 75, 791-803), comprende al gen que codifica al marcador HIS3, un origen de replicación 2 m y dirige la expresión de proteínas fusionadas en el ámbito de enlace al ADN de la proteína LexA (1-202), bajo el control del promotor constitutivo ADHp. En lo que respecta al vector de presa, pJG 4-5 (US 5,580,736), comprende al gen que codifica al marcador TRP1, un origen de replicación de 2 micras y dirige la expresión de proteínas fusionadas con una secuencia de localización nuclear (NLS), en el ámbito activador de transcripción B42 y al epítipo HA, bajo el control del promotor  
30 inducible GALp. Por comodidad, la fusión NLS-B42-HA se designa aquí "Act".

**[0144]** La cepa EGY42 (MAT) (Golemis y al, 1992, Mol. Cell. Biol. 12, 3006-3014) se ha co-transformado con el vector plasmídico pSH18-34 (US 5,695,941) que comprende al gen marcador URA3 y ocho operadores LexA colocados más arriba en el gen transportador *lacZ*□□ y diferentes vectores cebadores que dirigen la expresión de LexA, LexA-PrP, LexA-PrPm (quedando las mutaciones en PrP por determinar), LexA-PrPtr (quedando el  
35 truncamiento de PrP por determinar), LexA-MAX (control negativo) y LexA-CRMP5.

**[0145]** La cepa EGY48 (MAT) se ha transformado con diferentes vectores de presa que dirigen la expresión de Act, Act-PrP, Act-Bax□TM (control negativo) y ActCRMP5.

**[0146]** Estas diferentes cepas se han conjugado de tal manera que pueda crear una matriz de interacción.

40 **[0147]** Esta matriz se ha replicado en medio indicador (Ura-, His-, Trp-, Galactosa/X-gal) lo que permite expresar los cebadores y las presas, seleccionar los exconjugadores diploides y revelar los fenotipos de interacción (color azul, que revela una actividad □-galactosidasa observada cuando se transcribe el gen transportador *lacZ*).

**[0148]** La figura 7 da cuenta de los resultados obtenidos.

**[0149]** Las construcciones verificadas son las siguientes:

PrP: proteína PrP bovina (AA 22-237),

45 PrPm: proteína PrP bovina (AA 22-237) que contiene diversas mutaciones por determinar,

PrPtr: proteína PrP bovina (AA-22-?), truncada hacia el medio de su secuencia (la posición del codón stop queda por determinar),

MAX: control negativo de interacción

CRMP 5: proteína CRMP 5 humana completa.

BAX $\Delta$ TM: control negativo de interacción.

**[0150]** La interacción entre las proteínas PrP (diferentes construcciones detalladas a continuación) y la proteína CRMP5 se detecta cuando las proteínas PrP se expresan como cebadores y la proteína CRMP5 se expresa como presa. LexA-CRMP5 y Act-Prp no dan resultado como fenotipo de interacción. Las de control negativo (LexA-MAX y Act- Bax $\Delta$ TM así como LexA y Act) ne dan como resultado ningún fenotipo de interacción con las proteínas PrP y CRMP. La homodimerización de CRMP5 proporciona el control positivo de interacción de esta matriz.

**EJEMPLO 5:**

**[0151]** Efecto de las CRMP en la migración de los linfocitos T.

## 10 Procedimiento

**[0152]** La migración de los linfocitos T (Jurkat) se evalúa tras transfección o no de plásmido que codifica a diferentes formas de CRMP-2: CRMP2 asociada gfp ; CRMP-2 asociada cmyc y CRMP-2 mutada, Delta381 CRMP-2 (supresión de los aminoácidos 381 a 572 que contienen en un sitio TyrKin, un SH3 binding site y el sitio de adhesión a los heterodímeros de tubulina (Fukata y otros Nat Cell Biol, 2002, Aug. 4(8):583-91). La transfección se verifica mediante la detección de GFP y de cmyc en las células antes y después de la migración mediante Western Blot.

**[0153]** La migración se efectúa en una cámara de Boyden (poros de 3 micras) durante 18 horas en el medio RPMI estándar + suero de ternera fetal. Se depositan 400 000 células en la cúpula superior y se cuenta el número de células que han migrado a la cúpula de abajo (cúpulas por triplicado, 3 experimentos con CRMP-2gfp y dos con CRMP2 cmyc). El nivel basal de migración es aquel obtenido con las células transfectadas mediante un plásmido que no contiene al inserto CRMP-2.

**[0154]** La asociación CRMP/ vimentina se visualiza por inmuno-precipitación y Western Blot (IP vimentina Wester CRMP) y co-inmuno-detección en células sobre linfocitos T que migran o no (microscopia confocal).

Resultados

**[0155]** La sobre-expresión de CRMP-2 gfp o CRMP-2 cmyc en los Jurkat aumenta el número de células que han migrado en 6 horas y 18 horas (figuras 9 y 10).

**[0156]** La mutación deCRMP-2Delta381 (sitio que contiene TyrKin y el tubulin binding site) amplifica la migración lo cual sugiere un papel de este campo en la migración. (Figura 11).

**[0157]** La CRMP-2 es pareja de la vimentina (proteína del citoesqueleto) lo cual sugiere la participación de CRMP-2 en la remodelación del citoesqueleto.

## 30 LISTA DE SECUENCIAS

**[0158]**

<110> INSERM

35

<120> Utilización de una proteína de la familia de las CRMPs para el tratamiento des enfermedades ligadas al sistema inmunitario

<130> BET 02/0808

40

<140> FR 0113342 <141> 2001-10-16

<160> 28

45 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

55 <400> 1

gcaagtgtag gaaggcacgc t 21

<210> 2  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

10 <400> 2  
 ggcagctctg gaacgtgaag a 21

<210> 3  
 15 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 3  
 cctcagcctt gttcttcacg 20

25 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 4  
 tcacatcaga actcctgtgg 20

35 <210> 5  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 5  
 45 catgagtgga ggaacttc 19

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

55 <400> 6  
 ccatcaccac cctgtctct 20

<210> 7  
 <211> 20  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

65 <400> 7

tcatgctgaa tccacctcgg 20  
 <210> 8  
 <211> 19  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
 10  
 <400> 8  
 cctctgaggc agttgacgg 19  
 <210> 9  
 15 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
 <400> 9  
 gacatcgcca aggactgact 20  
 25 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
 <400> 10  
 gccgccccta ccagagacc 19  
 35 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
 <400> 11  
 45 gtgcagcgac agccagat 18  
 <210> 12  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
 55 <400> 12  
 cggagaaaac ctcatcgt 18  
 <210> 13  
 <211> 20  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
 65 <400> 13

ctgggagaga ggagtgggtg 20

<210> 14  
<211> 20  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

10 <400> 14  
gaagtctcct ccctggacct 20

<210> 15  
15 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 15  
gtttgtggc cgttaccagt 20

25 <210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 16  
ggacttcgag caagagatgg 20

35 <210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 17  
45 acatctgctg gaagtggtgac 20

<210> 18  
<211> 22  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

55 <400> 18  
aagtactccg tgtgtggatc gg 22

<210> 19  
<211> 20  
60 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

65 <400> 19

ggctctccag aacatcatcc 20

<210> 20  
<211> 18

5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

10 <400> 20  
ggagattcag tgtggtgg 18

<210> 21  
15 <211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 21  
gacatcaaga aggtggtgaa gcag 24

25 <210> 22  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 22

35 <210> 23  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 23

45 <210> 24  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 24

55 <210> 25  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 25

65 <210> 26  
<211> 16

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 26

<210> 27  
10 <211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 27

<210> 28  
20 <211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 28

**REIVINDICACIONES**

1. Ácido nucleico antisentido capaz de hibridarse con un ácido nucleico que codifica a una proteína CRMP, o anticuerpo anti-CRMP, para su utilización en el tratamiento de una patología que implica un disfuncionamiento de los linfocitos T, seleccionándose dicha patología de entre:
- 5 - las enfermedades de priones;
- las enfermedades neuroinflamatorias desmielinizantes; y
- la esclerosis en placas.
2. Ácido nucleico antisentido o anticuerpo anti-CRMP para su utilización según la reivindicación 1, en la cual la proteína CRMP es CRMP2 o CRMP5.
- 10 3. Método de cribado *in vitro* de moléculas útiles para el tratamiento de enfermedades de priones, en la cual se ponen en contacto una molécula a verificar con una proteína prión PrP y una proteína CRMP, y se evalúa la capacidad de la molécula para inhibir la interacción de la CRMP, o de un dímero de CRMP, con la proteína PrP, siendo una acción inhibitoria de esta interacción indicativa de una molécula útil para el tratamiento de enfermedades de priones.
- 15 4. Método *in vitro* de pronóstico y/o de diagnóstico de una patología ligada a un disfuncionamiento del sistema inmunitario, comprendiendo el método la puesta en evidencia en células del sistema inmunitario extraídas de un paciente, de una expresión o localización anormal de una proteína CRMP con respecto a células de control, en la cual dichas células del sistema inmunitario son unos linfocitos, seleccionándose dicha patología de entre:
- a. Las enfermedades de priones;
- 20 b. La esclerosis en placas;
- c. y las enfermedades neuroinflamatorias desmielinizantes.
5. Método según la reivindicación 4, siendo dicha patología la esclerosis en placas.
6. Método según la reivindicación 4, siendo dicha patología una enfermedad neuroinflamatoria desmielinizante.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el cual la proteína CRMP es CRMP2 o CRMP5.
- 25 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el cual la expresión o la localización anormal de la proteína CRMP está asociada a una fosforilación modificada de la proteína CRMP con respecto a células de control, y en la cual la proteína CRMP es CRMP2.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el cual la puesta en evidencia de una expresión o localización anormal de la proteína CRMP se realiza con ayuda de anticuerpos anti-CRMP.
- 30 10. Método según la reivindicación 9, en el cual dicho anticuerpo anti-CRMP es un anticuerpo dirigido contra un péptido de secuencia SEQ ID No 24, SEQ ID No 28 o SEQ ID No 27.

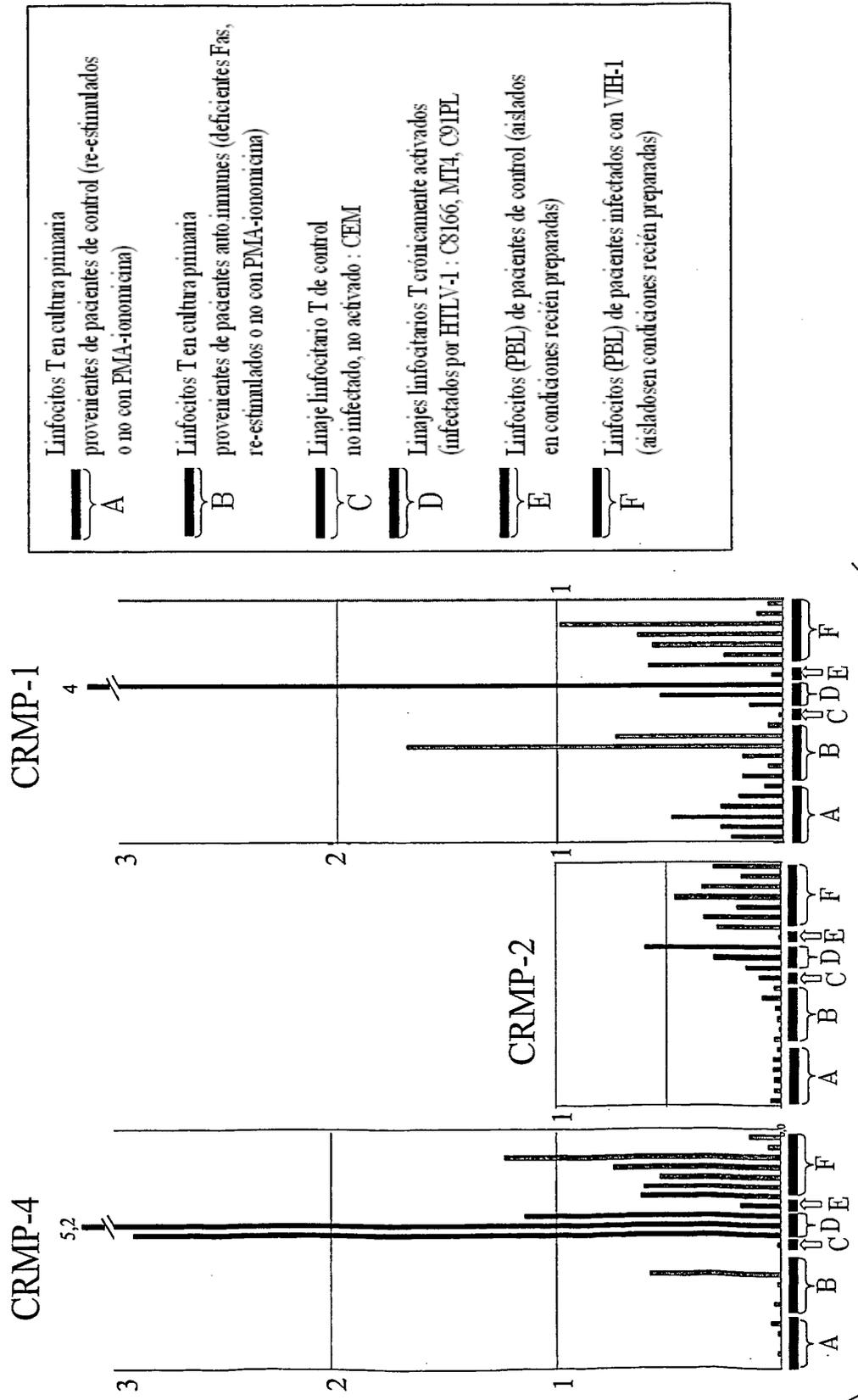
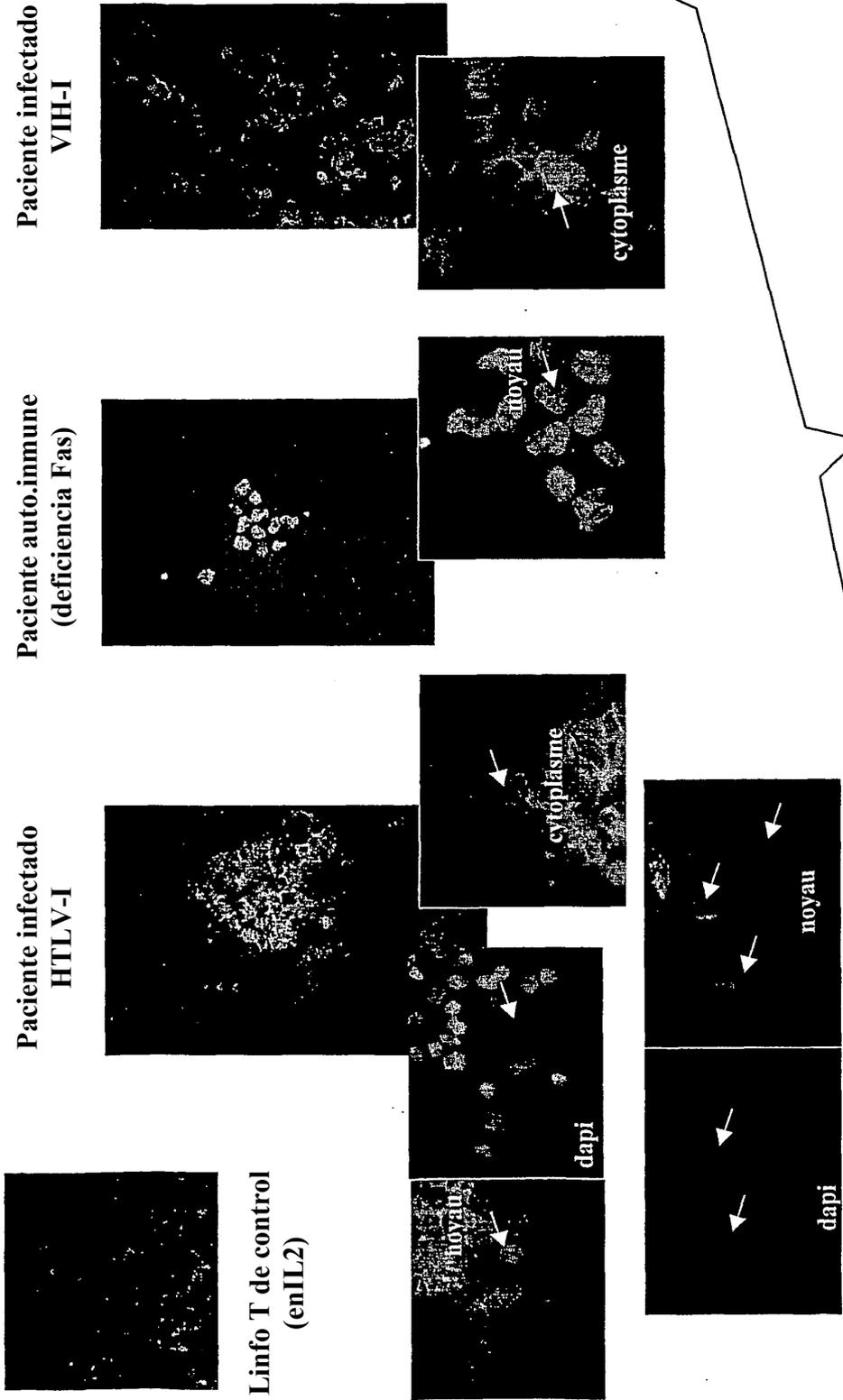
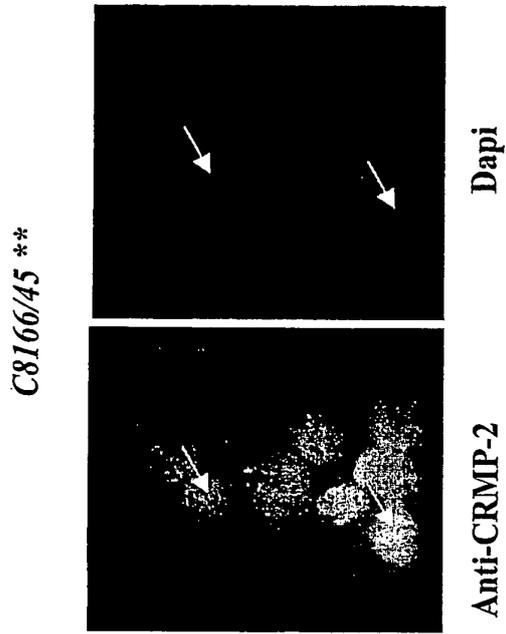


FIG.1

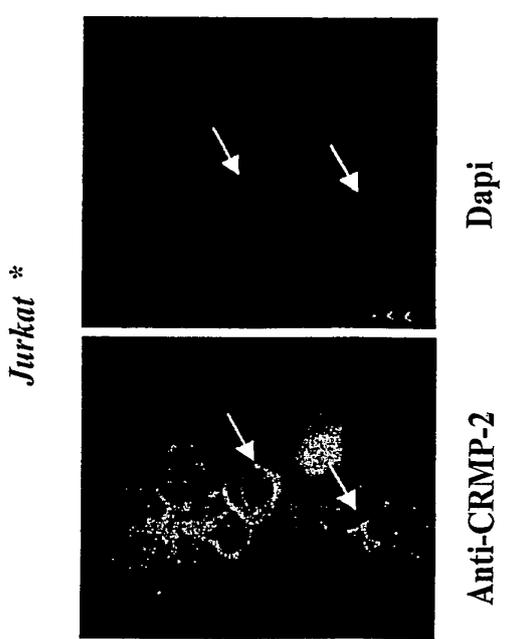




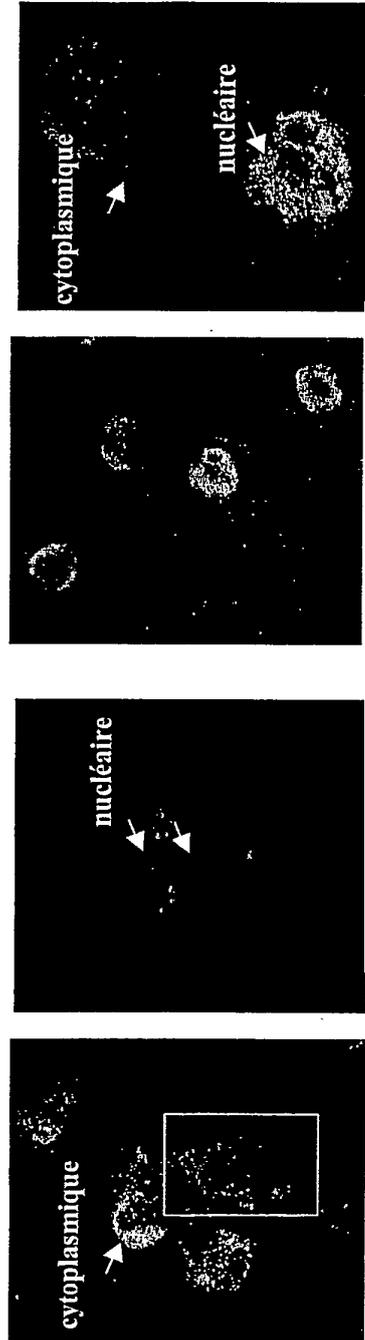
**FIG.3**



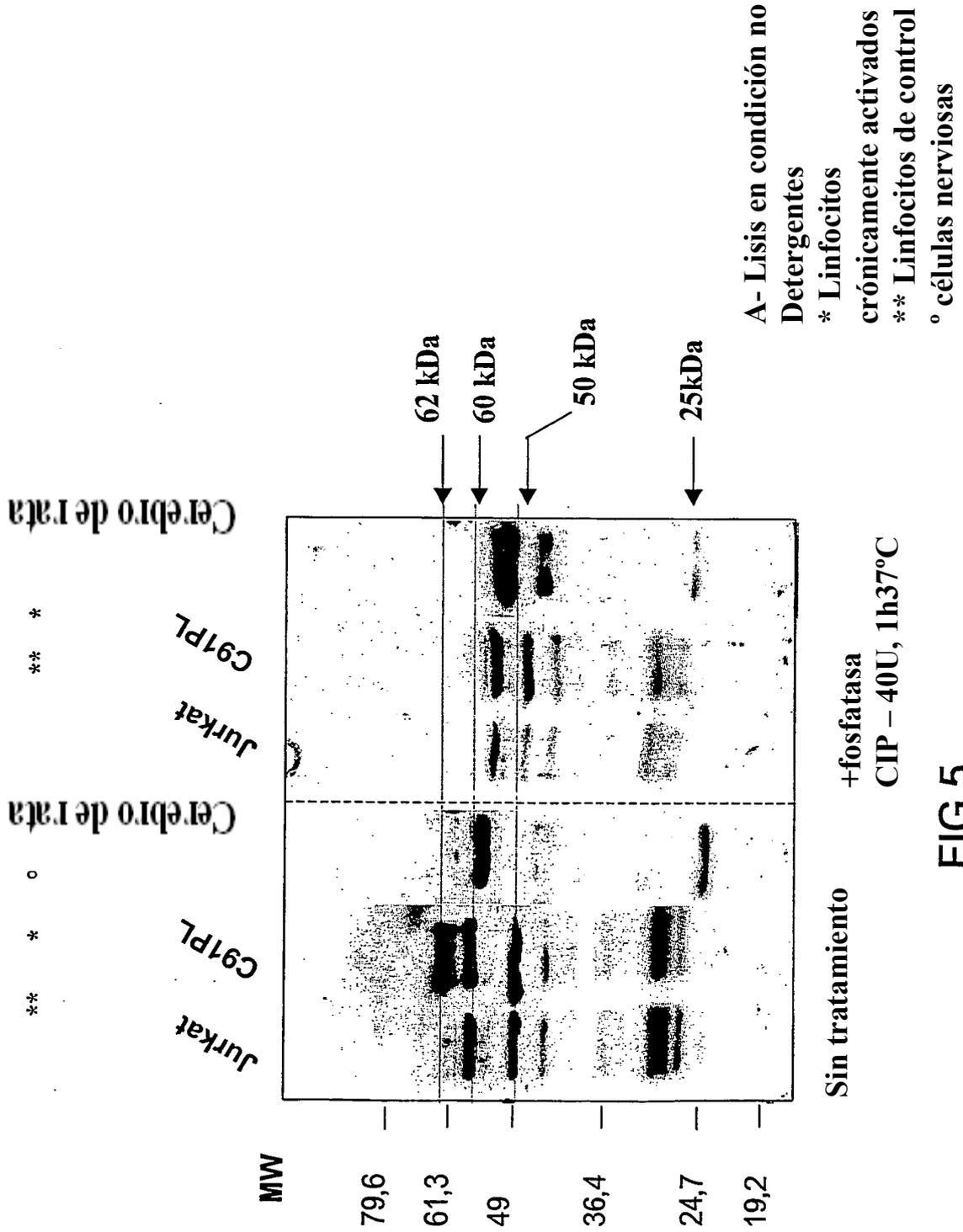
**FIG.4a**



**FIG.4b**



Superposición de las vistas → 1 vista en sección → 1 vista en sección



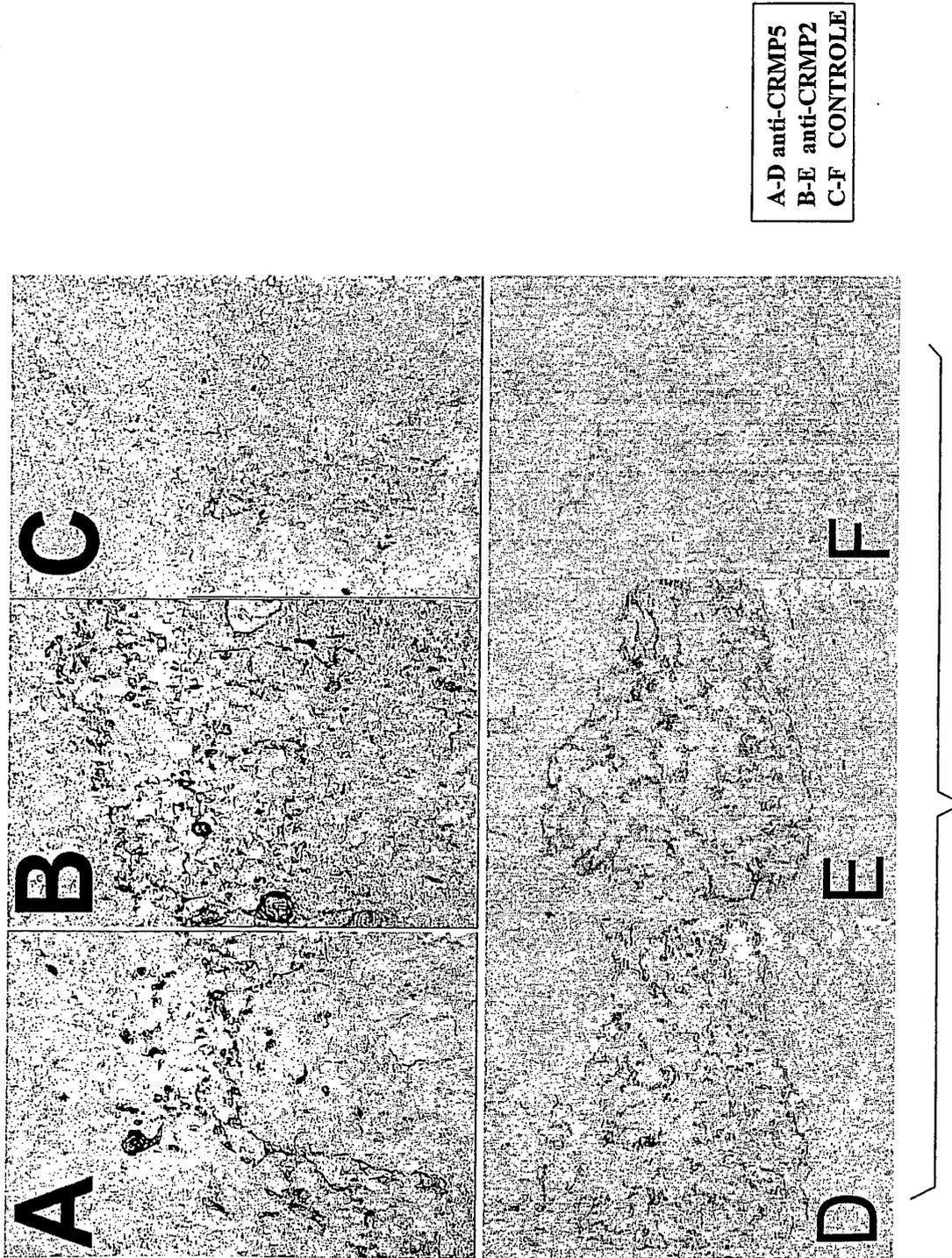


FIG.6

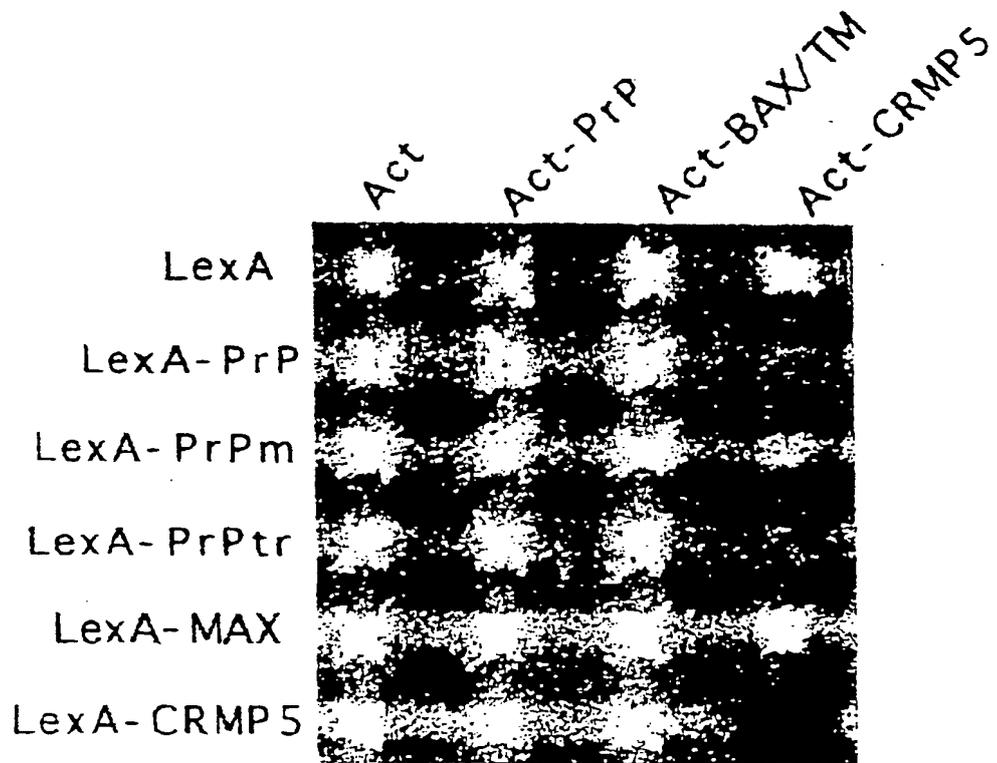


FIG.7

Secuencia de los péptidos para la obtención de los AC anti-Ulip

```

CRMP4      MSYQGKKNIPRITSDRLLIKGGRIVNDQSFYADIYMEDGLIKQIGDNL
CRMP2      MSYQGKKNIPRITSDRLLIKGGKIVNDQSFYADIYMEDGLIKQIGENLI
CRMP1      MSYQGKKSIPHITSDRLLIKGGRIINDDQSLYADVLEDGLIKQIGENLI
CRMP3      MSFQGGKKSIPRITSDRLLIRGGRIVNDQSFYADVHVEDGLIKQIGENLI
CRMP5      M-----LANSASVRLIKGGKVNDCTHEADVYIENGIQQVGRELM
          * . . . . . * * * * * . . . . . * * * * * . . . . .

CRMP4      VPGGVKTEIANGKMVIPGGIDVHTHFQMPYKGMTTVDFFQGTKAALAGG
CRMP2      VPGGVKTEIAHSRMVIPGGIDVHTRFQMPDQGMTSADDDFFQGTKAALAGG
CRMP1      VPGGVKTEIANGRMVIPGGIDVNTYLQKPSQGMTAADDDFFQGTAAALVGG
CRMP3      VPGGIKTIDAHGLMVLPGGVDVHTRLQMPVLGMTPADDDFCQGTKAALAGG
CRMP5      IPGGAKVIDATGKLVIPGGIDTSTHFHQTFMNATCVDDFYHGTKAALVGG
          . * * * * * * * * * * . * * * * * * * * * *

CRMP4      TTMIIDHVPEPESSLTEAYEKWREWADGKSCCDYALHVDITHWNSVKQ
CRMP2      TTMIIDHVPEPGTSLLAAFDQREWADSKSCCDYSLHVDISEWHKGIQE
CRMP1      TTMIIDHVPEPGSSLLTSFEKWEAADTKSCCDYSLHVDITSWYDGVRE
CRMP3      TTMIIDHVFPDGTGVSLLAAYERWRERADSACCDDYSLHVDITRWHESIKE
CRMP5      TTMIIGHVLPDKETSLVDAYEKCRGLADPKVCCDYALHVGITWWAPKVK
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CRMP4      EVQNLIKDKGVNSFMVYMAKDLQVSNTELYEIFTCGELGAIQAQVHAE
CRMP2      EMEALVKDHGVNSFLVYMAFKDRFQLTDCQIYEVLSVIRDIGAIQAQVHAE
CRMP1      ELEVLVQDKGVNSFQVYMAKDVYQMSDSQLYEAFFLKGLGAVILVHAE
CRMP3      ELEALVKEKGVNSFLVYMAKDRCCQSDSQMYEIFSIRDLGALQAQVHAE
CRMP5      EMETLVREKGVNSFQMFMTYKDLMLRDSELYQVLHACKDIGAIARVHAE
          * . . . . * * * * * . . . . . * * * * * . . . . .

CRMP4      NGDIIAQEQTRMLEMGITGPEGHVLSRPEELEAEAVFRAITIASQTNCP
CRMP2      NGDIIAEEQQRILDLGITGPEGHVLSRPEEVEAEAVNRAITIANQTNCP
CRMP1      NGDIIAQEQKRILEMGITGPEGHLSRPEELEAEAVFRAITTAGRINCPV
CRMP3      NGDIVEEEQKRILLELGITGPEGHVLSHPPEEVEAEAVYRAVTIAKQANCP
CRMP5      NGELVAEGAKEALDLGITGPEGIEISRPEELEAEATHRVTIANRTHCPI
          * * . . . . * * * * * * * * * * * * * * * *

CRMP4      YVTKVMSKSAADLISQARKKGNVVFGEPI TASLGDGTHYWSKNWAKAAA
CRMP2      YITKVMSKSSAEVIAQARKKGTVVYGEPI TASLGTGSHYWSKNWAKAAA
CRMP1      YITKVMSKSAADIIALARKKGPLVFGEP I AASLGTGTHYWSKNWAKAAA
CRMP3      YVTKVMSKGAADAIQAQRKRGVVVFGEPI TASLGTGSHYWSKNWAKAAA
CRMP5      YLVNVSSISAGDVIAAAKMQGKVLAETTTAHTLTGLHYHQDWSHAAA
          * . . . * * . . . . * * * * * * * * * * * * * * * *

CRMP4      FVTSPPSPDPTTDPYINSLASGDLQLSGSAHCTFSTAQKAIGKDNFTA
CRMP2      FVTSPPSPDPTTDFLNSLLSCGDLQVTGSAHCTFNSTAQKAVGKDNFTL
CRMP1      FVTSPPSPDPTTDPYLTSLACGDLQVTGSGHCPYSTAQKAVGKDNFTL
CRMP3      FVTSPPVNPDPPTTADHLTCLLSGDLQVTGSAHCTFSTAQKAVGKDNFAL
CRMP5      YVTVPPLRLDTNTSTYLMSSLANDTLNIVASDHRPFTTKQKAMGKEDFTK
          . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CRMP4      IPEGTNGVEERMSVIWDKAVATGKMDENQFVAVTSTNAAKIFNLYPRKGR
CRMP2      IPEGTNGTEERMSVIWDKAVVTGKMDENQFVAVTSTNAAKVFNLYPRKGR
CRMP1      IPEGVNGIEERMTVVWDKAVATGKMDENQFVAVTSTNAAKIFNLYPRKGR
CRMP3      IPEGTNGIEERMSMVWEKCVASGKMDENEFVAVTSTNAAKIFNLYPRKGR
CRMP5      IPHVSGVQDRMSVIWERGVVGGKMDENRFVAVTSSNAAKLLNLYPRKGR
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

**FIG.8 (Principio)**

```

CRMP4      ISVGS DSDLVIWDPDAVKIVSAKNHQSAAEYNI FEGMELRGAPLVVICQG
CRMP2      IAVGSDADLVIWDPDSVKTISAKTHNSSLEYNIFEGMECRGSPLVVISQG
CRMP1      IAVGSDADVVIWDPDKLKTITAKSHKSAVEYNI FEGMECHGSPLVVISQG
CRMP3      VAVGSDADLVIWNPKATKII SAKTHNLNVEYNI FEGVECRGAPAVVISQG
CRMP5      IIPGADADVVDPEATKTISASTQVQGGDFNLYENMRCHGVPLVTISRG
          . * . * . * . * . * * . . . . * . . * * * * . *

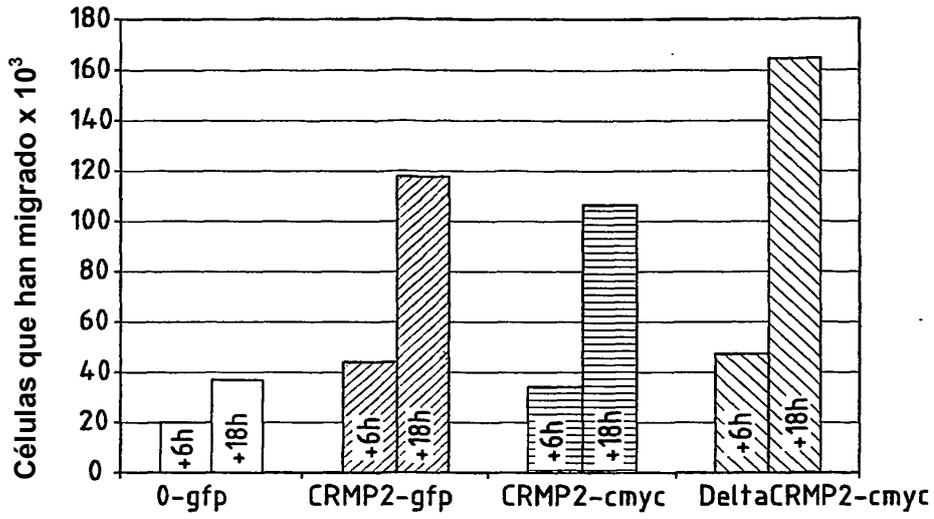
CRMP4      KIMLEDGNLHV TQAGRFIPCS PFSDYVYKRIKARRKMADLHAVPRGMYD
CRMP2      KIVLEDGTLHVTEGSGRYIPRKPFDFVYKRIKARSRLAELRGVPRGLYD
CRMP1      KIVFEDGNINVNKGMRFI PRKAFPEHLYQRVKIRNKVFLQGVSRGMYD
CRMP3      RVALEDGKMFVTPGAGRFVPRKTFPFDVYKRIKARNRLAEIHGVPRGLYD
CRMP5      RVVYENGVMCAE GTGKFCPLRSFPD TVYKLVQREKTLKVRGVDRTPYL
          . . * . * * * . * . . * . . . * . . . * * * *

CRMP4      GPVFDLTTTPKG--GTPAGSARGSPTRPN-PPVRNLHQSGFSLSGTQVDE
CRMP2      GPVCEVSVTPKT--VTPASSAKTSPAKQQAPPVRNLHQSGFSLSGAQIDD
CRMP1      GPVYEV PATPKY--ATPAPSAKSSPSKHQPPPIRNLHQSNFSLSGAQIDD
CRMP3      GPVHEVMVPAKP--GSGAPARASC PGKISVPPVRNLHQSGFSLSGSQADD
CRMP5      GDVAVVVHPGKKEMGTPLADTPTRPVTRHGG-MRDLHESSFSLSGSQIDD
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

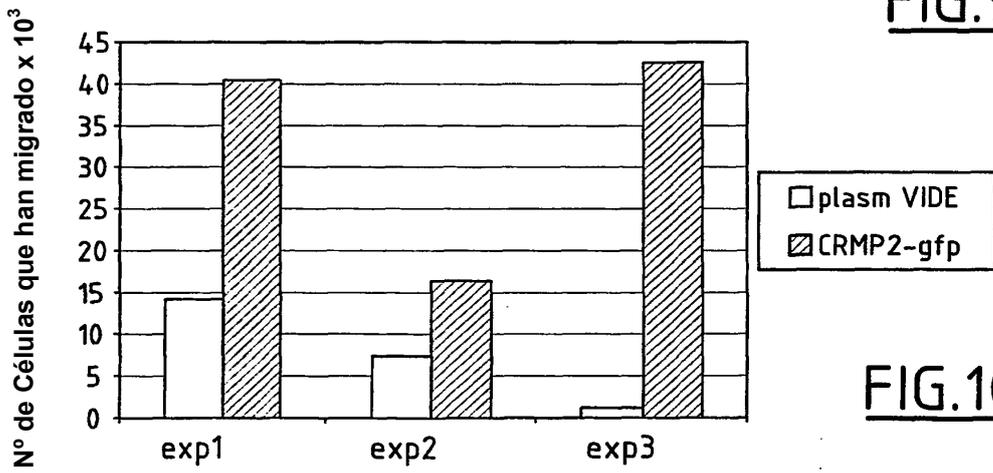
CRMP4      GV-RSASKRIVAPPGGRSNITSLS
CRMP2      NIPRRTTORIVAPPGGRANITSLG
CRMP1      NNPRRTGHRIVAPPGGRSNITSLG
CRMP3      HIARRTAQKIMAPPGGRSNITSLS
CRMP5      HVPKRASARILAPPGRSS--GIW
          . . * . * * * * * . . .
    
```

- LTSFEKWHEAADTKS : CRMP1 = peptide 6
- ITGPEGHVLSRPEEVĒ : CRMP2 = peptide 3
- LEDGTLHVTEGS : CRMP2 = peptide 4
- GSARGSPTRPN : CRMP4 = peptide 7
- MVPAKPGSGAPARASC : CRMP3 = peptide 8
- KEMGTPLADTPTRPVTRHGG : CRMP5 = peptide 5
- IVAPPGGRANITSLG : CRMP2 C-terminal = peptide 9

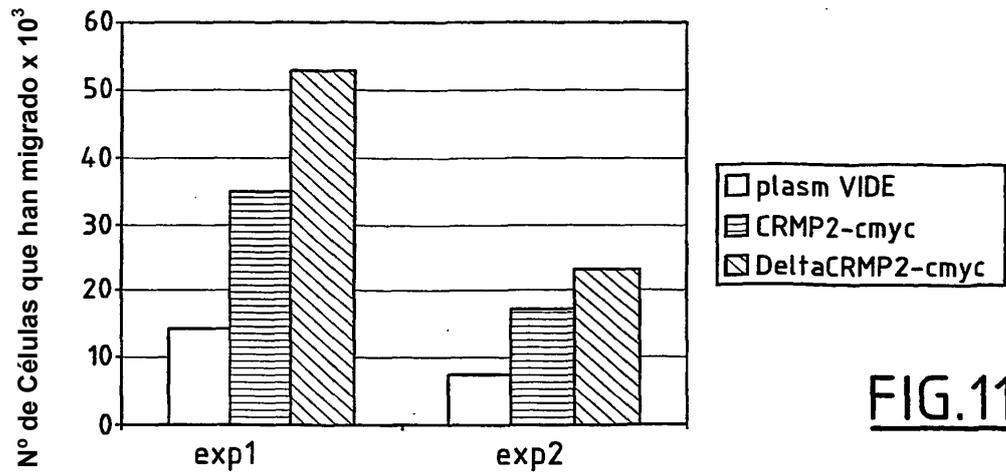
**FIG.8 (Final)**



**FIG.9**



**FIG.10**



**FIG.11**