

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 344**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

**C07K 14/72** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2004** E 10196615 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016** EP 2322637

54 Título: **Ratón transgénico que comprende un polinucleótido que codifica C5aR humano o humanizado**

30 Prioridad:

**24.12.2003 AU 2003907150**

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

**24.10.2016**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)  
Novo Allé  
2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**MACKAY, CHARLES REAY**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 587 344 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

Ratón transgénico que comprende un polinucleótido que codifica C5aR humano o humanizado

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a ratones transgénicos que comprenden un polinucleótido que codifica un C5aR humano o humanizado. La invención también se refiere al uso de los ratones transgénicos en métodos de escrutinio de agonistas, agonistas inversos y antagonistas de C5aR humano y para analizar la eficacia de agonistas, agonistas inversos y antagonistas de C5aR en diversos modelos de enfermedad en ratón.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La proteólisis de cada una de las proteínas del complemento C3-C5 da lugar a fragmentos catiónicos amino-terminales con moléculas de señalización denominadas anafilatoxinas. La más potente de ellas, C5a, provoca las respuestas más amplias. Teniendo en cuenta los componentes de la respuesta inflamatoria, tales como la margina- ción y la infiltración de leucocitos, la liberación de enzimas proteolíticas unidas a gránulos, la producción de radicales obtenidos a partir de oxígeno y nitrógeno activo, los cambios en el flujo sanguíneo y la fuga capilar, junto con la capacidad de contraer el músculo liso, la molécula C5a es el mediador proinflamatorio "completo". A niveles de sub-  
15 nanomolar a nanomolar, la molécula C5a provoca quimiotaxis de todos los linajes mieloides (neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos y monocitos) y causa permeabilidad vascular que está muy potenciada por las prostaglandi- nas y los leucocitos circulantes. Concentraciones nanomolares más elevadas provocan desgranulación y activación de la NADPH-oxidasa. Esta amplitud de la bioactividad contrasta con otros mediadores inflamatorios. C5a ha sido implicada en la patogénesis de artritis reumatoide, psoriasis, septicemia, lesión por reperfusión y síndrome de dificul-  
20 tad respiratoria en adultos.

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

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

35 Los agonistas de C5aR son útiles para fines terapéuticos, por ejemplo, como defensa contra una infección bacteria- na, para estimular los efectos inmunorreguladores de C5a y para tratar cánceres, enfermedades de inmunodeficien- cia e infecciones graves.

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

Actualmente, son deseables agonistas y antagonistas de C5aR alternativos y/o mejorados, puesto que hay métodos mejorados para el escrutinio de agonistas y antagonistas de C5aR.

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

55 Mukherjee et al.: J. Neuroimmunol. (2000) 105, 124-130 y Mukherjee et al. Abstracts of The Society For Neuroscien- ce, Society For Neuroscience, Washington, DC, US, vol. 26 n° 1/02,4 Noviembre 2000, página 859.14, describen ratones con el gen de C5aR desactivado.

- Gerard et al. Biochem. (1993) 32, 1993, 1243-1250, informan de la caracterización detallada de C5aR humano. Las estructuras artificiales recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica un C5aR humano y sus delecciones progresivas, se transfectaron en diferentes cultivos de células de mamífero humano y no humano, que expresaban o no un C5aR endógeno, para proporcionar un sistema modelo *in vitro* para el análisis del funcionamiento del gen de C5aR humano.
- Sumichika, H. Current Opinion in Investigational Drugs (2004) 5, 505-510, describe el escrutinio de antagonistas de C5aR humano para el tratamiento de la inflamación, usando un método de ensayo de unión a C5a humana sobre membranas de neutrófilos humanos (es decir, *in vitro*). Se expone la selectividad de especies de los ligandos de C5aR.
- Un requisito decisivo en el proceso de descubrimiento de fármacos es demostrar en modelos relevantes en animales que los nuevos agentes terapéuticos identificados por métodos de escrutinio *in vitro* son seguros y eficaces. Además, frecuentemente es deseable comparar la eficacia *in vivo* de numerosos agentes para seleccionar las propiedades deseables, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, la eficacia que afecta al resultado de una enfermedad y la falta de efectos secundarios adversos. Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de fármacos es que los fármacos candidatos pasen desde ensayos *in vitro* a la demostración de la eficacia *in vivo*. Frecuentemente esto se debe a que muchos fármacos candidatos son específicos de especie. Por ejemplo, un antagonista desarrollado para un receptor quimioatrayente humano, tal como el C5aR, podría antagonizar solamente al C5aR humano y no al C5aR de ratón, conejo o incluso de primates superiores. La incapacidad de muchos fármacos candidatos para "trabajar" a través de especies, es una razón principal para el desgaste en la fase preclínica.
- Por tanto, son deseables métodos mejorados de escrutinio que permitan la identificación y/o el análisis de agonistas, agonistas inversos y antagonistas de C5aR humano en un ambiente *in vivo*.

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

- Los presentes inventores han encontrado que cierto número de antagonistas de C5aR reaccionan con el C5aR humano, pero no lo hacen con el C5aR de otras especies. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales AcMo 7F3, AcMo 6C12 y AcMo 12D4 (descritos en el documento PCT/AU03/00084) se unen al C5aR humano pero no se unen al C5aR de ratón o babuino. Esto pone de manifiesto la necesidad de un sistema de escrutinio y validación *in vivo* que sea capaz de detectar y/o validar agonistas/antagonistas que son específicos del C5aR humano.
- Los presentes inventores también han encontrado que la quimiotaxis de células de muridos manipuladas por ingeniería genética para expresar el C5aR humano, es inhibida por anticuerpos anti-C5aR humano. Este hallazgo, asociado con el conocimiento de que C5a de murido se une al C5aR humano con una afinidad elevada, indica que el C5aR humano es compatible con la maquinaria de señalización de C5aR en otros sistemas de mamífero. Los presentes inventores han desarrollado por tanto un mamífero transgénico no humano que expresa un C5aR humano y es útil para escrutar o analizar agonistas/antagonistas de C5aR, particularmente los agonistas/antagonistas específicos del C5aR humano.
- En consecuencia, la presente invención proporciona un ratón transgénico que comprende y expresa un polinucleótido que codifica un C5aR humano o humanizado, en donde se ha dirigido la sustitución de la región que codifica C5aR del exón 3 endógeno del locus de ratón de C5aR, por una secuencia que codifica C5aR humano o humanizado correspondiente y en donde dicho C5aR humanizado difiere de C5aR de ratón codificado por dicho locus de ratón, en que los dominios extracelulares se sustituyen por dominios extracelulares correspondientes de C5aR humano.
- Por tanto, en una realización, el polinucleótido codifica C5aR humano. Preferiblemente, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia como la mostrada en SEQ ID NO: 3 o una de sus variantes alélicas.
- En una realización adicional, el polinucleótido comprende una secuencia como la mostrada en SEQ ID NO: 2 o una de sus variantes alélicas.
- En un aspecto adicional, el polinucleótido codifica C5aR humanizado que comprende dominios intracelulares de C5aR endógeno y dominios extracelulares de C5aR humano.
- En una realización preferida, el ratón transgénico tiene células somáticas y de líneas germinales que contienen, en una forma integrada de forma estable, un polinucleótido que codifica C5aR humano o humanizado. En otras palabras, se prefiere que el mamífero transgénico sea uno "con el gen activado" para C5aR humano o humanizado.
- La estructura artificial de polinucleótido que codifica un fragmento de C5aR humano está integrada dentro de la secuencia de C5aR endógeno, de tal modo que después de la integración, el sitio de C5aR endógeno comprende un polinucleótido que codifica C5aR humanizado.
- En otra realización preferida, el mamífero transgénico es homocigótico para C5aR humano o humanizado.
- La expresión de C5aR endógeno en el ratón transgénico es indetectable o insignificante. El ratón transgénico es un

homocigótico "desactivado" para C5aR endógeno.

5 En una realización preferida, la "desactivación" de C5aR endógeno tiene lugar simultáneamente a la introducción de C5aR humano o humanizado. Esto se consigue preferiblemente reemplazando la secuencia que codifica el C5aR endógeno o uno de sus fragmentos, por una secuencia correspondiente que codifica el C5aR humano o uno de sus fragmentos, por medio de recombinación homóloga dirigida a la diana. En una realización particular de la invención, dominios extracelulares de C5aR endógeno se reemplazan por los dominios humanos correspondientes.

10 Los ratones transgénicos de la presente invención pueden comprender otras alteraciones genéticas, además de la presencia de una secuencia que codifica el C5aR humano. Por ejemplo, el genoma del ratón transgénico se puede alterar para afectar a la función de genes endógenos, puede contener genes marcadores u otras alteraciones genéticas de acuerdo con los métodos de la presente invención.

15 La presente invención también proporciona un tejido aislado, un órgano aislado, célula(s) aislada(s), un cultivo celular primario o una línea celular establecida, obtenidos a partir del ratón transgénico de la invención, que comprenden y expresan un C5aR humano o humanizado y en donde dicho C5aR humanizado difiere de C5aR de ratón codificado por dicho locus de ratón, en que los dominios extracelulares están reemplazados por dominios extracelulares correspondientes de C5aR humano. Los órganos o tejidos preferidos incluyen musculatura lisa, tejido endotelial, musculatura contráctil y corazón.

La presente invención también proporciona un método según se reivindica, para producir un ratón transgénico de la invención.

20 El método comprende alterar el C5aR endógeno del mamífero no humano. Preferiblemente, el ratón transgénico es un homocigótico "desactivado" con respecto al C5aR endógeno.

En una realización preferida, el método comprende reemplazar la secuencia que codifica el C5aR endógeno o uno de sus fragmentos, por una secuencia que codifica el C5aR humano correspondiente o uno de sus fragmentos, por medio de una recombinación homóloga dirigida. En una realización particular de la invención, el método comprende reemplazar los dominios extracelulares de C5aR endógeno por los dominios humanos correspondientes.

25 La estructura artificial de polinucleótido puede comprender un marcador seleccionable. Se puede usar cualquier marcador seleccionable adecuado, aunque un marcador seleccionable preferido es el gen PGK-neo. Preferiblemente, el marcador seleccionable está flanqueado por sitios loxP, de modo que el marcador seleccionable se puede eliminar después de su actuación como diana mediante una expresión transitoria de la Cre recombinasa.

30 En un aspecto de la descripción, la estructura artificial de polinucleótido comprende regiones homólogas a las secuencias 3' y 5' que flanquean la secuencia que codifica el C5aR endógeno del mamífero no humano. Preferiblemente, la estructura artificial de polinucleótido comprende regiones homólogas de al menos 2 kb, más preferiblemente de aproximadamente 3 kb, aguas arriba y aguas abajo del exón del gen de C5aR endógeno.

35 Se apreciará que los ratones transgénicos de la presente invención serán útiles en la identificación, evaluación o validación de nuevos agonistas, agonistas inversos y antagonistas de C5aR. Por ejemplo, los ratones transgénicos de la presente invención se pueden usar para escrutar cierto número de compuestos candidatos, para identificar agonistas, agonistas inversos o antagonistas de la función de C5aR humano. Los ratones transgénicos de la presente invención se pueden usar también para evaluar la idoneidad terapéutica de agonistas, agonistas inversos o antagonistas de la función de C5aR humano que previamente han sido identificados en métodos de escrutinio.

40 Por consiguiente, la presente invención también proporciona un método para evaluar al menos un efecto farmacocinético y/o farmacodinámico de un compuesto candidato, comprendiendo el método administrar un compuesto candidato a un ratón transgénico de la presente invención o a un tejido o células aisladas a partir del mismo y examinar al menos un efecto farmacocinético y/o farmacodinámico del compuesto candidato en el ratón transgénico.

El al menos uno de los efectos farmacocinéticos examinados puede ser un parámetro de absorción, un parámetro de distribución, un parámetro de metabolismo o un parámetro de excreción.

45 Por ejemplo, el al menos uno de los efectos farmacocinéticos examinados puede ser volumen de distribución, aclaramiento total, unión a proteínas, unión a tejidos, aclaramiento metabólico, aclaramiento renal, aclaramiento hepático, aclaramiento biliar, absorción intestinal, biodisponibilidad, biodisponibilidad relativa, aclaramiento intrínseco, tiempo medio de permanencia, tasa máxima de metabolismo, constante de Michaelis-Menten, coeficientes de reparto entre tejidos y sangre o plasma, fracción excretada inalterada en orina, fracción de fármaco convertido sistémicamente en metabolitos, constante de la tasa de eliminación, semivida o aclaramiento de la secreción.

50 Para una mayor claridad y para ayudar en la comprensión del alcance completo de la presente invención, "efectos farmacocinéticos" se refiere al estudio de las cinéticas asociadas a los procesos dinámicos de un parámetro, tal como absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de un compuesto candidato y/o sus metabolitos en un organismo vivo. Tal y como se emplea en el contexto de la presente invención, los siguientes términos farmacocinéticos han de ser entendidos en sentido amplio y tendrán sus significados generalmente aceptados tal como se

exponen a continuación.

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

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

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

20 "Excreción" se refiere a la eliminación o pérdida final de un fármaco desde el cuerpo. La excreción incluye tanto una difusión pasiva como una excreción mediada por un vehículo específico relativo. Los compuestos candidatos pueden ser excretados, inalterados o en forma de metabolitos, en la orina a través de los riñones o en las heces a través de la bilis y/o el intestino. Los compuestos volátiles se excretan frecuentemente en el aire expirado por los pulmones. El parámetro farmacocinético de excreción se puede estimar a partir de datos de biosensores asociados con un chip sensor que tiene inmovilizado en él, por ejemplo, un anticuerpo que detecta específicamente el compuesto candidato, así como otras proteínas/receptores que tienen una alta afinidad/especificidad frente al fármaco candidato. Tales anticuerpos y proteínas/receptores se pueden usar para cuantificar la concentración/cantidad del fármaco en diferentes fluidos corporales (por ejemplo, orina/heces) y tejidos, usando un ensayo de unión directa.

25 En otro aspecto de la descripción, el método implica examinar al menos un efecto farmacodinámico del compuesto candidato en el ratón transgénico. Preferiblemente, el al menos un efecto farmacodinámico es la modulación de la actividad de C5aR. Esta se puede determinar vigilando al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR, después de la administración del compuesto candidato.

30 Por consiguiente, en otro aspecto la descripción proporciona un método para identificar un compuesto que modula la actividad de C5aR, que comprende (i) administrar un compuesto candidato a un ratón transgénico de la presente invención o un tejido o células aisladas obtenidas a partir del mismo, en donde se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR; y (ii) vigilar el desarrollo de al menos un fenotipo después de la administración del compuesto.

35 En un aspecto preferido, el método comprende además (iii) comparar la extensión del fenotipo en el ratón transgénico o las células obtenidas a partir del mismo, al que se administró el compuesto, en relación con la de un ratón de control o células obtenidas a partir del mismo, en donde cualquier diferencia en la naturaleza o la extensión del fenotipo cuando se compara con el ratón de control, indica el potencial del compuesto para modular la actividad de C5aR.

40 En un aspecto particular, la descripción proporciona un método para identificar un compuesto que inhibe o reduce la actividad de C5aR, comprendiendo el método (i) administrar un compuesto candidato a un ratón transgénico de la presente invención o un tejido o células aisladas obtenidas a partir del mismo, en condiciones en las que se expresa al menos un fenotipo asociado a la señalización de C5aR; y (ii) vigilar el desarrollo de al menos un fenotipo después de la administración del compuesto, en donde cualquier reducción o inhibición de la naturaleza o extensión del fenotipo después de la administración, indica el potencial del compuesto para inhibir o reducir la actividad de C5aR. Preferiblemente, el método comprende además (iii) comparar la extensión del fenotipo en el ratón transgénico al que se administró el compuesto, con la de un mamífero de control, en donde cualquier reducción o inhibición en la naturaleza o la extensión del fenotipo, cuando se compara con el ratón de control, indica el potencial del compuesto para inhibir o reducir la actividad de C5aR.

50 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para identificar un compuesto que favorece o potencia la actividad de C5aR, comprendiendo el método (i) administrar un compuesto candidato a un ratón transgénico de la presente invención o un tejido o células aisladas obtenidas a partir del mismo, en condiciones en las que se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR; y (ii) vigilar el desarrollo de al menos un fenotipo después de la administración del compuesto, en donde cualquier potenciación de la naturaleza o la extensión del fenotipo después de la administración, indica el potencial del compuesto para favorecer o potenciar la actividad de C5aR. Preferiblemente, el método comprende además (iii) comparar la extensión del fenotipo en el ratón transgénico al que se haya administrado el compuesto, en relación con un mamífero de control, en donde cualquier potenciación de la naturaleza o la extensión del fenotipo, cuando se compara con el mamífero de control, indica el potencial del com-

puesto para favorecer o potenciar la actividad de C5aR.

El ratón de "control" empleado en este contexto puede ser cualquier otro mamífero que expresa los mismos indicadores fenotípicos que los expresados en el ratón en el que se ha sometido a ensayo el compuesto (es decir, el ratón del "ensayo").

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

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

- 10 La expresión "fenotipo asociado con la señalización de C5aR" se entiende que incluye cualquier característica visible y/o comportamiento (incluyendo un síntoma clínico de una enfermedad) que está asociado con un proceso bioquímico que implica la señalización de C5aR. El fenotipo puede estar asociado con una señalización de C5aR normal o anómala. En un aspecto, el fenotipo es un estado que está agravado por la señalización de C5aR, tal como un trastorno complejo inmune, una enfermedad inflamatoria o alérgica, rechazo de injerto o cáncer. En otro aspecto, el fenotipo es un estado que se alivia o se reduce incrementando la señalización de C5aR, tal como un estado asociado a inmunosupresión.

- 15 En un aspecto particular, el fenotipo es inflamación. La inflamación se puede inducir, por ejemplo, mediante la transferencia de suero desde un mamífero K/BxN artrítico a un ratón transgénico de la invención.

En otro aspecto, el fenotipo es un daño tisular inflamatorio, tal como una lesión por isquemia-reperfusión.

En otro aspecto, el fenotipo es infiltración de leucocitos.

En otro aspecto, el fenotipo es asma.

- 20 En otro aspecto, el fenotipo es septicemia, ictus o síndrome de dificultad respiratoria.

- En otro aspecto, el fenotipo es una afección seleccionada a partir del grupo que consiste en enfermedades y afecciones inflamatorias o alérgicas, incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias, tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades pulmonares intersticiales (ILD) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociadas a artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); respuestas de anafilaxia o hipersensibilidad, alergias a fármacos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), alergias a picaduras de insectos; enfermedades intestinales inflamatorias, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; espondiloartropatías; esclerodermia; psoriasis y dermatosis inflamatorias, tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica por contacto, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea y por hipersensibilidad); enfermedades autoinmunes, tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes de comienzo juvenil, nefritis, tales como glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Behcet; rechazo de injerto (por ejemplo, en trasplantes), incluyendo rechazo de aloinjerto o enfermedad del injerto contra el huésped; aterosclerosis; cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos; lesión por reperfusión, ictus, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, ciertas enfermedades malignas hematológicas, toxicidad inducida por citocinas (por ejemplo, choque séptico, choque endotóxico), polimiositis, dermatomiositis, pénfigo, enfermedad de Alzheimer, enfermedades granulomatosas incluyendo sarcoidosis, síndromes de inmunodeficiencia, tal como SIDA, radioterapia, quimioterapia, terapia de enfermedad autoinmune u otra terapia con fármacos (por ejemplo, terapia con corticoesteroides), que provoca inmunosupresión; e inmunosupresión debida a deficiencia congénita o a enfermedades infecciosas, tales como el síndrome respiratorio agudo grave (SARS).
- 25  
30  
35  
40

- La gama de compuestos candidatos contemplados en esta memoria incluye compuestos inhibidores de C5aR o agonistas inversos o antagonistas de una función biológica de C5aR. En una realización, el compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste en: un péptido, incluyendo un péptido obtenido a partir de C5aR o C5a u otros péptidos que no son C5aR y son capaces de inhibir, reducir o reprimir una función de C5aR, un mutante dominante negativo de C5aR; un inhibidor no peptídico de C5aR; un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a C5aR e inhibe una función de C5aR; una molécula orgánica pequeña y un ácido nucleico, incluyendo un ácido nucleico que codifica dicho péptido obtenido a partir de C5aR o C5a u otro inhibidor peptídico que no es C5aR, un ácido nucleico antisentido dirigido contra el ARNm que codifica el C5aR o una ribozima anti-C5aR o un ARN interferente (ARNi) pequeño que dirige la expresión del gen de C5aR.
- 45

- 50 La presente descripción también proporciona un método para identificar un compuesto que modula la actividad de C5aR, comprendiendo el método:

- (a) administrar un compuesto candidato a un ratón transgénico de la presente invención o a un tejido o células aisladas obtenidas a partir del mismo en condiciones en las que se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR; y vigilar el desarrollo de al menos un fenotipo después de la administración del compuesto;
- 55

(b) opcionalmente, determinar la estructura del compuesto candidato; y

(c) proporcionar el compuesto candidato o el nombre de la estructura del compuesto candidato.

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

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "proporcionar el agente" se debe entender que incluye cualquier medio sintético químico o recombinante para producir dicho agente o, alternativamente, la disposición de un agente que ha sido sintetizado previamente por cualquier persona o medio.

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

15 Los diversos aspectos y realizaciones descritos en la presente memoria, a los que se hace referencia en los apartados individuales anteriores, se aplican, cuando sea adecuado, a otros apartados, cambiando lo que sea necesario. En consecuencia, los aspectos especificados en un apartado se pueden combinar con aspectos especificados en otros apartados, cuando sea adecuado.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

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

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

25 **Figura 5:** Análisis FACS que muestra que el C5aR humano se expresa en neutrófilos de ratones que son portadores del gen hC5aR. Se incubó sangre de ratones de tipo silvestre (+/+); heterocigóticos (H5Rf/+) y homocigóticos (H5Rf/H5Rf) con un anticuerpo 7F3 específico de C5aR humano conjugado con FITC. La zona de la derecha de la línea discontinua en el histograma de neutrófilos es la tinción positiva para 7F3-FITC.

30 **Figura 6:** Progreso de una enfermedad inflamatoria similar a AR en ratones homocigóticos para el gen C5aR humano activado y ratones de tipo silvestre. El panel de la izquierda muestra el aumento del grosor de los tobillos después de inyectar por vía i.p. suero de K/BxN los días 0 y 2. El panel de la derecha muestra la puntuación clínica. Los ratones n° 10 y n° 25 son homocigóticos para el gen C5aR humano, el ratón n° 38 es un compañero de camada de tipo silvestre. El engrosamiento de los tobillos y la enfermedad clínica se desarrollaron tanto en ratones de tipo silvestre como homocigóticos para el gen hC5aR en la forma típica descrita para este modelo (Lee et al. (2002) Science, 297, 1689-1692).

35

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

45

#### CLAVE PARA EL LISTADO DE SECUENCIAS

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

SEQ ID NO:2: Secuencia del ADNc de C5aR humano.

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

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

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

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

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

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

##### 5 Técnicas generales y definiciones

A no ser que se indique de otro modo, las técnicas de ADN recombinante utilizadas en la presente invención son métodos convencionales, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas están descritas y explicadas a través de las publicaciones científicas, en fuentes tales como: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (compilador), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (compiladores), ADN Cloning: A Practical Approach, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al. (compiladores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la fecha) y se incorporan en la presente memoria como referencia. En particular, estos documentos describen en detalle métodos para transcribir o replicar moléculas de ácido nucleico y las condiciones requeridas para ello.

##### Definiciones

A través de esta memoria descriptiva la palabra "comprenden" o variaciones, tales como "comprende" o "que comprende(n)", se entiende que implican la inclusión de un elemento establecido, un número entero o una etapa o un grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas.

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

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

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

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

Por "mamífero transgénico" se entiende un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, hámster, etc.), que tiene una secuencia de ácido nucleico no endógena (es decir, heteróloga) presente como un elemento extracromosómico en una porción de sus células o integrada de forma estable en su ADN de la línea germinal (es decir, en la secuencia genómica de la mayoría de sus células). El ácido nucleico heterólogo se introduce en la línea germinal de tales animales transgénicos mediante manipulación genética, por ejemplo, de embriones o células madre embrionarias del animal hospedador.

La expresión "biológicamente activo" o "funcional", cuando se usa en la presente memoria como un modificador de C5aR humano, se refiere a un polipéptido que muestra al menos una de las características funcionales atribuidas al C5aR humano natural, tal como la capacidad para actuar como receptor de C5a o para unirse a uno o varios ligandos naturales de C5aR humano.

Una "desactivación" de un gen (del inglés, "knock-out") significa una alteración en la secuencia del gen que da como resultado una disminución de la función del gen diana, preferiblemente de modo que la expresión del gen diana es indetectable o insignificante. Una desactivación de un gen endógeno significa que la función del gen ha disminuido sustancialmente, de modo que la expresión no es detectable o solo lo es a niveles insignificantes. Los animales transgénicos "desactivados" pueden ser animales transgénicos que tienen una desactivación heterocigótica de un gen o una desactivación homocigótica de un gen. Las "desactivaciones" incluyen también desactivaciones condicionales, en donde una alteración del gen diana puede ocurrir, por ejemplo, después de una exposición del animal a una sustancia que favorece la alteración del gen diana, la introducción de una enzima que favorece la recombinación en el sitio del gen diana (por ejemplo, Cre en el sistema Cre-lox), u otro método para dirigir la alteración del gen diana de forma posnatal.

Una "activación" de un gen diana (del inglés, "knock-in") significa una alteración en un genoma de una célula hospedadora que da como resultado una expresión alterada (por ejemplo, aumentada (incluyendo ectópica)) del gen diana, por ejemplo, mediante la introducción de una copia adicional del gen diana o mediante una inserción funcional de una secuencia reguladora que proporciona una expresión potenciada de una copia endógena del gen diana. Los animales transgénicos "activados" de interés para la presente invención son animales transgénicos que tienen una activación de un gen C5aR humano o humanizado. Tales animales transgénicos pueden estar activados de forma heterocigótica para el gen C5aR humano o humanizado o ser homocigóticos para la activación del gen C5aR humano o humanizado. Las "activaciones" también abarcan activaciones condicionales.

Por "estructura artificial" se entiende un ácido nucleico recombinante, generalmente ADN recombinante, que se ha generado con el fin de expresar una secuencia nucleotídica específica o que se va a emplear en la construcción de otras secuencias nucleotídicas recombinantes.

Por "ligada funcionalmente" se entiende una secuencia de ADN y una secuencia reguladora que están conectadas de tal modo que permiten la expresión del gen cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, las proteínas activadoras de la transcripción) están unidas a la secuencia reguladora.

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

La expresión "corresponde a" o "que corresponde a" significa homólogo a, o sustancialmente equivalente a, o funcionalmente equivalente a la secuencia designada.

La expresión "estructura artificial de gen transgénico" se refiere a una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un vector, que contiene el polinucleótido objeto, por ejemplo, el polinucleótido de C5aR humano o uno de sus fragmentos, ligado funcionalmente de un modo que es capaz de expresar el polinucleótido en una célula hospedadora. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido" incluye ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando es apropiado, ácido ribonucleico (ARN). Tal y como se usa en la presente memoria el término también incluye análogos de ARN o ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos, y cuando es aplicable para la realización que se describe, polinucleótidos monocatenarios (tales como sentido o antisentido) y bicatenarios.

#### Animales transgénicos

Los métodos para producir animales transgénicos son bien conocidos en la técnica. Un libro de texto general, útil para este tema es el de Houdebine, Transgenic animals - Generation and Use (Harwood Academic, 1997) que es una revisión amplia de las técnicas usadas para generar animales transgénicos desde peces hasta ratones y vacas. Los ratones transgénicos son de particular interés en el contexto de la presente invención.

Los avances en tecnologías para la micromanipulación de embriones permiten ahora la introducción de ADN heterólogo, por ejemplo, en óvulos de mamífero fertilizados. Por ejemplo, células madre totipotentes o pluripotentes se pueden transformar mediante microinyección, precipitación mediada por fosfato de calcio, fusión de liposomas, infección retroviral u otros medios, después las células transformadas se introducen en el embrión, y el embrión se desarrolla a continuación en un animal transgénico. En un método preferido, los embriones en desarrollo se transfectan con el ADN deseado mediante electroporación, y los animales transgénicos se producen a partir del embrión infectado. En otro método preferido, sin embargo, los ADNs apropiados se coinyectan en el pronúcleo o el citoplasma de embriones, preferiblemente en la etapa de una sola célula, y se permite que los embriones se desarrollen hasta animales transgénicos maduros. Estas técnicas son bien conocidas. Véanse las revisiones de métodos de laboratorio convencionales para la microinyección de ADNs heterólogos en óvulos de mamífero fertilizados, incluyendo Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Press 1986); Krimpenfort et al., Bio/Technology 9:844 (1991); Palmiter et al., Cell, 41: 343 (1985); Kraemer et al., Genetic manipulation of the Mammalian Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1985); Hammer et al., Nature, 315: 680 (1985); Wagner et al., documento de patente de EE.UU. nº 5.175.385; Krimpenfort et al., documento de patente de EE.UU. nº 5.175.384.

Otro método usado para producir un animal transgénico implica microinyectar un ácido nucleico en óvulos en la etapa pronuclear por métodos convencionales. Los óvulos inyectados se cultivan después, antes de transferirlos a

los oviductos de las receptorasseudopreñadas.

Los animales transgénicos también se pueden producir mediante tecnología de transferencia nuclear, como se describe en Schnieke, A.E. et al., 1997, Science, 278: 2130 y Cibelli, J.B. et al., 1998, Science, 280: 1256. Usando este método, fibroblastos de animales donantes se transfectan de forma estable con un plásmido que incorpora las secuencias codificadoras de un dominio de unión o una pareja de unión de interés, bajo el control de elementos reguladores. Los transfectantes estables se fusionan luego con los ovocitos enucleados, se cultivan y se transfieren a hembras receptoras.

El análisis de animales que pueden contener secuencias transgénicas se realizaría normalmente por PCR o análisis por transferencia Southern, siguiendo métodos convencionales.

A modo de ejemplo específico para la construcción de mamíferos transgénicos, tales como vacas, estructuras artificiales de nucleótidos que comprenden una secuencia que codifica un dominio de unión fusionado con GFP se microinyectan usando, por ejemplo, la técnica descrita en el documento de patente de EE.UU. n° 4.873.191, en ovocitos que se obtienen a partir de ovarios extirpados recientemente del mamífero. Los ovocitos se aspiran de los folículos y se dejan asentar antes de la fertilización con espermatozoides congelados, capacitados con heparina y fraccionados previamente mediante gradiente de Percoll para aislar la fracción móvil.

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

A continuación, se sincroniza el estro en los mamíferos receptores previstos, tales como ganado vacuno, administrando coprostanol. El estro se produce en los dos días siguientes y los embriones se transfieren a los receptores 5-7 días después del estro. La transferencia con éxito puede ser evaluada en la descendencia por transferencia Southern.

Alternativamente, las estructuras artificiales deseadas se pueden introducir en células madre embrionarias (abreviadamente células ES, por la expresión inglesa Embryonic Stem) y las células se cultivan para asegurar una modificación a través del transgén. Las células modificadas se inyectan luego en la etapa embrionaria de blástula y las blástulas se reemplazan en los hospedadores pseudopreñados. La descendencia resultante es quimérica con respecto a las células ES y las células hospedadoras, y se pueden obtener cepas no quiméricas que comprenden exclusivamente la progenie ES, usando reproducción cruzada convencional. Esta técnica está descrita, por ejemplo, en el documento WO91/10741.

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

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

La descendencia transgénica del hospedador de alquiler se puede escrutar para analizar la presencia y/o la expresión del transgén por cualquier método adecuado. El escrutinio se realiza frecuentemente mediante análisis de transferencia Southern o transferencia Northern, usando una sonda que sea complementaria a al menos una porción del transgén. Como método alternativo o adicional se puede emplear el análisis por transferencia Western que emplea un anticuerpo contra la proteína codificada por el transgén, para escrutar la presencia del producto del transgén. En los ratones transgénicos, el ADN se prepara normalmente a partir de tejido de la cola y se analiza por

5 análisis Southern o PCR en busca del transgén. Alternativamente, se analizan los tejidos o las células que se cree que expresan el transgén a nivel más elevado para determinar la presencia y la expresión del transgén usando análisis Southern o PCR, aunque algunos tejidos o tipos de células se pueden usar para este análisis. La progenie de los animales transgénicos se puede obtener apareando el animal transgénico con una pareja adecuada o por fertilización *in vitro* de óvulos y/o espermatozoides obtenidos a partir del animal transgénico.

Los métodos para producir ratones transgénicos a través de una recombinación homóloga entre el gen endógeno y una estructura artificial de transgén están descritos por Hanks, M et al. (Science 269: 679-682, 1995).

Estructuras artificiales de C5aR humano y humanizado

10 La estructura artificial de polinucleótido introducida puede codificar una secuencia de C5aR humano de tipo silvestre como la mostrada en SEQ ID NO:3 o una variante alélica.

Ejemplos no limitativos de variantes alélicas de SEQ ID NO:3 comprenden una o varias de las sustituciones siguientes:

Aminoácido nº 2: Asp>Asn

Aminoácido nº 279: Asn>Lys.

15 La estructura artificial de polinucleótido puede comprender una secuencia como la mostrada en SEQ ID NO:2, o una variante alélica de la misma.

Ejemplos no limitativos de variantes alélicas de SEQ ID NO:2 comprenden uno o varios de los siguientes cambios de bases:

Base nº 28: g>a

20 Base nº 474: c>t

Base nº 861: t>g

Base nº 1313-1314: inserción de a

Base nº 1447-1448: inserción de a.

25 En un aspecto preferido, la secuencia que codifica C5aR está ligada funcionalmente a un promotor, que puede ser una secuencia reguladora endógena o heteróloga, constitutiva o inducible y otras secuencias reguladoras necesarias para la expresión en el ratón hospedador.

Alternativamente, la estructura artificial introducida puede codificar C5aR humanizado que comprende dominios intracelulares de C5aR endógeno y dominios extracelulares de C5aR humano,

30 Los diversos dominios de C5aR humano que se pueden introducir en el C5aR humanizado se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1:

aminoácidos 1 - 37	dominio extracelular - extremo N-terminal
aminoácidos 38 - 60	dominio transmembranal
aminoácidos 61 - 71	dominio intracelular
aminoácidos 72 - 94	dominio transmembranal
aminoácidos 95 - 110	dominio extracelular - bucle extracelular 1
aminoácidos 111 - 132	dominio transmembranal
aminoácidos 133 - 153	dominio intracelular
aminoácidos 154 - 174	dominio transmembranal
aminoácidos 175 - 200	dominio extracelular - bucle extracelular 2
aminoácidos 201 - 226	dominio transmembranal
aminoácidos 227 - 242	dominio intracelular
aminoácidos 243 - 265	dominio transmembranal
aminoácidos 266 - 282	dominio extracelular - bucle extracelular 3
aminoácidos 283 - 303	dominio transmembranal

- Las estructuras artificiales de interés pueden contener ADNc, secuencias genómicas o ambos. Los métodos para aislar y clonar una secuencia deseada, así como estructuras artificiales adecuadas para la expresión de una secuencia seleccionada en un animal hospedador, son bien conocidos en la técnica. La estructura artificial puede incluir secuencias distintas de las secuencias que codifican C5aR. Por ejemplo, en la estructura artificial se puede incluir un gen marcador, tal como lac Z, en donde el aumento de la regulación de la expresión de la secuencia codificada dará como resultado un cambio en el fenotipo, fácilmente detectado.
- La expresión "gen C5aR" se usa generalmente con el significado de un gen C5aR humano e isoformas, formas alternativas, variantes por corte y empalme, variantes mutadas, etc. de este gen humano. Esta expresión también se entiende que significa el marco de lectura abierto que codifica polipéptidos específicos, intrones y secuencias de nucleótidos no codificadoras adyacentes a 5' y 3', implicadas en la regulación de la expresión, hasta aproximadamente 1 kb más allá de la región codificadora, pero posiblemente más lejos en cualquier dirección. La secuencia de ADN que codifica C5aR puede ser ADNc o ADN genómico o uno de sus fragmentos. El gen se puede introducir en un vector apropiado para el mantenimiento extracromosómico o para la integración en el hospedador.
- Las secuencias genómicas de particular interés comprenden el ácido nucleico presente entre el codón de iniciación y el codón de parada, incluyendo la totalidad de los intrones que normalmente se encuentran presentes en el cromosoma natural. Estas pueden incluir además regiones no traducidas en 3' y 5', encontradas en el ARNm maduro. Dichas secuencias pueden incluir además secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales específicas, tales como promotores, potenciadores, etc., incluyendo aproximadamente 1 kb, pero posiblemente más del ADN genómico flanqueante en el extremo 5' o 3' de la región transcrita. El ADN genómico se puede aislar como un fragmento de 100 kb o más pequeño; y está sustancialmente exento de secuencias cromosómicas flanqueantes.
- Las secuencias de las regiones 5' del gen C5aR humano, y las secuencias adicionales de regiones aguas arriba del extremo 5' y secuencias aguas abajo del extremo 3', se pueden utilizar para elementos promotores, incluyendo sitios de unión de potenciadores, que proporcionan una expresión en tejidos en donde se expresa normalmente el C5aR. La expresión específica en tejidos es útil para proporcionar promotores que mimetizan el modelo natural de expresión. Los polimorfismos que se presentan de forma natural en la región del promotor son útiles para determinar variaciones naturales en la expresión, particularmente las asociadas con una enfermedad. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones en la región del promotor para determinar el efecto de alterar la expresión en sistemas definidos experimentalmente. Los métodos para la identificación de motivos de ADN específicos, implicados en la unión de factores transcripcionales son conocidos en la técnica, por ejemplo, la similitud de secuencias con motivos de unión conocidos, estudios de retardo en geles, etc. Por ejemplo, véase Blackwell et al., (1995) *Mol. Med.* 1: 194-205; Mortlock et al. (1996) *Genome Res.* 6: 327-33; y Joulin y Richard-Foy (1995) *Eur. J. Biochem.* 232: 620-626.
- En un aspecto, los vectores adecuados para uso en la presente invención pueden comprender al menos un elemento de control de la expresión ligado funcionalmente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el C5aR humano. Los elementos de control de la expresión se pueden insertar en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Ejemplos de elementos de control de la expresión incluyen, pero sin limitación, el sistema lac, regiones de operador y promotor del fago lambda, promotores de levadura y promotores obtenidos a partir de polioma, adenovirus, retrovirus o SV40. El vector puede comprender adicionalmente elementos funcionales que incluyen, pero sin limitación, secuencias líder, codones de terminación, señales de poliadenilación y cualquier otra secuencia necesaria o preferida para la transcripción y/o traducción apropiadas de la secuencia de ácido nucleico que codifica el C5aR humano.
- En un aspecto preferido adicional, la estructura artificial comprende regiones homólogas a las secuencias de los extremos 3' y 5' que flanquean la secuencia codificadora de C5aR endógeno del mamífero no humano. Se entenderá que estas regiones de homología son útiles para la integración dirigida a una diana, de la estructura artificial en el locus de C5aR endógeno del mamífero transgénico.
- Preferiblemente, la estructura artificial de polinucleótido comprende regiones homólogas a al menos 2 kb, más preferiblemente a aproximadamente 3 kb, situadas aguas arriba y aguas abajo del exón 3 del gen de C5aR endógeno. Por ejemplo, las secuencias situadas aguas abajo y aguas arriba pueden proceder de la secuencia entre los nucleótidos 7377-15045 de SEQ ID NO: 1.
- Los expertos en la técnica entenderán que los vectores de este tipo se construyen usando una metodología convencional (Véase por ejemplo Sambrook et al., (compiladores) (1989) "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.; Ausubel et al., (compiladores) (1987) "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley and Sons, New York, N.Y.) o están comercialmente disponibles.
- En algunos aspectos, puede ser preferible expresar el C5aR humano en tejidos que imitan el modelo natural de expresión en seres humanos. Un modelo específico de expresión se puede conseguir colocando el ácido nucleico que codifica el C5aR humano bajo el control de un promotor inducible o regulado en el desarrollo o bajo el control de un promotor específico de tejido o específico de un tipo de célula. A modo de ejemplo, los modelos específicos de

expresión se pueden conseguir mediante el uso de secuencias genómicas para C5aR humano.

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

#### Desactivaciones y activaciones de genes

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

20 En una desactivación, preferiblemente la expresión del gen diana es indetectable o insignificante. Por ejemplo, una desactivación de un gen C5aR significa que la función del gen C5aR ha disminuido sustancialmente de modo que la  
expresión no es detectable o solamente está presente a niveles insignificantes. Esto se puede conseguir a través de  
una variedad de mecanismos, incluyendo la introducción de una interrupción de la secuencia codificadora, por ejem-  
25 plo, la inserción de uno o varios codones de parada, la inserción de un fragmento de ADN, etc., la delección de una  
secuencia codificadora, la sustitución de codones de parada para la secuencia codificadora, etc. En algunos casos  
las secuencias del transgén exógeno se delecionan finalmente del genoma, dejando un cambio neto en la secuencia  
natural. Para conseguir la "desactivación" se pueden usar diferentes métodos. Se puede inducir una delección cro-  
mosómica de todo el gen natural o parte del mismo, incluyendo delecciones de las regiones no codificadoras, particu-  
30 larmente la región del promotor, secuencias reguladoras en 3', potenciadores o delecciones de genes que activan la  
expresión de C5aR. También se puede conseguir una desactivación funcional mediante la introducción de una es-  
trutura artificial antisentido que bloquea la expresión de los genes naturales (por ejemplo, véase Li y Cohen (1996)  
*Cell* 85:319-329). Las "desactivaciones" también incluyen desactivaciones condicionales, por ejemplo, cuando la  
alteración del gen diana tiene lugar mediante una exposición del animal a una sustancia que favorece la alteración  
35 del gen diana, la introducción de una enzima que favorece la recombinación en el sitio del gen diana (por ejemplo,  
Cre en el sistema Cre-lox) u otro método para dirigir la alteración del gen diana de forma posnatal.

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

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

A través del uso de ratones transgénicos o células procedentes de los mismos, se pueden identificar ligandos o  
45 sustratos que modulan fenómenos asociados con la señalización de C5aR. Dependiendo del ensayo particular, se  
pueden usar ratones transgénicos completos de la presente invención o tejidos, órganos o células procedentes de  
los mismos. Las células se pueden haber aislado recientemente del ratón transgénico o se pueden inmortalizar en  
cultivo. Las células de particular interés proceden de tejidos, tales como musculatura lisa, endotelio, musculatura  
contráctil o corazón.

El término "compuesto" tal y como se usa en la presente memoria, describe cualquier molécula, por ejemplo, proteí-  
50 na, molécula pequeña, polinucleótido o producto farmacéutico, con la capacidad de impedir o suprimir los fenóme-  
nos moleculares y clínicos asociados con la señalización de C5aR.

Los compuestos candidatos incluyen numerosas clases químicas, aunque en una realización preferida son molécu-  
las orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más 50 y menos  
de aproximadamente 2.500 Dalton. Los compuestos candidatos comprenden preferiblemente grupos funcionales  
55 necesarios para una interacción estructural con proteínas, particularmente unión por puentes de hidrógeno, y nor-  
malmente incluyen al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los  
grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos comprenden frecuentemente estructuras carbonadas cíclicas  
o heterocíclicas y/o aromáticas o poliaromáticas, sustituidas con uno o varios de los grupos funcionales anteriores.

Los compuestos candidatos también se encuentran entre las biomoléculas que incluyen, pero sin limitación, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas y sus derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

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

El escrutinio también puede estar dirigido a compuestos farmacológicamente activos y sus productos químicos análogos.

15 El agente candidato se puede administrar al ratón transgénico de la invención (o a células procedentes del ratón transgénico) de cualquier modo deseado y/o apropiado para la administración del agente, para conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, el agente candidato se puede administrar mediante inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o directamente en el tejido en el cual se quiere conseguir el efecto deseado), oralmente o por cualquier otro medio deseable. Preferiblemente, el escrutinio *in vivo* implicará cierto número de  
20 animales que reciben cantidades y concentraciones variables del compuesto candidato (desde ausencia de compuesto hasta una cantidad de compuesto que se aproxima al límite superior de la cantidad que se puede administrar satisfactoriamente al ratón), y puede incluir la administración del agente en una formulación diferente. Los compuestos se pueden administrar solos o en combinaciones de dos o más, especialmente cuando la administración de una combinación de agentes puede dar como resultado un efecto sinérgico. El efecto de la administración del agente  
25 sobre el ratón transgénico se puede vigilar con una metodología convencional.

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

### 35 *Moléculas pequeñas*

Los compuestos candidatos incluyen numerosas clases químicas, aunque preferiblemente son moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2.500 Dalton. Los compuestos candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente unión por puentes de hidrógeno y normalmente incluyen al menos un  
40 grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los compuestos candidatos comprenden frecuentemente estructuras carbonadas cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o varios de los grupos funcionales anteriores. Los compuestos candidatos también se encuentran entre biomoléculas que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas y derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. De hecho, virtualmente cualquier molécula orgánica pequeña que sea potencialmente capaz de unirse a una molécula diana biológica, puede encontrar uso en la presente invención siempre que sea suficientemente soluble y estable en soluciones acuosas para ser analizada respecto a su capacidad para unirse a la molécula diana biológica.

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

### *Inhibidores peptídicos o proteínicos*

En otro aspecto, los compuestos candidatos son proteínas. Por "*proteína*" en este contexto se entiende al menos dos aminoácidos fijados covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. La proteína

puede estar constituida por aminoácidos de origen natural y enlaces peptídicos o estructuras peptidomiméticas sintéticas. Por tanto "aminoácido" o "residuo peptídico", tal y como se usan en la presente memoria, significan tanto aminoácidos naturales como sintéticos. Por ejemplo, homofenilalanina, citrulina y norleucina se consideran aminoácidos para los fines de la invención. "Aminoácido" también incluye residuos de iminoácidos, tales como prolina e hidroxiprolina. Las cadenas laterales pueden tener la configuración (R) o (S). En la realización preferida, los aminoácidos tienen la configuración (S) o (L). Si se emplean cadenas laterales no naturales, se pueden usar sustituyentes que no sean aminoácidos, por ejemplo, para impedir o retardar las degradaciones *in vivo*.

En un aspecto adicional preferido, los compuestos candidatos son proteínas naturales o fragmentos de proteínas naturales. Así, por ejemplo, se pueden usar extractos celulares que contienen proteínas o productos digeridos de forma aleatoria o dirigida, de extractos celulares proteínicos. De este modo se pueden preparar colecciones de proteínas procariontas y eucariotas. En esta realización son particularmente preferidas las colecciones de proteínas bacterianas, fúngicas, víricas y de mamífero, prefiriéndose estas últimas y siendo especialmente preferidas las proteínas humanas.

En otro aspecto preferido, los compuestos candidatos son péptidos con una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 aminoácidos, siendo preferidos los péptidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, y siendo particularmente preferidos los de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 aminoácidos. Los péptidos pueden ser materiales digeridos de proteínas naturales, péptidos aleatorios o péptidos "seleccionados". Por "aleatorizados" o equivalentes gramaticales, en la presente memoria se entiende que cada péptido consiste esencialmente en aminoácidos al azar. Puesto que generalmente estos péptidos aleatorios se sintetizan químicamente, pueden incorporar cualquier aminoácido en cualquier posición. El proceso sintético se puede diseñar para generar proteínas aleatorizadas para permitir la formación de la totalidad o la mayoría de las combinaciones posibles a lo largo de la longitud de la secuencia, formando de este modo una colección de compuestos proteínicos bioactivos candidatos aleatorizados.

La preparación y el escrutinio de colecciones químicas combinatorias son bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales colecciones combinatorias incluyen, pero sin limitación, colecciones de péptidos (véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. nº 5.010.175, Furka (1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487-493, Houghton et al. (1991) *Nature*, 354: 84-88). La síntesis de péptidos no es de ningún modo el único enfoque previsto y destinado al uso en la presente invención. También se pueden usar otros métodos químicos para generar una diversidad de colecciones químicas. Tales métodos químicos incluyen pero sin limitación: peptoides (documento de Publicación PCT nº WO 91/19735, 26 Dic. 1991), péptidos codificados (documento de Publicación PCT WO 93/20242, 14 Oct. 1993), bio-oligómeros al azar (documento de Publicación PCT WO 92/00091, 9 enero 1992), benzodiazepinas (documento de Patente de EE.UU. nº 5.288.514), diversómeros, tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al. (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568), peptidomiméticos no peptídicos con una estructura principal de beta-D-glucosa (Hirschmann et al., (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218), síntesis orgánicas análogas de colecciones de compuestos pequeños (Chen et al. (1994) *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661), oligocarbamatos (Cho, et al., (1993) *Science* 261:1303) y/o peptidil-fosfonatos (Campbell et al., (1994) *J. Org. Chem.* 59: 658). Véase, en general, Gordon et al., (1994) *J. Med. Chem.* 37:1385, colecciones de ácidos nucleicos, colecciones de péptidos y ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. nº 5.539.083), colecciones de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn et al. (1996) *Nature Biotechnology*, 14(3): 309-314), y el documento PCT/US96/10287), colecciones de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang et al. (1996) *Science*, 274: 1520-1522, y el documento de Patente de EE.UU. nº 5.593.853), y colecciones de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum (1993) *C&EN*, Ene 18, página 33, isoprenoides documento de Patente de EE.UU. nº 5.569.588, tiazolidinonas y metatiazanonas documento de Patente de EE.UU. nº 5.549.974, pirrolidinas documentos de Patente de EE.UU. nº 5.525.735 y 5.519.134, compuestos de morfolino documento de Patente de EE.UU. nº 5.506.337, benzodiazepinas documento de Patente de EE.UU. nº 5.288.514 y similares).

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

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

Los inhibidores proteicos o peptídicos también pueden ser mutantes dominantes negativos de C5aR. La expresión "mutante dominante negativo" se refiere a un polipéptido de C5aR que ha mutado desde su estado natural y que interacciona con una proteína con la que C5aR interacciona normalmente, impidiendo con ello que el C5aR endóge-

no natural forme la interacción.

#### *Anticuerpos anti-C5aR*

El término "anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria, incluye moléculas intactas, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv que son capaces de unirse a un determinante epitópico de C5aR. Estos fragmentos de anticuerpo conservan alguna capacidad para unirse selectivamente con su antígeno y se definen como sigue:

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

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

(3) F(ab')<sub>2</sub>, el fragmento de anticuerpo que se puede obtener tratando un anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos a través de dos puentes disulfuro;

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

(5) Anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), definido como una molécula manipulada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente.

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

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

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

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

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

Además se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos "humanizados" o quiméricos e incluyen combinar regiones variables de muridos con regiones constantes humanas (Cabili, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3273, 1984), o injertar las regiones determinantes de complementaridad (CDRs) de anticuerpos de muridos en el marco humano (Riechmann, et al., *Nature* 332:323, 1988).

#### *Compuestos antisentido*

La expresión "compuestos antisentido" incluye moléculas de ADN o ARN que son complementarias a al menos una porción de una molécula de ARNm diana (Izant y Weintraub, 1984; Izant y Weintraub, 1985) y son capaces de interferir con un evento postranscripcional, tal como la traducción de ARNm. Se prefieren los oligómeros antisentido complementarios a al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos del ARNm que codifica la diana, puesto que se sintetizan fácilmente y tienen menos probabilidad de causar problemas que las moléculas más grandes, cuando se introducen en la célula productora de ARNm diana. El uso de métodos antisentido es muy conocido en la técnica (Marcus-Sakura, 1988).

#### *Moléculas de ARN catalíticos*

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

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

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

Las ribozimas usadas en esta invención se pueden sintetizar químicamente usando métodos bien conocidos en la técnica. Las ribozimas también se pueden preparar a partir de una molécula de ADN (que después de la transcripción, proporciona una molécula de ARN) ligada funcionalmente a un promotor de ARN-polimerasa, por ejemplo, el promotor de la ARN-polimerasa de T7 o la ARN-polimerasa de SP6. Cuando el vector también contiene un promotor de ARN-polimerasa ligado funcionalmente a la molécula de ADN, la ribozima se puede producir *in vitro* mediante incubación con ARN-polimerasa y nucleótidos. En una realización distinta, el ADN se puede insertar en un casete de expresión o un casete de transcripción.

#### *dsARN*

El dsARN es particularmente útil para inhibir específicamente la producción de una proteína particular. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, Dougherty y Parks (1995) han proporcionado un modelo para el mecanismo por el cual el dsARN se puede usar para reducir la producción de proteínas. Este modelo se modificó y expandió por Waterhouse et al., (1998). Esta tecnología se basa en la presencia de moléculas de dsARN que contienen una secuencia que es esencialmente idéntica al ARNm del gen de interés. Convenientemente, el dsARN se puede producir en un solo marco de lectura abierto en un vector recombinante o una célula hospedadora, en donde las secuencias sentido y anti-sentido están flanqueadas por una secuencia no relacionada que facilita que se hibriden las secuencias sentido y anti-sentido para formar la molécula de dsARN, formando con la secuencia no relacionada una estructura de bucle. El diseño y la producción de moléculas de dsARN adecuadas dirigidas contra genes de interés está dentro de la capacidad de un experto en la técnica, considerando particularmente Dougherty y Parks (1995), Waterhouse et al., (1998), documentos WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029 y WO 01/34815.

Tal y como se emplea en la presente memoria, las expresiones "ARN de interferencia pequeño" y "ARNi" se refieren a ARN bicatenario (dsARN) homólogo que se dirige específicamente a un producto génico, dando como resultado un fenotipo nulo o hipomórfico. Específicamente, el dsARN comprende dos secuencias de nucleótidos procedentes del ARN diana y que tienen una autocomplementariedad, de tal modo que se pueden reasociar e interferir con la expresión de un gen diana, presumiblemente a nivel postranscripcional. Las moléculas de ARNi están descritas por Fire et al., (1998) y revisadas por Sharp (1999).

#### Fenotipos asociados con la señalización de C5aR

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

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

El fenotipo vigilado puede ser cualquier indicador de la señalización de C5aR, incluyendo los siguientes:

(a) enfermedades y afecciones inflamatorias o alérgicas, incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias, tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades intersticiales pulmonares (ILD) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociada

- 5 a artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); anafilaxia o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), alergias a picaduras de insectos; enfermedades inflamatorias intestinales, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; espondiloartropatías; esclerodermia; psoriasis y dermatosis inflamatorias, tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica por contacto, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea y por hipersensibilidad);
- (b) enfermedades autoinmunes, tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes de inicio juvenil, nefritis, tal como glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Behcet;
- 10 (c) rechazo de injertos (por ejemplo, en trasplantes), incluyendo rechazo de aloinjertos o enfermedad del injerto frente al hospedador;
- (d) aterosclerosis;
- (e) cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos;
- 15 (f) enfermedades o afecciones (incluyendo enfermedades o afecciones mediadas por C5aR), en las cuales se pueden tratar respuestas inflamatorias indeseables que han de ser inhibidas, incluyendo, pero sin limitación, lesión por reperfusión, ictus, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, ciertas enfermedades malignas hematológicas, toxicidad inducida por citocinas (por ejemplo, choque septicémico, choque endotóxico), poli-miositis, dermatomiositis, pénfigo, enfermedad de Alzheimer y enfermedades granulomatosas incluyendo sarcoidosis.
- 20 Otros fenotipos incluyen inmunosupresión, como en individuos con síndromes de inmunodeficiencia, tales como SIDA, individuos que reciben radioterapia, quimioterapia, terapia para enfermedades autoinmunes u otra terapia con fármacos (por ejemplo, terapia con corticosteroides), que provoca inmunosupresión; e inmunosupresión debida a deficiencia congénita en una función de los receptores u otras causas.
- 25 Están disponibles cierto número de modelos de inflamación *in vivo* y se pueden usar para inducir fenotipos adecuados asociados con C5aR en mamíferos transgénicos de la presente invención. Por ejemplo, la artritis reumatoide se puede evaluar usando un modelo animal (por ejemplo, ratón) de artritis inducida por colágeno (Trentham et al. (1977) J. Exp. Med. 146: 857-868), artritis inducida por suero de K/BxN (Kouskoff et al., (1996) Cell 187:811-822), artritis inducida por antígeno o artritis inducida por adyuvante (Pearson CM (1956) Proc. Soc. Exp. Biblo. Med. 91:95-101).
- 30 Otros ejemplos de modelos animales adecuados incluyen: modelo de septicemia con punción de ligadura cecal (CLP) (Huber-Lang, M. S., et al. (2002) Faseb J. 16(12): 1567-74); modelo de AR en rata (Woodruff, T. M., et al. (2002) Arthritis Rheum 46(9): 2476-85); modelo de septicemia en porcino (Mohr, M., et al. (1998) Eur. J. Clin. Invest. 28(3): 227-34); enfermedad pulmonar inducida por complejos inmunes; lesión pulmonar asociada a pancreatitis (Bhatia, M., et al. (2001) Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 280(5): G974-8); lesión pulmonar aguda; lesión renal por isquemia-reperfusión; artritis inducida por colágeno; y enfermedad experimental de las vías respiratorias (modelo similar al asma).
- 35 En otro ejemplo, se puede vigilar la infiltración de leucocitos después de una inyección intradérmica de un compuesto candidato (véase, por ejemplo, Van Damme, J. et al., J. Exp. Med., 176: 59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. et al., J. Exp. Med. 171: 2177-2182 (1990); Jose, P. J. et al., J. Exp. Med. 179: 881-887 (1994)). En una realización, se evaluaron histológicamente biopsias de la piel para estudiar la infiltración de leucocitos (por ejemplo, eosinófilos, granulocitos). Una disminución del grado de infiltración en presencia del compuesto candidato, en comparación con el grado de infiltración en ausencia del compuesto candidato, es indicativa de una inhibición de la señalización de C5aR.
- 40 Ejemplos de fenotipos preferidos se exponen brevemente a continuación.
- 45 *Enfermedades autoinmunes (incluyendo artritis reumatoide)*
- Las enfermedades autoinmunes afectan al 5-8% de la población. Los complejos inmunes (CI) tienen un papel esencial en la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis y vasculitis inmune. Aunque los CIs inician la reacción autoinmune, otros factores importantes que contribuyen a la gravedad de la enfermedad incluyen el sistema del complemento, los receptores de Fcγ y los neutrófilos. Ahora se conoce que la contribución principal del complemento a la inflamación por CI es a través de la señalización de C5aR. Los CIs activan tanto la vía clásica como la alternativa del complemento. La C5a, liberada mediante una escisión de C5 durante la activación del complemento, es un poderoso agente quimioatrayente de neutrófilos, monocitos y macrófagos. La C5a que se une al C5aR inicia una serie de episodios, incluyendo la activación de FcγR en los macrófagos (hiperregulación que activa FcγRIII y FcγRI e hiporregulación que inhibe el FcγRIIB), haciendo que se liberen más mediadores quimiotácticos (por ejemplo, quimiocinas CXC) y la posterior instrumentación de la respuesta inflamatoria.
- 55

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

### *Septicemia*

La septicemia es una enfermedad grave causada por una infección incontenible del torrente sanguíneo por bacterias productoras de toxinas. Se ha reconocido que el sistema inmune innato se puede alterar durante la septicemia, como se pone de manifiesto por la activación a gran escala de los sistemas inflamatorio, complemento y de coagulación, junto con la aparición de citocinas y quimiocinas en el plasma. Esta "tormenta de citocinas" tal como ha sido denominada, libera numerosos mediadores inflamatorios que contribuyen a una disfunción o insuficiencia multiorgánica y a la muerte.

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

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

Durante la septicemia en seres humanos, la activación no regulada del sistema del complemento da como resultado una generación excesiva de anafilatoxinas, especialmente C3a y C5a y una disfunción subsiguiente de los neutrófilos. En estados tardíos de la septicemia, los neutrófilos suprimen la respuesta quimiotáctica, disminuyen la liberación de enzimas, alteran el pH intracelular y producen un estallido respiratorio defectuoso (menor producción de especies reactivas con oxígeno, especialmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), conduciendo a una actividad bactericida reducida. Estos defectos han mostrado ser dependientes de C5a. Durante la septicemia experimental, los neutrófilos de la sangre tienen una capacidad muy disminuida para unirse a C5a, tienen respuestas quimiotácticas alteradas frente a C5a y una pérdida de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos defectos se pueden impedir en la septicemia inducida por la CLP, tratando los animales con anticuerpos anti-C5a. Este tratamiento reducía la bacteremia y mejoraba mucho la supervivencia. Esto indica que la septicemia induce una generación excesiva de C5a, lo cual, a su vez, conduce a graves defectos funcionales en los neutrófilos.

Los anticuerpos contra C5aR también pueden proteger de la muerte por septicemia en modelos de animales. Se ha mostrado que tanto la inmunoreactividad de C5aR como la expresión del ARNm están incrementadas en las células epiteliales de pulmón, riñón, hígado, corazón y timo en una fase temprana de la septicemia experimental. Ratones inyectados al comienzo de la CLP con anticuerpos contra C5aR, mostraron una supervivencia notablemente mejorada, cuando se compararon con animales que recibían IgG no específica. En ratones tratados con anti-C5aR, los niveles en suero de IL-6 y TNF-α y los recuentos bacterianos en diversos órganos, se habían reducido significativamente durante la CLP, cuando se comparaban con animales de control de CLP. Estos estudios mostraban que el bloqueo de C5aR es muy protector frente a un resultado letal de la septicemia.

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

### *Lesión por isquemia-reperfusión (IR)*

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

Las funciones relativas de C5a y el complejo de ataque a la membrana C5b-9 en la mediación de la lesión por IR parecen variar. En algunos modelos, C5a es el mediador determinante. Los antagonistas de C5aR protegen a los ratones y las ratas contra la lesión por IR en el intestino delgado y en los riñones (Heller et al., (1999) J. Immunol.

163(2): 985-94; Arumugam et al., (2003) *Kidney Int* 63(1): 134-42; Arumugam et al., (2002) *J. Surg. Res.* 103(2):260-7). En un modelo de lesión por IR miocárdica en ganado porcino, un antagonista de C5aR reducía marcadamente el tamaño del infarto (Riley et al., (2000) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 120(2): 350-8).

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

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

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

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

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

25 SDRA y LPA son síndromes que son el resultado de un edema e inflamación pulmonares. El desarrollo de SDRA/LPA está asociado con varios trastornos clínicos graves incluyendo la lesión pulmonar provocada por infección por neumonía, aspiración de contenidos gástricos, traumatismo, septicemia, pancreatitis aguda, sobredosis de fármacos y derivación cardiopulmonar. La septicemia es la causa principal del SDRA/LPA. Al igual que con la IR, la respuesta inflamatoria en LPA está asociada con el reclutamiento de grandes cantidades de neutrófilos y monocitos en los espacios aéreos distales de los pulmones. Moléculas proinflamatorias, tales como citocinas, radicales oxigenados y proteasas tienen una función y una inflamación excesiva puede empeorar el SDRA/LPA (Ware y Matthay (2000) *N. Engl. J. Med.* 342(18): 1334-49; Brower et al., (2001) *Chest* 120(4): 1347-67).

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

Estudios de pacientes con SDRA revelan que en las fases tempranas de la enfermedad, están presentes niveles elevados de IL-8 en el fluido BAL o en el fluido del edema pulmonar. Además, anticuerpos que neutralizan IL-8 reducían la lesión pulmonar en un modelo de conejos (Brower et al., (2001) *Chest* 120(4): 1347-67).

35 Para SDRA y LPA, bloquear el C5aR también puede ser un enfoque terapéuticamente viable. C5a es una potente molécula quimiotáctica y estimuladora de la liberación de citocinas. Los estudios descritos anteriormente que empleaban moléculas que antagonizaban C5a o C5aR, mostraron una reducción de la lesión en diversos modelos de inflamación.

#### Producción de compuestos identificados en los métodos de escrutinio de la invención

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

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

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

Alternativamente, el gel de polidimetil-acrilamida reticulado y funcionalizado se puede usar una vez hinchado y solvatado, usando DMF o un disolvente aprótico dipolar. Otros soportes en fase sólida conocidos por los expertos en la técnica, también se pueden usar para la síntesis de péptidos, tales como, por ejemplo, perlas obtenidas a partir de polietilenglicol, producidas mediante el injerto de polietilenglicol en la superficie de perlas de poliestireno inerte. Los soportes sólidos preferidos comercialmente asequibles incluyen PAL-PEG-PS, PAC-PEG-PS, KA, KR o TGR (Applied Biosystems, CA 94404, EE.UU.).

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

Durante la síntesis, el acoplamiento tiene lugar después de la eliminación de un grupo bloqueante sin una rotura de un enlace peptídico o de cualquier grupo protector fijado a otra parte del péptido. Adicionalmente, se requiere que el anclaje péptido-resina que protege el extremo C-terminal del péptido, esté protegido durante el proceso sintético hasta la escisión de la resina. Por consiguiente, mediante una selección acertada de  $\alpha$ -aminoácidos protegidos de forma ortogonal, se añaden aminoácidos en las posiciones deseadas a un péptido en crecimiento mientras que todavía está anclado a la resina.

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

Los grupos protectores de las cadenas laterales variarán para las cadenas laterales funcionales de los aminoácidos que forman el péptido que se sintetiza. Los grupos protectores de las cadenas laterales se basan generalmente en el grupo Bzl o el grupo tBu. Los aminoácidos que tienen alcoholes o ácidos carboxílicos en la cadena lateral se protegen como éteres de Bzl, ésteres de Bzl, ésteres de cHex, éteres de tBu o ésteres de tBu. La protección de la cadena lateral de los aminoácidos con Fmoc requiere grupos bloqueantes que sean idealmente estables frente a bases y lábiles frente a ácidos débiles (TFA). Se han descrito muchos grupos protectores diferentes para la síntesis de péptidos (véase *The Peptides*, Gross et al. compiladores, vol. 3, Academic Press, New York, 1981). Por ejemplo, el grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilfenilsulfonilo (Nd-Mtr) es útil para la protección de la cadena lateral de arginina, sin embargo, la desprotección de Arg(Mtr) requiere un tratamiento prolongado con TFA. Para proteger la cistina se usa cierto número de grupos lábiles frente a ácidos débiles (TFA, trifluoroacetato de talio (III)/TFA) o grupos lábiles estables frente al TFA, pero no frente al trifluoroacetato de talio (III)/TFA o grupos estables frente a ácidos débiles.

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

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

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

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

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

Los promotores típicos, adecuados para la expresión en virus de células eucariotas y células eucariotas incluyen el promotor tardío de SV40, el promotor temprano de SV40 y el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor IE de CMV (temprano inmediato de citomegalovirus) entre otros. Los vectores preferidos para la expresión en células de mamífero (por ejemplo, 293, COS, CHO, células 10T, células 293T) incluyen, pero sin limitación, el juego de vectores de pcDNA suministrado por Invitrogen, en particular pcDNA 3.1 marcador myc-His que comprende el promotor de CMV y que codifica un marcador de 6xHis y MYC en el extremo C-terminal; y el vector de retrovirus pSRatKneo (Muller et al., Mol. Cell. Biol., 11, 1785, 1991). El vector pcDNA 3.1 myc-His (Invitrogen) es particularmente preferido para expresar péptidos en una forma secretada en células 293T, en donde el péptido o la proteína expresada se pueden purificar exentos de proteínas de la misma especie, usando técnicas de afinidad convencionales que emplean una columna de níquel para fijar la proteína a través del marcador His.

Están disponibles públicamente una amplia gama de sistemas de hospedador/vector adicionales, adecuados para expresar péptidos y están descritos, por ejemplo, en Sambrook et al. (En: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

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

Las técnicas para sintetizar compuestos orgánicos pequeños variarán considerablemente dependiendo del compuesto, sin embargo, tales métodos serán bien conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, se usan programas informáticos para seleccionar elementos esenciales químicos, adecuados procedentes de compuestos conocidos, para producir una colección combinatoria. Por ejemplo, el método de formación de modelos QSAR (relación cuantitativa entre estructura y actividad) emplea regresiones o árboles de regresiones lineales de estructuras de compuestos para determinar la idoneidad. El programa informático de Chemical Computing Group, Inc. (Montreal, Canadá) usa datos experimentales de escrutinios de alta productividad de compuestos activos, así como inactivos, para crear un modelo QSAR probabilístico, el cual se usa subsiguientemente para seleccionar compuestos líder. El método QSAR binario se basa en tres propiedades características de compuestos que forman una "información identificadora" de la probabilidad de que un compuesto particular realice o no una función requerida: carga parcial, refractividad molar (interacciones de unión) y logP (lipofilidad de la molécula). Cada átomo tiene un área superficial en la molécula y tiene estas tres propiedades asociadas con él mismo. Se determinan todos los átomos de un compuesto que tienen una carga parcial en un cierto intervalo y se suman las áreas superficiales (información identificadora del área superficial de Van der Waals). Los modelos QSAR binarios se usan después para construir modelos de actividad o modelos ADMET, que se usan para construir una colección combinatoria. Por consiguiente, la información procedente de supresores y no supresores deseados, incluyendo compuestos líder identificados en los escrutinios iniciales, se puede usar para ampliar la lista de compuestos que se van a escrutar para identificar de este modo compuestos altamente activos.

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

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

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

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

#### **Ejemplo 1: Generación de una estructura artificial que se dirige a una diana para producir un ratón con el gen de C5aR humano activado**

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

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

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

Cuando la estructura artificial que se dirige a una diana se linealiza, el gen neo está flanqueado por dos regiones de

homología con el gen diana. La selección de las células usando fármacos (por ejemplo, G418) elimina la gran mayoría de células que no tienen incorporada de forma estable la estructura artificial.

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

10 Por esta razón, la estructura artificial que se dirige a una diana ilustrada en este ejemplo incluye sitios loxP que flanquean el gen PGK-neo, de modo que el marcador seleccionable se puede eliminar después de llegar a la diana mediante expresión transitoria de la Cre-recombinasa. Esto dejará un pequeño sitio loxP en el ADN genómico, pero la estructura artificial se puede manipular genéticamente de modo que éste se encuentre en una posición inocua (Figura 2). Aunque teóricamente hasta un sitio loxP podría causar alteraciones en la expresión de genes vecinos, hasta ahora no se ha informado de ninguno de tales casos. La eficacia de la recombinación de Cre procedente de la expresión transitoria descrita en las publicaciones, varía ampliamente desde ~2% hasta ~15%. Esta tasa se debe distinguir de la eficacia de la recombinación de Cre *in vivo*, en donde la expresión de Cre proviene de las secuencias integradas en el genoma y, por tanto, mostrará una expresión de mayor duración en casi todos los casos.

20 SEQ ID NO:1 muestra la secuencia de ADN genómico de ratón (~22 kb) que incluye el gen C5aR (C5r1). SEQ ID NO:2 muestra la secuencia de ADNc de C5aR humano y SEQ ID NO:3 muestra la secuencia de la proteína C5aR humana.

La región genómica de ratón tal y como se muestra en SEQ ID NO:1 (el locus diana) se caracteriza como sigue:

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

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

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

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

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

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

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

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

#### ***Materiales***

45 Estructura artificial que se dirige a una diana  
Células madre embrionarias (ES)  
Medio ES/LIF  
Tripsina/EDTA: tripsina al 0,25% (p/v) / EDTA 1 mM (HEPES 20 mM, pH 7,3, opcional)

Medio ES  
 Tampón de electroporación  
 G418  
 Medio de congelación  
 5 Tampón de digestión  
 NaCl saturado  
 Gel de agarosa al 1%

*Transfección de la estructura artificial y selección de células ES*

- 10 1. Cultivar células ES en medio ES/LIF. Someter las células a pases cada 2 a 3 días, sembrando una placa de cultivo de tejidos revestida con gelatina de 100 mm con  $1-2 \times 10^6$  células/placa. El factor inhibidor de leucemia (LIF) impide que las células ES se diferencien. Puede ser preferible someter las células a pases a una densidad mayor si se planifica una inyección en blastocistos de las células (por ejemplo,  $1,5 \times 10^6$  células por matraz de  $25 \text{ cm}^2$ ).
- 15 2. Recoger  $\sim 5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células añadiendo tripsina/EDTA e incubando durante  $\sim 5$  minutos hasta que las células se liberen de la superficie de la placa. Disociar en células individuales, pipeteando arriba y abajo de cinco a diez veces. Añadir 5 ml de medio ES. Sedimentar las células y volver a poner en suspensión en el mismo tubo el sedimento celular en 1 ml de tampón de electroporación. Normalmente, se pueden obtener  $10^7$  células a partir de una placa de 100 mm de cultivo de tejidos casi confluyente.
- 20 3. Añadir 1 pmol de ADN de la estructura artificial, estéril linealizado.
4. Someter a electroporación la mezcla a 450 V y 250  $\mu\text{F}$  en una cubeta de electroporación de 4 mm. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Con las células madre embrionarias se pueden usar muchas condiciones de electroporación.
- 25 5. Extender las células en placas en medio ES a  $\sim 2 \times 10^6$  células por placa de cultivo de tejidos de 100 mm revestida con gelatina. Incubar 24 horas.
6. Comenzar la selección cambiando el medio ES por medio ES/LIF y añadir G418 hasta 0,2 mg/ml y GANC hasta 2  $\mu\text{M}$  (final).
- 30 7. Continuar la incubación, cambiando el medio diariamente usando medio ES/LIF y añadir G418 (0,2 mg/ml final), hasta que sean visibles colonias aisladas individuales (normalmente 1 semana después de la electroporación). Retirar una colonia individual de la placa usando una punta de pipeta tratada en autoclave, y colocarla en una gota de 35  $\mu\text{l}$  de tripsina/EDTA durante 5 minutos. Pipetear arriba y abajo aproximadamente cinco veces hasta disociar las células. Transferir las células a un pocillo de una placa de microtitulación de 24 pocillos revestida con gelatina que contiene 1 ml de medio ES/LIF.
- 35 8. Incubar hasta que sean visible colonias, pero que no se diferencien las células (normalmente 3 a 4 días). Pasar la mitad de las células a un pocillo de una placa de microtitulación limpia de 24 pocillos revestida con gelatina. Añadir las células restantes a 0,5 ml de medio de congelación y colocar la placa a  $-70^\circ\text{C}$ . Congelar durante la noche y luego transferir a nitrógeno líquido. Las células no diferenciadas crecen en colonias lisas redondas. Las células diferenciadas son más planas con bordes intercelulares definidos. Realizar inmediatamente la etapa 9 después de colocar la mitad de las células en el congelador.

*Escrutinio de recombinantes homólogos*

- 40 9. Incubar las células ES en una placa de microtitulación de 24 pocillos (etapa 14) hasta casi confluencia (usualmente 2 a 3 días). Debido a que no es decisivo impedir la diferenciación de las células ES en esta etapa, se puede omitir LIF del medio de cultivo; sin embargo, la presencia de LIF puede ayudar a mantener el crecimiento celular.
- 45 10. Añadir 300  $\mu\text{l}$  de tampón de digestión a cada pocillo. Transferir el contenido de los pocillos a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e incubar durante la noche a  $55^\circ\text{C}$ .
11. Añadir 150  $\mu\text{l}$  de NaCl saturado y agitar con formación de vórtice vigorosamente (la solución se volverá blanca lechosa). Añadir 2 volúmenes de etanol al 95% (la solución se volverá trasparente excepto el ADN precipitado). Algunos investigadores precipitan el ADN usando 2 volúmenes de etanol (o 1 volumen de isopropanol) sin añadir sal. Sin embargo, el sedimento de ADN se vuelve a suspender más fácilmente si se añade sal.
- 50 12. Volver a suspender el sedimento de ADN en 50  $\mu\text{l}$  de agua. Determinar la concentración de ADN midiendo la absorbancia a 260 nm.
13. Digerir 10  $\mu\text{g}$  de ADN (o 10  $\mu\text{l}$  si no se determinó la concentración de ADN) con la enzima de restricción adecuada.

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

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

10 Un total de 672 colonias de células ES transfectadas con la estructura artificial que se dirige a una diana hC5aR se escrutaron para detectar una recombinación homóloga entre la estructura artificial que se dirige a una diana y el genoma del ratón.

15 El ADN extraído de las colonias de células ES se digirió con EcoRV o XbaI y se sometió a electroforesis a través de un gel de agarosa. El ADN se transfirió a un filtro (por el método Southern) y se hibridó con un ADN de una sonda marcada con <sup>32</sup>P en 5' o 3' usando condiciones convencionales. Después de lavar, el filtro se expuso a una película de rayos X. Este escrutinio proporcionó tres colonias que contenían el gen C5aR humano. En dos de estas colonias (5H1 y 6C8) se identificó que tenían un gen C5aR humano correctamente integrado en el locus del gen C5aR de ratón (los datos no se muestran).

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

20 El método convencional para generar quimeras con células ES emplea embriones de ratón de 3,5 días de edad (blastocistos). Los embriones en este estadio tienen una gran cavidad llena de fluido en la cual se pueden colocar las células ES mediante inyección. Los blastocistos ya han salido de los oviductos y se encuentran en las trompas uterinas. Para las inyecciones, se deben recoger antes de que eclosionen (pérdida de zona pelúcida) y se fijen a la pared uterina. Para generar blastocistos para inyecciones de células ES se usan diversas cepas de ratones. En este  
25 ejemplo, se usó la cepa de ratones Balb/c para generar blastocistos. Esta cepa proporciona un número razonable de embriones. Tiende a producir quimeras de alta calidad que se pueden distinguir fácilmente por el color del pelaje cuando se usan con células ES procedentes de una variedad de subcepas de C57BL/6.

30 Las células ES procedentes de las colonias, 5H1 y 6C8 se inyectaron en ~200 blastocistos. Los blastocistos se implantaron en ratones hembras pseudopreñadas. Nacieron unas 17 quimeras que tenían entre 5 y 50% el color de pelaje negro. Las 13 quimeras machos se aparearon con hembras C57BL/6 y produjeron unas 300 crías. Se observó la transmisión de la línea germinal del gen C5aR humano a 19 crías procedentes de 5 parejas de apareamiento quimera x C57BL/6.

35 La presencia del locus C5aR humano se confirmó por transferencia Southern. El ADN genómico extraído de la cola de ratón se digirió con EcoRV, se sometió a electroforesis y se hibridó con la sonda 3'. El filtro se desmontó y se volvió a analizar con la sonda Neo. Cierta número de ratones mostraron el gen C5aR. El genotipo de estos ratones se denominó hC5aRfloxed(neoR)/wt (abreviado H5Rf/+).

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

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

45 La confirmación de que los ratones son portadores del gen C5aR humano se realizó usando un ensayo de genotipado basado en la PCR. El ensayo de genotipos mediante transferencia Southern empleado anteriormente para identificar ratones portadores del gen C5aR humano, se basaba en la hibridación con una sonda de ADN específica de ratón (no una sonda específica del gen C5aR humano). El ensayo de PCR descrito más adelante utilizaba cebadores que amplifican específicamente las secuencias del gen C5aR humano o de ratón.

*Preparación del ADN de la cola*

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

*PCR para amplificar genes de C5aR humano y de ratón*

Cada reacción de PCR contenía 5 ul de tampón 10x PCR exento de magnesio, 5 ul de cloruro de magnesio 25 mM, 0,5 ul de Taq ADN-polimerasa (2,5 unidades/ul), 1 ul de dNTPs 10 mM (Promega), 1 ul de cada cebador oligonucleotídico 10 mM (F1C, R2a, F3C y R4C) y 1 ul de ADN molde. El volumen total se completó hasta 50 ul con agua destilada. Los cebadores oligonucleotídicos empleados eran:

5'-TGGACTACAGCCACGACAAACG-3' (F1C) (SEQ ID NO:4) y 5'-AGGAAGGACATCATTATCCCCG-3' (R2a) (SEQ ID NO:5), ambos específicos del exón 3 de C5aR humano; y,

5'-CACCAGCCCCGAGATTTTTTC-3' (F3C) (SEQ ID NO:6) y 5'-TCAGAAACCAGATGGCGT-3' (R4C) (SEQ ID NO:7), ambos específicos del gen C5aR de ratón.

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

*Electroforesis en gel*

El genotipo de cada muestra se visualizó usando electroforesis en gel con 10 ul de producto de la PCR y 6x colorante de carga (Promega). El gel consistía en 80 ml de agarosa de calidad para ADN al 1,5% (Progen) en 1x TBE y 2 ul de bromuro de etidio (MP Biomedicals). Las muestras se hicieron correr a 100 voltios durante 30 minutos junto con una cadena de ADN de 1 kb (Promega). Se esperaba que el ADN de ratones homocigóticos H5Rf/H5Rf tuviera una sola banda de 237 pb, el ADN de ratones heterocigóticos H5Rf/+ tendría bandas de 237 pb y 565 pb y el ADN de ratones de tipo silvestre tuviera una sola banda de 565 pb. El análisis del gel mostraba que los ratones nº 10, 24 y 25 eran homocigóticos (H5Rf/H5Rf) (datos no mostrados). En algunas muestras, se observó un transcrito irrelevante con una longitud de 1139 pb (amplificado con los cebadores F3C y R2a).

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

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

Para confirmar que el receptor de C5a humana se expresa en ratones que son portadores del gen C5aR humano, se aislaron neutrófilos a partir de la sangre de un ratón de tipo silvestre (+/+), un heterocigótico (H5Rf/+) y un homocigótico (H5Rf/H5Rf).

*Tinción con inmunofluorescencia directa de C5aR en sangre completa de ratón*

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

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

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

**Ejemplo 6: Los ratones con el gen C5aR humano activado se pueden usar para escrutar compuestos antiinflamatorios**

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

Los ratones transgénicos (tg) K/BxN TCR expresan un TCR (receptor de linfocitos T) codificado por el transgén que es reactivo con un autopéptido procedente de la enzima glicolítica expresada de forma omnipresente, glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI), presentada por la molécula Ag7 de la clase II del MHC. Estos animales desarrollan espontáneamente una forma muy agresiva de artritis, que comienza a una edad de 3 a 4 semanas. Al igual que en los seres humanos, la enfermedad es crónica, progresiva y simétrica, y presenta la mayoría (aunque no todos) los aspectos clínicos, histológicos e inmunológicos de la artritis reumatoide (AR) en seres humanos. Los aspectos histológicos incluyen invasión de leucocitos, sinovitis, formación de queratitis vascular, y destrucción de cartilago y hueso. El trastorno en muridos, que depende de forma decisiva tanto de los linfocitos T como de los B, es específico de las articulaciones pero se inicia, y luego continúa por la autorreactividad de los linfocitos T y luego los B con un antígeno que se expresa de forma omnipresente, GPI.

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

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

Se mezclaron sueros procedentes de ratones K/BxN artríticos de 60 días de edad y se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) (150 ul de volumen total) en ratones homocigóticos (H5Rf/H5Rf) de 6 - 9 semanas de edad y en ratones de tipo silvestre (+/+) cada día 0 y +2. Se inyectó i. p. en los ratones cada día -1 y + 3, un anticuerpo estéril (200 ug de anticuerpo 7F3 - isotipo IgG2a anti-C5aR humano de ratón o 200 ug de anticuerpo de control con isotipo IgG2a) en PBS.

La artritis se puntuó diariamente mediante examen clínico durante 10 - 14 días. La gravedad de la artritis en cada pata afectada se clasificó gradualmente del modo siguiente:

0 puntos: sin indicios de inflamación

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

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

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

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

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

*Histología*

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

*Los ratones homocigóticos para el gen C5aR activado desarrollan una enfermedad inflamatoria.*

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

Los autores del presente invento también esperaban que los ratones con el gen C5aR humano activado mostraran signos de inflamación si se expresaba el gen hC5aR y la proteína receptora se procesaba correctamente y se acoplaba al sistema de señalización de la proteína G. En primer lugar, la afinidad de C5a humana hacia el receptor de C5a en células de ratón y humanas es muy similar (Woodruff et al., 2001, Inflammation, v25, págs.171-177) lo que sugiere que la afinidad de C5aR de ratón hacia el receptor de C5a humano sería similar a su afinidad hacia C5aR de ratón. En segundo lugar, estudios con ratones que carecen de C5aR han mostrado que la ausencia de C5aR impide la inflamación en el modelo K/BxN (Ji et al., 2002, Immunity, v16, págs.157-168). Por tanto, si el gen C5aR humano

no se expresaba o el receptor C5aR humano no estaba funcionando correctamente, entonces los ratones homocigóticos para hC5aR no mostraban signos de inflamación después de la inyección de suero de K/BxN.

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

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

*Ratones homocigóticos para el gen C5aR humano activado se pueden usar para analizar compuestos con propiedades antiinflamatorias.*

Los ratones con el gen C5aR humano activado se desarrollaron como una herramienta útil para escrutar compuestos anti-C5aR humano con actividad antiinflamatoria. Para analizar la utilidad de los ratones se administró tanto a los ratones homocigóticos para hC5aR como a los de tipo silvestre (control) un anticuerpo específico para C5aR humano (que no se une a C5aR de ratón) o un anticuerpo de control (con el mismo isotipo pero con una especificidad irrelevante) en el modelo K/BxN y se determinó el efecto del anticuerpo sobre el progreso de la enfermedad inflamatoria. El anticuerpo se inyectó i.p. dos veces (200 ug por dosis), un día antes y un día después de la primera inyección de suero de K/BxN. Los ratones se controlaron como se ha descrito anteriormente.

La Figura 7 muestra el progreso clínico de la enfermedad y el engrosamiento de los tobillos en ratones durante el curso del experimento. Los ratones homocigóticos para hC5aR activado, inyectados con anticuerpo de control desarrollaron hinchazón y otros signos de inflamación. En contraste, los ratones con el gen hC5aR activado inyectados con el anticuerpo 7F3 anti-C5aR humano no desarrollaron signos clínicos de inflamación. Los ratones de control (de tipo silvestre) tratados con 7F3, desarrollaron inflamación como se pone de manifiesto por el aumento del grosor de sus tobillos - como era de esperar, puesto que 7F3 se une específicamente a C5aR humano y no se une a C5aR de ratón.

Además, el análisis histológico reveló que los ratones inyectados con el anticuerpo anti-C5aR humano no presentaban lesión en los tejidos - la estructura de la articulación sinovial parecía normal, sin signos de erosión ósea ni excesiva infiltración de leucocitos - cuando se compararon con los tobillos de ratones inyectados con el anticuerpo de control (datos no mostrados).

Estos datos muestran claramente que los ratones con el gen C5aR humano activado son útiles para analizar compuestos en busca de actividad antiinflamatoria en modelos de enfermedad inflamatoria.

La siguiente sección de la descripción consiste en párrafos numerados que proporcionan simplemente observaciones de la invención que ya se han descrito en este documento. Los párrafos numerados en esta sección no son reivindicaciones. Las reivindicaciones se exponen a continuación, en la sección posterior titulada "reivindicaciones".

1. Un mamífero transgénico no humano que comprende un polinucleótido que codifica un C5aR humano o un C5aR humanizado.
2. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con 1, en el que el polinucleótido codifica C5aR humano que comprende una secuencia tal y como se muestra en SEQ ID NO: 3, o una variante alélica de la misma.
3. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con 1, en el que el polinucleótido comprende una secuencia tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2, o una variante alélica de la misma.
4. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con 1, en el que el polinucleótido codifica C5aR humanizado.
5. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con 4, en el que el C5aR humanizado comprende una secuencia de C5aR endógena en el mamífero no humano, en donde al menos un dominio extracelular o intracelular se sustituye con el dominio C5aR humano correspondiente.
6. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con 4, en el que el C5aR humanizado comprende uno o varios dominios intracelulares de la secuencia de C5aR endógena en el mamífero no humano y uno o varios dominios extracelulares de C5aR humano.
7. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con una cualquiera de 1 a 6, en donde el mamífero trans-

- génico tiene células somáticas y de la línea germinal que contienen, en una forma integrada de forma estable, un polinucleótido que codifica C5aR humano o humanizado.
8. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con una cualquiera de 1 a 7, en donde el mamífero transgénico es homocigótico para C5aR humano o humanizado.
- 5 9. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con una cualquiera de 1 a 8, en donde la expresión de C5aR endógeno en el mamífero transgénico es indetectable o insignificante.
10. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con 9, en el que la secuencia que codifica C5aR endógeno o un fragmento del mismo se ha sustituido por una secuencia correspondiente que codifica C5aR humano o un fragmento de la misma por medio de recombinación homóloga dirigida.
- 10 11. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con una cualquiera de 1 a 7, en donde el mamífero transgénico no humano se selecciona a partir del grupo que consiste en una vaca, cerdo, cabra, oveja, camello, caballo, gato, perro, mono, babuino, conejo, cobaya, rata, hámster y ratón.
12. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con una cualquiera de 1 a 11, en donde el mamífero transgénico no humano es un roedor.
- 15 13. Un mamífero transgénico no humano de acuerdo con una cualquiera de 1 a 12, en donde el mamífero transgénico no humano es un ratón.
14. Una o unas células aisladas, una línea celular, un tejido o un órgano obtenidos a partir del mamífero transgénico no humano de acuerdo con una cualquiera de 1 a 13, comprendiendo la célula aislada, la línea celular, el tejido o el órgano un polinucleótido que codifica un C5aR humano o un C5aR humanizado.
- 20 15. Un método para producir un mamífero transgénico no humano para someter a ensayo compuestos para estudiar un efecto sobre un fenotipo asociado con la señalización de C5aR, comprendiendo el método introducir en el genoma de un mamífero no humano una estructura artificial de polinucleótido que codifica C5aR humano, C5aR humanizado o un fragmento de C5aR humano, para producir un mamífero transgénico no humano.
16. Un método de acuerdo con 15, en el que la estructura artificial de polinucleótido codifica C5aR humano.
- 25 17. Un método de acuerdo con 16, en el que la estructura artificial de polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia tal y como se muestra en SEQ ID NO: 3, o una variante alélica de la misma.
18. Un método de acuerdo con 16, en el que la estructura artificial de polinucleótido comprende una secuencia tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2, o una variante alélica de la misma.
19. Un método de acuerdo con 15, en el que la estructura artificial de polinucleótido codifica C5aR humanizado.
- 30 20. Un método de acuerdo con 15, en el que la estructura artificial de polinucleótido codifica un fragmento de C5aR humano.
21. Un método de acuerdo con 20, en donde el fragmento incluye al menos un dominio de C5aR humano o una parte del mismo.
- 35 22. Un método de acuerdo con 21, en donde el fragmento comprende al menos un dominio extracelular de C5aR humano.
23. Un método de acuerdo con una cualquiera de 15 a 22, en el que la estructura artificial de polinucleótido comprende adicionalmente un marcador seleccionable.
24. Un método de acuerdo con cualquiera de 23, en el que el marcador seleccionable es el gen PGK-neo.
25. Un método de acuerdo con 23 o 24, en el que el marcador seleccionable está flanqueado por sitios loxP.
- 40 26. Un método de acuerdo con una cualquiera de 15 a 20, en donde el método comprende además la interrupción del C5aR endógeno del mamífero no humano.
27. Un método de acuerdo con una cualquiera de 15 a 26, en donde el método comprende sustituir la secuencia que codifica C5aR endógeno o un fragmento de la misma por una secuencia correspondiente que codifica C5aR humano o un fragmento de la misma por medio de recombinación homóloga dirigida.
- 45 28. Un método para evaluar al menos un efecto farmacocinético y/o farmacodinámico de un compuesto candidato, comprendiendo el método administrar un compuesto candidato a un mamífero transgénico de acuerdo con una cualquiera de 1 a 13, o tejido aislado o células obtenidas a partir del mismo, y examinar al menos un efecto farmacocinético y/o farmacodinámico del compuesto candidato en el mamífero transgénico.

29. Un método de acuerdo con 28, en el que el al menos un efecto farmacocinético examinado es un parámetro de absorción, un parámetro de distribución, un parámetro de metabolismo o un parámetro de excreción.
- 5 30. Un método de acuerdo con 28 o 29, en el que el al menos un efecto farmacocinético examinado es volumen de distribución, aclaramiento total, unión a proteínas, unión tisular, aclaramiento metabólico, aclaramiento renal, aclaramiento hepático, aclaramiento biliar, absorción intestinal, biodisponibilidad, biodisponibilidad relativa, aclaramiento intrínseco, tiempo medio de permanencia, tasa máxima de metabolismo, constante de Michaelis-Menten, coeficientes de reparto entre tejidos y sangre o plasma, fracción excretada inalterada en orina, fracción de fármaco convertido sistémicamente en metabolitos, constante de la tasa de eliminación, semivida o aclaramiento de secreción.
- 10 31. Un método de acuerdo con 28, en el que el al menos un efecto farmacodinámico es la modulación de un fenotipo asociado con la señalización de C5aR.
- 15 32. Un método de acuerdo con 31, comprendiendo el método (i) administrar un compuesto candidato a un mamífero transgénico de acuerdo con una cualquiera de 1 a 13 o un tejido aislado o células obtenidas a partir del mismo en condiciones en las que se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR; y (ii) realizar un seguimiento de la evolución de el al menos un fenotipo después de la administración del compuesto.
- 20 33. Un método de acuerdo con 32, en donde el método comprende además (iii) comparar la extensión del fenotipo en el mamífero transgénico o en células obtenidas a partir del mismo, al que se administró el compuesto en relación con un mamífero de control o células obtenidas a partir del mismo, en donde cualquier diferencia en la naturaleza o la extensión del fenotipo cuando se compara con el mamífero de control, indica el potencial del compuesto para modular la actividad de C5aR.
- 25 34. Un método de acuerdo con 31, comprendiendo el método (i) administrar un compuesto candidato a un mamífero transgénico de la presente invención o un tejido aislado o células obtenidas a partir del mismo en condiciones en las que se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR; (ii) realizar un seguimiento de la evolución de el al menos un fenotipo después de la administración del compuesto; y opcionalmente (iii) comparar la extensión del fenotipo en el mamífero transgénico al que se administró el compuesto en relación con un mamífero de control, en donde cualquier reducción o inhibición de la naturaleza o la extensión del fenotipo cuando se compara con el mamífero de control, indica el potencial del compuesto para inhibir o reducir la actividad de C5aR.
- 30 35. Un método de acuerdo con 31, comprendiendo el método (i) administrar un compuesto candidato a un mamífero transgénico de la presente invención o un tejido aislado o células obtenidas a partir del mismo en condiciones en las que se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR; (ii) realizar un seguimiento de la evolución del fenotipo después de la administración del compuesto; y opcionalmente (iii) comparar la extensión del fenotipo en el mamífero transgénico al que se ha administrado el compuesto en relación con un mamífero de control, en donde cualquier mejora en la naturaleza o la extensión del fenotipo cuando se compara con el mamífero de control, indica el potencial del compuesto para favorecer o potenciar la actividad de C5aR.
- 35 36. Un método de acuerdo con una cualquiera de 31 a 35, en donde el fenotipo es una afección que se agrava mediante la señalización de C5aR.
- 40 37. Un método de acuerdo con 36, en el que el fenotipo es un trastorno complejo inmune, una enfermedad inflamatoria o alérgica, un rechazo de injerto o cáncer.
38. Un método de acuerdo con una cualquiera de 31 a 35, en donde el fenotipo es una afección que se alivia o se reduce mediante un aumento de la señalización de C5aR.
39. Un método de acuerdo con 38, en donde el fenotipo es inmunosupresión.
- 45 40. Un método de acuerdo con una cualquiera de 28 a 39, en donde el compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste en: un péptido, incluyendo un péptido obtenido a partir de C5aR o C5a u otro péptido que no es C5aR y es capaz de inhibir, reducir o reprimir una función de C5aR, un mutante dominante negativo de C5aR; un inhibidor no peptídico de C5aR; un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a C5aR e inhibe una función de C5aR; una molécula orgánica pequeña, un ácido nucleico que codifica dicho péptido obtenido a partir de C5aR o C5a u otro inhibidor peptídico que no es C5aR, un ácido nucleico antisentido dirigido contra el ARNm que codifica C5aR, una ribozima anti-C5aR y un ARN pequeño de interferencia (ARNi) que se dirige a la expresión del gen C5aR.
- 50 41. Un método de acuerdo con 40, en el que el ácido nucleico codifica un péptido obtenido a partir de C5aR o un inhibidor peptídico que no es C5aR, un ácido nucleico antisentido dirigido contra el ARNm que codifica C5aR, una ribozima anti-C5aR o un ARN pequeño de interferencia (ARNi) que se dirige a la expresión del gen C5aR.
- 55

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> G2 Inflammation Pty Ltd  
 <120> Mamíferos transgénicos  
 <130> 503037  
 5 <150> AU 2003907150  
 < 151> 2003-12-24  
 <160> 7  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 10 <210> 1  
 < 211> 21005  
 < 212> ADN  
 < 213> Mus musculus  
 15 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (5484)..(5484)  
 < 223> n = un número de nucleótidos desconocido, datos disponibles del locus de ratón sugieren aproximadamente 626 nucleótidos de longitud  
 20 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (7392)..(7392)  
 < 223> n = un número de nucleótidos desconocido, datos disponibles del locus de ratón sugieren aproximadamente 100 nucleótidos de longitud  
 25 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (9861)..(9861)  
 < 223> n = un número de nucleótidos desconocido, datos disponibles del locus de ratón sugieren aproximadamente 233 nucleótidos de longitud  
 <400> 1  
 tttattttta tttttttaa aaattggtcc ttctatgca ggtggcctgg aatttttaat 60  
 cctcctgctt ttgtcoaagt aatagaatta caggcatgta taattgtgcc taacctgagc 120  
 caattttgtc tttgctaaaa agcacagggt ctcaacctgt gggctcctgac ccttgggggg 180  
 aggggtgtcac atctcagata tcttgtatat ctgatattta cattacagtt atgaagtaac 240  
 aatgaaatgc ttttgtgggt gggggtcacc acaatatgtg gaaccaactg ttttcaggggt 300  
 cacagtgtca ggaaggttga gagccactgc taaaaaggat ctcaaaaagc ctaotctgga 360  
 ttagaagtta ctgtgcagcc aggaggatgg ctttgaactt attctcctgc ctgagccgcc 420  
 tgggtgctgg ggtcggatgc agcactacat caggttttat gcggtgctgg gaatggatc 480  
 cagggctttg cacatgctag gcaagtgttt aaccaaccaa gccatgatcc cagcatgctt 540  
 tgctttatta tttgagacag gtctgtttct gcagcccagg gtgatcctcc tgccccagtc 600  
 30

ES 2 587 344 T3

tcctgagtgc tagoattgag ttaacacatc tccctaacco ccttaagaga aaacgccaag 660  
 accttgcca tctcttcagc cctctgtgtg ctttcttgct ataaaagcca ccaggctggg 720  
 gagctgtggt cattatttot gtcattgtaga aaocccagaa actccaaaac ttccttcaga 780  
 agaggtaggc tcctcctcag attggggaac gaggccagga aaagcagctg cgtccocaaa 840  
 agtgaagaag tcctggaaat tgccttttcc ccttctgggg ccagagactt ccttctttt 900  
 ccaagttgac atctctcccc tggctggttg gtactgggtg gtgctgaggg tgtactgggt 960  
 aagcaccoggt ggaggggacc tcagctagga tggtcagtga gtgaccaatg agcacctcca 1020  
 ggagacaaga cagtcatttc ctctcagttg cctgcctctc ttcttgaggg tttaaaaggc 1080  
 acagcctggg tgacagggac cttoaggcat cctctcctgg ttaccacaga acccaggagg 1140  
 agccaggaca tggtagtggt attctctctc ctgtctgact ttctttgccc attcttagct 1200  
 cctttcccat cctgagctca cactctgaga tgggatgtgg ccaacggact aaggggattt 1260  
 atgggaacca cggcggcctc accaagatgt aggctcaaga aggttcttca ggacaggaga 1320  
 ccctggagtc agctctctc actgaagagt totagaagtt gggcatgttc atttaoactt 1380  
 gtaatctgag cctcaagag googgggag gatgctgcag tcaaggctac atagtgactt 1440  
 ttaggctagt gtgagctaca ctatgagata ctgtgttcag agacaaatgg gctggaggta 1500  
 gagatcaggt gtgagagtgc tctgtgggag agctggaagc catgggtcca atgaccagca 1560  
 cctcgtacag ctgggtggga gtgattggaa attcaatctt acatagtaat tttgaggtta 1620  
 acctgggcta cactacatga gacctactt cagaaaagca agaacaaaaa aataatttta 1680  
 caaactagcc aaggtggtgg ctcaaacctg ctatcctggc tcctagcagg aggtttgaga 1740  
 tttggggcga gcttaggcaa ctttgttgag actttgtctc aaagactaaa agcaaaacia 1800  
 aacaaaaact caaacagtggt gaataaagga aggaagaatg aaacaattgc agaaacctgt 1860  
 tgggattgta gctcactgcc tagcctgagt gtggcccagg gttcctctc ctaogctgag 1920  
 tctaaaaact ccaagcagag actgggtgct gtgacgcaca ccttttaato cogoactcag 1980  
 gaggcagaat cgggaggttc tctgtgagtt cgaggccagc ctggtaaaaca tgtaaagaag 2040  
 tctaaggaag gtcaatggtg agagtcttga cagccagttt gaaagaacgc ccattccag 2100  
 aaaagttaga ggaagocag atgggagcag tcatggcctg ggtcctctg tggttaatgg 2160  
 ccatgacct ctaggcaggt ccctctccat gcctgggacc tgacgttgag gcatggtgct 2220  
 agaccagcgg cgaactggcc ccaactgtaac agaggatacg gtcttgcttc atccacacia 2280  
 aagaggaaac ggaaaacttg atgacagga gggtaacgc tttcttctc cttctctgt 2340  
 cccatccaat cctgtgtctg ccccgagcaa ttgggtttc cagaacaggg tgggttctt 2400  
 ttcctttcta cacaaogttt ctgaagacga agtcacttta ttgaccaacc gaactgtaga 2460

ES 2 587 344 T3

gtccctgatt tgggctgggg cgtgactgag ttttttgttt ttgtttgtt tgtttgtttg 2520  
 ttttaaatac tggaataggc tgtcagatc tttttttttt ttttaagattt atttattata 2580  
 tataagtaca ctgtagctgt cttcagacac tccagaagat ggcatcagat cttgttacag 2640  
 atggttgtga gctaccatgt ggttgcctggg atttgaactc cagaccttcg gaagagcagt 2700  
 cgggtgctct taoccatga gccaaactcac cagccctttt tttttttttt tttttttttt 2760  
 ttttttttaa agatttactt attttatata tgtgagtagt attgtctctt cagagacacc 2820  
 agaagagggc atcagacca attacagatg gttattagcc accatgtggt tgctgggaat 2880  
 tgaactcggg acctttggaa gagcagtcag agctctaaac cgctgaacca tctctgcagc 2940  
 ccgtgactgg attcttaggc cagtagtcta tggctaagct atgcccctca cccctcactg 3000  
 ggggattcta ggcaggggct ctaccactga gccacaactc cagcccctca ctgggggatt 3060  
 ctaggcaggg gctctaacac tgagccacgc cccagcccc tcaactggggg attctaggca 3120  
 ggggctctac aacatttcag tccttgatct ttttaagacag gatgtcacta tgtagcccaa 3180  
 tggctctaat cacatgatta tcctcaggct ccttgggtgt gggatcacag gcataacca 3240  
 ccgtggctag cccctaaaca taatttttct ttgaatgaa taattttttt cttttggttt 3300  
 ttcaagatag gatttctctg tgtagccttg gctgccctgg aacttgctct ataaaccagc 3360  
 ctggcttcaa actcacagat cctcctgctt ctacctctg agtgctggga ttaaaggcat 3420  
 gtgccatcac tgcctagctt tgaatgaata ctttttttta atattgtgaa taggcattta 3480  
 ctgagtgtt attgtatgt agtctcttg ctaagcactt tagatttact acatagcaaa 3540  
 ctatcaataa aggagctgta gaatatccat gtatttcaag ggcaaoacag cctttgaaca 3600  
 gacatatact atccaatgg cattcacgc attaggcgtg ataacctttt aaagagaagg 3660  
 ctcttgggat tggccccac cctgtctctt gctgataagt tttgggaggc tttotaacta 3720  
 acctagagcc ccacttttta aatctgttag agtgggtgtg gccatagtag cagcccaatg 3780  
 agggttgcat gtgttaaatg aagaaaagag cagttgaaag cccctcacia gtggccata 3840  
 cctgtaatcc cagcaactcag gagaaagagg cctgtctca aaagaaaata caaaaagcat 3900  
 gtaaacttat ggaccaggct aattatttta ttttgttttt ttaaaaaaga tttatttatt 3960  
 tatttattac atgtaagtac actgtagctg tcttcagaca ctccagaaga gggagtcaga 4020  
 totccttacg aatggttgtg agccaccatg tggttgtctg gatttgaact aaggaccttc 4080  
 agaagagcag tcaggtgttc ttacacgctg agccatcgca ccagcccag gctaattatt 4140  
 gttattttga aatagggtct catgtagata aggctgaacc tagaactcac tatgtagcca 4200  
 aggatagctt tgacttctg tcctcctgct ccacctctg tctctctctc tegatata 4260  
 cacacatata tgttcatttt atatattata ttgtataata gtttatagtc tttttttttt 4320

ES 2 587 344 T3

cttttttttt tttttttttg ggttttcaag acagggtttc tctgtgtagc cctggctgtc 4380  
 ctggaactca ctctgttagac caggctggcc togaactcag aaatccgcct gcctotgcct 4440  
 cccgagtgcct gggattaaag gcgtgtgcc aacgcgcgg ctatagttca tattotttaa 4500  
 gcaactattt ttatatcatt tatttatttg tottacaaga tttgttttta attgtgtgta 4560  
 cgcttttgag tctgtctgtc acacgcgtgc agatgccttc agaggacaga aggtgttgga 4620  
 ttttcggagc tggagtttca ggcagttgtg agatcccttc gggtgctgag aagtgaacac 4680  
 atgtcctctg cggaaactga cagtgccttc cattgtgaa ccatctctcc acttcctctc 4740  
 tagtcttttt tttctcaatt gttttctcc ttaaaaaata ttttgaactt atgattagtt 4800  
 gagtccacag acatggacac tgtgtatacg gagggacaat gacatottct ataatagttc 4860  
 aaattatgta tgcataata atgttacata tattgtattc cacatccaag aaccatataa 4920  
 acaggagaaa gtgctctctc tctctctctc tctctctctt aaagatttat ttatttgta 4980  
 tatgtaagta cactgtagct gtcttcagtc actccagaag agggcatcag atctcattat 5040  
 ggatggttgt gagccaccaa gtggttgctg ggatttgaac tcaggacttt ccaagagcgg 5100  
 tcagtgcctc tacctgctga gccattctcc agcccaggag aaaactctct taattccoga 5160  
 gtcccagtoc ctctcttaga ggcagccact actgtcagta tgtgaggcta gtctgtatgt 5220  
 acacgtgaat ggacacacac acattcatgc acatgtgtg catccttct totacaggtta 5280  
 atatacattg tgcattgtcc actgctattt cctattttta acaaagtttc cctagatatac 5340  
 aaagacottt ctgtatcatt tcattaacaa ctacctattt cttttaaaaa ctgcatagtg 5400  
 ctttgttgcc tagaggctat tactaagtta ctcagctcct tttggtcagt tcaaaatatac 5460  
 attatcatct cctctctgct ctentgtatc tggaaagccc aggaaaccac agagtttacg 5520  
 atcagcatct tttctctgct ctcatgaagt cacgaaaagg acagggtgag atctatgtcag 5580  
 gaagcaagaa aggagaaggt cagccggcaa ggatgagaga tggggttaga gaggccctg 5640  
 tcagaagtct gagtcattgt agtaaggatg gtgagatctg cagatgccag gagaagcatt 5700  
 ccacctgtc tggggccttg agaataccca gagggcaggc tgtgaggttt cctatagggc 5760  
 ccagaattaa tctcaagtg acctgagcat gggaccctgg ggatgtgggg atgccagag 5820  
 taacaagtag aaagatacag aactgaggtg gagcoagagt gaaatgagtg gctgggtcct 5880  
 gggctctgtct gtctgtctgt ctgtctgtct ctctctagct ttctttttgt tttctctgt 5940  
 gtagccctgg ctgtcttaga actcactcta taaaccoggc tgacctcaa ctcagagatac 6000  
 tgtctctccc tgcaccctg gctgggattg aaggtgtgca tcacatcacc acctctctgc 6060  
 ttgaaatatt tttaaattat agaaaagtgt gaggetagta caagaagttt atttatcttc 6120  
 ttttgtgtgc gttgttattt attattactg agatggggtc tcgctatgta gctcaggtg 6180

ES 2 587 344 T3

aactcaatg taatgcatag cccaggctgg tctggggcgc cacatcttcc tgttcagcct 6240  
 cctcagtgtt ggcattacag gcgagcatta ccataaatc ttgtgtttcc tccccaaagag 6300  
 tccccacatg cagtctatgg tgtatatatg tttacccatg tatatactta taaatctttg 6360  
 tatgtatcta tgtttctgtt tctataaaca tatcagttta gctgcatato gacatatctg 6420  
 tttttctatc tgtcaatata gctatcaatt atgctccatc cattgtttct ctaccattca 6480  
 tctctagota ttcacatctc acccaggcat tttctattct tctattagtt tagcctggtc 6540  
 ttgaaccccc aacctagctg aggatagctc tttttttttt ttttataatg gtactgaagt 6600  
 ttattttttt taaagattta tttatttatt acatgtaagt acactgtagc tgtcttcaga 6660  
 cacaccagaa gagggcgtca gatctcgtta cagatgggtg tgagccacca tgtggttgct 6720  
 gggatttgaa ctctggacct toggaagagc agtcgggtgc tcttaccac tgagccatct 6780  
 caccagcctt gaggatagct cttactctt gatcttcttg cctccaccac atagattcag 6840  
 gggttacagg tgcactaccg tgtccagtct atgtagcact ggggatggaa cccaagggtt 6900  
 catacatgat aatgagcac tctacaagat gagctatggt cctaaccat ctgcctgtct 6960  
 ttctatcacc tatgtccat cogttgatct ataatcttt ttattcatct ttcaccacc 7020  
 cacccaacca ttcaccatt cattottagt aaccaaggct ggtcttgaac tcttgatttt 7080  
 ccacccogag tottccagc cctgagatga tacaagtcca catcaccata cccgtgtcaa 7140  
 aatctacttc taattcttat ttctgttttt aaaaagaaaa gttatctggt ttatgtatat 7200  
 atgtgtctgt tgagtgtata tatgtgcacc aagtgcctac aggagcctgc aaagatcagt 7260  
 tgtcagatc tgcattgga gttctaaaca gttgcgagct gtcacaactc tggctctcta 7320  
 caggagcagc aactgctctt aactgggtgac ccactctctc taatttctct ctctctctct 7380  
 ctctctctct cncctctctc tctctcctc cctccctccc tctcttctt ccttctctcc 7440  
 ttcttctccc cctccttccc ttcttctctt cattctctcc ttttgttttt tgtttgtttg 7500  
 ttttttttta attaggtatt ttctcattt acattttcaa tgetatcca aaggtcccc 7560  
 ataccacccc ccccaatccc ctaaccaccc actccccctt tttggccctg gcgttcccc 7620  
 gtactggggc atataaagtt tgcaagtcca atgggcctct ttttgoagtg atggccgact 7680  
 aggccatctt ttgatacata tgcagctaga gacaagagct ccagggtact ggttagttca 7740  
 tattgttggt ccacctatag ggttgcagtt ccttttagct ccttgggtaa tttctctagc 7800  
 tcttcattg ggggcctgt gatocacca atagctgact gtgatcatcc acttctgtgt 7860  
 tttgtttgtt tttttgagae agggtttcat cgtgtagccc tggctgtctt ggaactcact 7920  
 ctggagacca ggtggcctc gaacacacag ggatctacct acctctgct cccaagtgt 7980  
 gggattaaag geatgctcta ccaccacctg gctagttctt atttctatt ttgcctttt 8040

ES 2 587 344 T3

ctggcccaaa atactttgcc tccacttcca attgtaagtc ccaaaaactta gggtttggaa 8100  
aatgggtggc ttgctagact gtoaaggaga taatgaagga agaaagggag gctcagagcc 8160  
agagaaattt gcaaaggaac ctgtatgccc cataggtctg gatcacaggg gataactcca 8220  
aagccagtat ccaaaggaca gcctatcctc agctgggggt ggagtctttg cctgcttccc 8280  
gcctatacta aaatgtcgaa ctattttttc tctttctctc tctctctttc tattttttct 8340  
tttaaagatt tatttattta ttttatgtat atgagtacac tagggcatta gatctcatta 8400  
cagatggttg tgagccacca tgtgattgct ggaatttaa ctcaggacct ctaggagagc 8460  
atccagtgct cttaaactct gagccatctc tcagccctct ggttttttgt tttgttttgt 8520  
tttgtttttt tgttttttta aagacagtat ctcatgtct ttgttagcag ctctgtcctg 8580  
tcctagaact cactatgccc aacacactga cctcaaatac atgcttatcc acctggctct 8640  
gcctcccaaa tgctgggatt aaacatgtgt accaccacta cctggcatct ctgtccatca 8700  
ttttaatcaa agagaaaaat gtataaaaact ttttcttaag tagcccagac tggtaatgag 8760  
gatcactgtg catctgagga tgagtctgtt gcctctgtct cccagattct ggggtgggag 8820  
tcaccatttc tagtttaatg ttgtgctggg tttggagtct gtggcttcat gctttgagac 8880  
tggtttcctg taaggcaggc gatcattgaa tgcttcccca cctgcctcc tgttactgaa 8940  
tgtcaggatt gtagccatga gcgcctatgc ccgctttaat ataagatcat ttaaagcagt 9000  
agttctcaat ctgltgtcag agagtagcaa gcttacagtc aggaagtagc acaaaaagtc 9060  
attttatggc tgggggtcac cacacatga ggaactgtgt taaaggtctc agccttcgga 9120  
aggttgagaa gaaaacctca aaccacaga tctcggtcac agttctcaaa ggaccacatt 9180  
gccaatatg tttatacacc atgggtccat ttccagcca ccgaggacac caggataaag 9240  
cttcaactgc aacaatgagg tgtttcaaaa tttagatgtca ttgtcctgtc tttataccea 9300  
ctttggggtt tagtccaaat tcagggcata cacatctata attctagcac acaggaggta 9360  
gaggcagggg gatcagtagt ttatcatctt gagctacata gtgagttttg ggactagcct 9420  
ggatatacagt ggattctgtc aaaaaactaa atgacaaaga agtaacaaca acaacaaca 9480  
aataataata ataataataa taataataat aataataata atattattat tattattatt 9540  
attattatta ttattattat tattatttgt gtgtgtgtgt agtgtotgga cacataggtc 9600  
aagctgagct tgaactcagg acaatcctca tcaactgttt tgagctcttt atatcaactg 9660  
gagctggaga gtgtagctca ggagctcaac agtacctgcc agagtgacag gagttagctt 9720  
ccaagcaoct atgtagagta tgctcacaac cagatgtaat tccaaagtgt tcaatgcct 9780  
cttctagcct cccagggcac cctctctctc ctctctctct ctctctctct tctctctctc 9840  
tctctctctc tctctctctc ncccccata cagtaccaat ggtaagatgg ttttagcagg 9900

ES 2 587 344 T3

aatcgcocaa gcoctggagac ctgagttcta tottaggacc cacataaagg ttaagggaga 9960  
gaacgcagtg cacaaagtta tcccctggct ttcacatgtg tgttatggca tgcacatgca 10020  
tacatacata catgcataca tacatacata catacataca tacatacata gacagtgaca 10080  
aattaaaata atacotcatt ggtcagtcac tgcacccott taatcccage actcagaagc 10140  
cagaggcagt tggaaactctg taagagtgga gccagcotgg tctacagagt gagacttttt 10200  
ctttttttct ttttttttta aagatttatt catttattat acgtaagtac actgtagctg 10260  
tcttcagaca ctccagaaga gggagtcaga tctcgttaog gatggttgtg agccaccatg 10320  
tggttgctgg gatttaaact cctgacctc ggaagagcag tgggttgcct ttaccactg 10380  
agccatctca ccagccccga gattttttct catcacctcc ctacccaat ccatatactt 10440  
gattaaagcc caggtctgga gagccatgcc tgtagtctca gcattgggca gctgaagtag 10500  
atggaccacc atgatttcag tttatcctgg gcttcagagt gagtttaaga ccagtctggg 10560  
taatttaaca gagaacctgt ctcaaaataa aatctacaaa ctatactagt tttataggtg 10620  
ttcagcatcc cttggtagag ttgagactca gaaagacggg caatgcctcc atcccctggg 10680  
aatgtgtcta ccaactcaca caatctacct gtttgatttg cttaggacc catagataac 10740  
agcagcttg aatcaacta tgatcactat ggaaccatgg atoctaacat acctgoggat 10800  
ggcattcacc tcccgaagcg gcaacctggg gatgttcag ccttatcat ctactcggtg 10860  
gtgttctctg tgggagtacc tgggaatgcc ctgggtgtgt gggtgacagc cttcgaggcc 10920  
agacgggcog tcaacgccat ctggtttctg aatctggcgg tggccgacct cctctcgtgc 10980  
ttggcactgc ctgtcctggt cagcaccgtt ttaaatacata actactggta ctttgatgcc 11040  
accgcctgta tagtctgccc ctgcctcacc ctgctoaaca tgtacgccag tatcctgctg 11100  
ctggctacca ttagtgccga ccgtttctct ctgggttca agcccatctg gtgtcagaag 11160  
gtccgcggga ctggcotggc atggatggcc tgtggagtgg cctgggtctt agcattgctc 11220  
ctcaccattc catcctctgt gtaccgggag gcataaagg acctctactc agagcacact 11280  
gtatgtgta ttaactatgg tggggtagc ttccocaaag agaaggctgt ggccatcctg 11340  
cggctgatgg tgggtttgt gttgcctctg ctactotaa acatctgcta caocttctc 11400  
ctgctcogga cctggagtgc caaggccaog cgtccacca agacgctcaa agtgggtgatg 11460  
gctgtggtca tctgtttctt tatctctctg ctgcctatc aggtgaccgg ggtgatgata 11520  
gogtggtctc cccgctctc gccacctg aagagggtgg agaagctgaa ctocctgtgc 11580  
gtgtccctgg cctacatcaa ctgctgtgtt aacctatca tctacgtcat ggotggccag 11640  
ggtttccatg gacgactcct aaggtctctc ccagcatca tacgaaacgc tctctctgag 11700  
gattcagtg gcagggatag caagacttct actcogtoca cgacggacac ctcaaccgg 11760

ES 2 587 344 T3

aagagtcagg cgggtgtagag gagaagccac aactggccta gctgctcctt ttccagccct 11820  
cctaccccoct cctcttcttc ctctctctgc ctctctctct tocttctctt cttctctttg 11880  
catgtttaat tttctgcaat tctotaagtt gctctgacta gcottgagcc caggatctct 11940  
atgaaggctg agattataaa tataaattcc tttgatgaaa agcatcacat taagatagta 12000  
ctoggctttt tttctaaggc tttttttttt tttcttggct aogttgocca cctgcagtgg 12060  
ctaggcagat acacctaata atgacctoca ggggttggat aacagagaac aagagaatth 12120  
cctggccttc ttcttctctt ctctctcttc tttttccctc ctctctcttc ttctctctct 12180  
cctocctttt ttttttatg gttctggctt gaaccaggt ctcaatggaa cccagggctt 12240  
atggatatal cacataagca agctacagcc ccaaaccoca ggcaaccagt atccaccac 12300  
cctttatthc ttttctatgt ttgatttttt ttttttttga gacaaggtct catgtagggt 12360  
agtctggcct tgaactccag atctctctgt gaccatctcc caagtgtcgt gactgtagac 12420  
ctgtgctgtt gtgtccgacc tatcttttat ttctacaatt ttgtgttttc aggaatggta 12480  
tttaatggaa cccaacatat ccaagctttg taaaaacaac tatgcatggc ttacttgata 12540  
aatthttttt ttttaaaaag gtacagaaat gtgttgttta actthtttaa agcacgtatt 12600  
tattttatth gtggggggtg aggggggtgt gctgggcaaa tgtcatggta tatgtgtgga 12660  
ggtcagagga caacctgtt aaattggctc tctcattgca accatgaagg tctcatgga 12720  
atcgaacca ggcatcata ctggcagca aacacctta cctgctgagt cacatcactg 12780  
gocagaggtg tctgtctta taatgcgttc tttcagctta atgaatgtgt gtgcatgagt 12840  
gtatgtgttg gctagaaaat atgtacagat caacaccaga agtatcatgc aagcatggga 12900  
atggthttga atthctgtgt caaattaaaa atgtgaaaga agacctgggt gtgtgggoc 12960  
aaacctatat cccagcatgt gggaggttca ggggccagaa ttgagthtta gaaccagcc 13020  
tggcttacc caggagactg tctcatgaga tccaaataaa cagtatatga tggaaaacac 13080  
tggagthtag ctctgctagg cctctctctc ttcccagtg atatgtgacc actggttctc 13140  
acatatcaca gaccagcct acctgtgttc tgctatcacc actthctata tgatgacact 13200  
aacctcactg aatthttaca ggtccatgc ctggcattt attatthtg taththtta 13260  
thttgagaca ggatctctt acatagccct agctgtctg gaactcacta tgtgaaccag 13320  
gctggcctag aactcagca gatgggctg cctccatctc ctgagtcta ggattaaga 13380  
catgagccac cacatocagc thtattctat gthttgtatg gctctatga gthtgaaaca 13440  
thtaatcaat tagthtgtha atthaatta atatgagatg ggatctcatg tagcccaggc 13500  
tagccttaag ctggtthtac agctgaggtg ggattatagg tagtctctt gactcccagt 13560  
tgtctccctc thgtggctt tctcattatc ggtcacatct gtattgccac agctgagctt 13620

ES 2 587 344 T3

etcaccact gaccatgcc ccagctgtcc caagaacctc ttctcccct tgcttttcca 13680  
 ttccaggaaa aaccactg gaaacctgt caccaggcc ctttcagctg ccccatcaca 13740  
 gaccagccc tcctttotta ccacacacc ggctctacat cctgcccccc cccccgcac 13800  
 cccccccgc ctcttcatg cctctccctt cccttgatct cctggttgcc cagcacctct 13860  
 tccaaggacc atctgtctc catctgtct tcttgccagg tgcacctcc ttaagggagt 13920  
 cccctgtgac agccctcagt ttcccataag caccctacca tcaattcttt totctggctg 13980  
 cgattgagct tcctggttca gggagtaagt agtaggtagg gattcacctc cttctggcct 14040  
 tgctgtaatg agatgctgtt ttaagggttg ggcgagggc tggggctagg ggggtgggtg 14100  
 gggttagaaa gacggatcag tgattaagag catttgatgt tcttttagag cagcggttct 14160  
 caacctctgg gtctcaacct ctttgcaaa cttctgtttc caaattatct acattccgat 14220  
 tcataactag caaaattaca gttttgaagt agaaatgaaa ataactttat ggtttggggg 14280  
 gaaactgag agtgaggaac tgtatttaag ggtcataggt cgtagcatca tgaaggttga 14340  
 gaactactgt tttaaaggat tagttcagtt cccagcatcc acatagtgtc tcctaatgat 14400  
 ttgtaatggc tgccttggac accaagcca cacatgctgg acatacatgc aagcaaaaa 14460  
 cccatacata taaaattata tataatatgt aagctgggcc caggatacag tgtttcagtt 14520  
 cagtaggtag catgctggcc taacacgca aagcctctgg ttcagtcccc tgcactgaat 14580  
 aaaatctcca atagtgggtg ggtgtgggtg tacatgcatt taattccagc actccagaca 14640  
 cagatgcagg cagacctctg ggagtttgag gccagctact tagtgagctc caggtcagtc 14700  
 caagtgagac ttggtttcaa aataaaaaa atatatacac acaagaaac taaatctgca 14760  
 tgggtgattt aggaggtaga ggcaggaggc tcatctagtc aaggagagtt tgtggctagc 14820  
 ctgggtaca tgaggccatt ctgggtaca tgagcctctg totgaaaaca caaacaanaa 14880  
 caaatgaaca acaaaacaaa caacaacaaa aatcccagcc aggcttggtg acaagcattt 14940  
 gggagacggc cataggtgga cctcctgag ttcaggctgc agagagaggc cagtttaaaa 15000  
 ccaaaacgag acaaaaaggg atgctcagtg gtttaagagc attggctgct gctcctccag 15060  
 gggactgagg tttccttccc agaaccaca ggcagctca caactgtctg tagctccagt 15120  
 tccaggggag ctgatgcagt ttctctgct ccaacaggcat ggtgtgtagc acgcagatat 15180  
 acagacaaac cactcatgca ccaaaggcaa aaataatta atctaaaaga aaggaaggaa 15240  
 ggaaggaagg aaggaaggaa ggaaggaaga aagaaagaaa gaaagaaaga aagaaagaaa 15300  
 gaaagaaaga aagagaaaga aagacaggaa ggaaggaagg aaggaaggaa ggaaggaagg 15360  
 aaggaaggaa ggaaggaagg aattggacat acagcaggtg gtggctatgt tgagagacc 15420  
 ccacccagg tgactcccag gcaggtcagg gtaagcaac gcagctcaa acagaagttt 15480

ES 2 587 344 T3

gcagagtcca ggggattgcc aaatgtgtgg cctgtggaat ctgcttatgt caacagggtt 15540  
 ggaaggggaa gtgagcagga aaggaagtgg gctgagagct tggcggactc tagtgtgttc 15600  
 tttctcctcc cccagcccca gccttctgga cccttgggtc ttacacacct atctgttctt 15660  
 cagatgcagg gctccaaggc ctggggccag agccgccttc ccttgtaacg gtgacctccg 15720  
 ggagctcaca tccaggaagc tgttacattg cagtagagtc ttctgggatg aaatatgagg 15780  
 ggctgggaga cgggtcagtg agtaaagtgt ttgccattta aacataagga tatgcgttcc 15840  
 agcccaggct atggatttgc ctggtacaga ggcacggtag gttgtgtttg taacctcagc 15900  
 acgggagagt gagacagatg gatctctagg gcttgctgac cagcaggcct gggtaatca 15960  
 gtgagcatct agagcaagtt gagagccttg gtctctaaac acaagtgga aggaaagga 16020  
 gggccctgga gaggtgttcc ataggtaccg ctctcagcag caagcactct cacctgagga 16080  
 gccctagccc tagctctact actgagccac actcccagcc cctcattggt gaggttcttg 16140  
 ttctgttgag ccaggccccc aatcctttgc tggaggattc taggcaaata tcctaact 16200  
 gagctgtgca ctgctccaga ccttttatca tcttggcaca tctgttgacc aggtaagtct 16260  
 cccatgttga ggtgtggaga acactgaggc ctttcaggat gagagagaga gaggagagge 16320  
 ctgcatcaca gaatctgtag tgccttgacc cagaagcaat ttctctaac aacatgactt 16380  
 tatgctctaa atatcaacag aagaatttgt gaccgcatcc ttctcagcct taagcaagge 16440  
 tcagagagaa agacgacct caggaactgc tgagtgcga gagtccatgt cagggttgag 16500  
 gccatgtcct gctcgggtgc ctaagcctgc accatgctgt aggtgtatag ttaagacag 16560  
 tgtactctag ggcacacttt aattcccaca attgggaagc tgaggaaagc aaatctgtga 16620  
 gtttgaagtc actctggcct acgtgagacc ctgtctcaaa cccaaccaa ccaaatcaa 16680  
 accaaaccaa acccagccac tatagccaac ttcttttttg ttcttgtcat tactactact 16740  
 actacaaata ataataataa atatctaata ataattttca ctttaaatat ctgtgcacat 16800  
 gggcctgtga gagtcacagt ttgtatttga aggtcagagg ctagccttaa ttctagagct 16860  
 ttcttttota ctttgagaca gagtctcttg ttgcttgtaa tggcaaagge cagctggccc 16920  
 acgtttccag ggattttgac tccctggetg tottcccttc tgaacgctgg catcacatac 16980  
 atatactact gaatgtggct atttatatgg ttccagaact tcaacctoag gtccccatgc 17040  
 ttgtgtgaag agcacattcc ccaccaatcc acccatgggg accggacaga tctctcccgt 17100  
 gagctcccc ttgcctctgc ctccggagtg ctggagtgc aagcatgttc tcctatgctt 17160  
 gctgtcttcc cattttacag glaaaaaaaa cagaggocca gaaaggggac aggatttgct 17220  
 tattttgggg catgtggggg tttgagacag gttttctota tgtagtcttg gctgtctctc 17280  
 tgtgactctt ggetggcctc gaactcagag acctgtctga gtgctgtgat caaaggtgtg 17340

ES 2 587 344 T3

cggcaccact gcatgacagg acttgcattt tatgttcccc ggaaacctca ggccctgggc 17400  
 tcagcttctt gatctttctg aggagggttc attctgggct atcatcctca caacatttga 17460  
 ggaaggaaag atctttaaga gtctgtggct ggcaggaatg agaggcagag aacagcgcag 17520  
 cgggtcagtg gagggttagc aggcgcctgg tgattactgc agaatcttag gggtccttta 17580  
 gtgccaaggg tgggtgggaa gtggtttcag agatagccct ccagaccttg ctgttcaaag 17640  
 cccacacacc tctggcttcc aggaagctga tagtagtgag gctgcgggtg gaggcacaca 17700  
 ctttcggctt ttcgacctt tctgtctgtg ggtaatttg tgactcacgg ggaggaagaa 17760  
 aagacaacta tttccctggg gctagcggag gccacgcctg tttttcctgg ttaagaaggt 17820  
 tgcgcagggc cctcagagaa tcccatagga tctggggaag ggttgcattg ctgagactca 17880  
 ggcccgctac tgtccctggc ggagagactc tgggcttctc tgcggctgct gaggctctgct 17940  
 gtgcttgtgc attcggccaa tttgggacca gtcagaagag aggtgaggaa gggaggcata 18000  
 aaggaggttg cgagaagggg tggagaggct cataatgttt gccttagaag ctttcatttt 18060  
 gaaatcttgg gagtcagaat tagcattcca gattatataat gtgtatattt cctgagacaa 18120  
 gagctcatgc tgtccaggct gacctcaaac tcaactatgta gttgaggtga tctogaacac 18180  
 cagagtgtcc tgcctccacc tccagagtac agggatcacc aaacacaggt tatgtagtgc 18240  
 tgggagcaga gctcagggac tttggcactc taccaactga gccacacccc cagccctgaa 18300  
 tcatataaaa taatctgttt cattacgaca tttatattat atatgaatgt tcttgagttt 18360  
 tgetcaaatt caccaccatc tcttttctca tcagcttgta tgttgttgtt gttgttgtta 18420  
 ttattgatac aaaatatctc tacgtagctc tgactgtctt ggaattcgtt atgtagacaa 18480  
 ggotggattc acagaaatcc acctocctct gcttcagag cactgggatt aaaggcatac 18540  
 tcoctggotta tacttaaaag tggcaatttg gagctgaaga gatggctcaa tggtaagaa 18600  
 catgcaatgt tctttcagag gtcctgagtt aggttctcag aacctctt atcagtggct 18660  
 tacgaaaccc tgtaactcct gctctagggg gtcagatgcc ttcttctggc ccagcaggt 18720  
 aactgcacac atgtggccaa caottgtgtg catagacata tgtaaaataa tggcaataat 18780  
 attttatgta ttgtgtatag agccaaacaa atataaatga tttactgtaa aagaaagcaa 18840  
 tgtcactggg tgcagaagtg tccatttgta atcocagatg agaaggcaga taagaaaaga 18900  
 aoggtttctt ttactctctg gcccatctgt tgagccagtt ggcaaacctg aggttctgtg 18960  
 agatatccag tctgaaaaaa tgtggagggc tggaggggtg ggctcagtgg tagaccccct 19020  
 gcctagaatc cccagtgag gggctggggc cgtggctcac agccggagcc ccttgtaag 19080  
 ctggaaagcg ggagatagcg cgagatagag aggggggtag acggagagag agagagcag 19140  
 agagagagag agagagagag agagagagag aacatgaatt ctgggaacca tcoctgtctc 19200

ES 2 587 344 T3

tctttacaga ggaaatacca taggctgata gtgactgagt acagaaactg tcccagacta 19260  
 ttatcagtag tagctgtgaa gggtaggggc agagatggga agagaggtag tgataacagc 19320  
 agttcacaca cacatacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 19380  
 caaacacaca caccgagcagg cacaccctgt ctgctgtttg ctgtggacga gcactgtggc 19440  
 agcctgtctc catagcagat ccgctaacta cactgactat ccgagcgcct cgctctccca 19500  
 ggtggggctc gtgattatcc ctatacaggt acacagagat tccgcagcct gttgaaggcc 19560  
 acacagctat tgaagcttg agtttttgta ctcttggtat gctctatatt gcttgttttg 19620  
 tttgtttggt ttgagatgag ggtcttaact tatagcccag gttggcctca aaatoatggc 19680  
 atttctcctg cttcagcctc tgagtgcctg ggtgacaggt gagttttgt tttgttttgt 19740  
 ttttaaacag gtacagttta ctttaaggaa ggaaaactac tcagaaaaat ggcttggcct 19800  
 catagctggc tacctggcag agctgagagt gtcccaattt ccgctctgtc ctctctgttt 19860  
 taacagtgtt ggccaaggct ttgggcagtg ccagacaacc cataaatagt cagatgagag 19920  
 ctgcaggttc cagcactcc agacatgggg ttgggtgtcc cctcccgccc aggtcctgtc 19980  
 ctcccccgcc tgetttgtgt cttgtgtgtg tttcttaggc tttagttott ctgtcccacc 20040  
 aaactggtga gctgggtcct agaggaggat gtgcacagac agagccagcc gtgactgccc 20100  
 gtcagctcag ggccaagggg atacacggct gactagcttc ccagtttctc acatctgggg 20160  
 coggtaatat ttctggactc cctagggaca cgotgcaatt cagttctgtc ttcttagctg 20220  
 agtgatttta actaagttac tcacctctc tctgctctt tagctgcaga atcggcttac 20280  
 caagactgta tcaaaacaca gtgttgaaag gtgtttgggg ccaggccttg cacgtgcaca 20340  
 aaatggtgcc ctctaatatc ctaaaactat tattattatt ttattaggtt attttgtgtc 20400  
 ttagttaggg tttttattgc tgtgaagaga caccatgagg ggctgggggc gtgactcagt 20460  
 ggtagaacac ccacctaaaa tccccaggg gcacacgcaa ctctctctct ctctctctct 20520  
 ctctctctct ctctctctga cagggtttct ctgtgtagcc ctggctgtcc tggaaactgc 20580  
 tttatagacc aggtggcct caaactcaca gagatccctc tgctctgct ccaagtgtctg 20640  
 gaattaagtt gtacaccacc actgcctggc taattatttc tatcttaata gttctctttc 20700  
 ctgttgcttg tgatgaaata ctccacagcc agatgtggtg gcacactttt ttatoccaag 20760  
 acacttggga ggcagaggta ggtaaatttc tgtgagtttg gggccattct ggtotacata 20820  
 aaatactctt aaagggtac ttaagggaga aggtacttat tatagattat tatatattat 20880  
 gtcattatat attatatata atctagagaa ttaatattat aatatttcta taatacatac 20940  
 tatgtaatat aatattaata tcaatacaat tatattatct actattcatt atacattaat 21000  
 atata 21005

<210> 2  
 <211> 2328  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 587 344 T3

<400> 2  
 agggggagcc caggagacca gaacatggac tccttcaatt ataccacccc tgattatggg 60  
 cactatgatg acaaggatac cctggacotc aacaaccctg tggataaaac ttctaacacg 120  
 ctgctgttcc cagacatcct ggccttggtc atotttgcag tctcttccct ggtgggagtg 180  
 ctgggcaatg cctgggtggt ctgggtgacg gcattcgagg ccaagcggac catcaatgcc 240  
 atctggttcc tcaacttggc ggtagccgac ttctctctct gcctggcgct gcccatcttg 300  
 ttcaogtcca ttgtacagoa tcaccactgg ccttttggcg gggccgcctg cagcatcctg 360  
 ccctccctca tcctgctcaa catgtacgoc agcatcctgc tcctggccac catcagcgcc 420  
 gaccgcttcc tctgtgtgtt taaaccatc tggtgccaga acttccgagg ggcggcttg 480  
 gcctggatcg cctgtgccgt ggcttggggt tttagcctgc tcttgaccat accctccttc 540  
 ctgtaocggg tggtcgggga ggagtacttt ccaccaaaag tgttgtgtgg cgtggactac 600  
 agccacgaca aacggcggga ggcgacgtg gccatcgtcc ggtggtcctt gggcttctctg 660  
 tggcctctac tcacgctcac gatttgttac actttcatcc tcttccggac gtggagccgc 720  
 agggccacgc ggtccacca gacactcaag tgggtggtgg cagtggtygc cagtttcttt 780  
 atcttctggt tgcctacca ggtgacggg ataatgatgt ccttccctgga gccatcgtca 840  
 cccaccttcc tctgtctgaa taagctggac tcctgtgtg totcctttgc ctacatcaac 900  
 tctgtcatca acccatcat ctactggtg gccggccagg gcttccaggg ccgactcggg 960  
 aaatccctcc ccagctcct ccggaacgtg ttgactgaag agtccgtggt tagggagagc 1020  
 aagtcatcca cgcgctccac agtggacact atggcccaga agaccaggc agtgtaggcg 1080  
 acagcctcat gggccactgt ggcccgatgt cccttctctt cccggccatt ctccctcttg 1140  
 ttttcaactc acttttctg ggtggtgtt accttagcta actaactct ctccatgttg 1200  
 cctgtcttcc ccagacttgt ccctctttt ccagcgggac tcttctctat ctctctcatt 1260  
 tgcagggtga aacttctct ctagggagca cctcccacc cccaccccc cccacacac 1320  
 catctttcca tccagcctt ttgaaaaaca aacagaaacc cgtgtatctg ggatatttcc 1380  
 atatggcaat aggtgtgaa agggaactca gaatacagac aagtagaaag attctcgtct 1440  
 aaaaaaatgt atttatttta tggcaagttg gaaaatatgt aactggaatc tcaaaagttc 1500  
 tttgggacaa aacagaagtc catggagtta tctaagctct tgtaagtgag ttaatttaaa 1560  
 aaagaaaatt aggtgagag cagtggctca cgcctgtaat cccagaactt tgggaggcta 1620  
 aggtgggtgg atcactgag gtcaaggtt ccagaccagg ctggccagca tggtgaaacc 1680

ES 2 587 344 T3

cogtctgtac taaaaataca aaaaattaac tgggcatggt agtgggtgcc tghtaatccca 1740  
 gctacttggg aggctgaggt gggagaattg ctcgaacctt ggaggtggag gttgtggtga 1800  
 gccatgatcg caccactgca ctctagcctg ggtgaccgag ggaggtctctg tctcaaaage 1860  
 aaagcaaaaa caaaaacaaa aacacctaaa aaacctgcag ttttgtttgt actttgtttt 1920  
 taaattatgc tttctatfff gagatcattg caaactcaac acaattgtaa gtaatgatac 1980  
 agagggatct tgtgtaccct tcaccagcc tcccccaatg gcaacatctt gcaaaactac 2040  
 aatgtagtct cataaccagg atattgacat tgatacagtg aagatacagg acattctcat 2100  
 caccacaggg atccccagga tgcccacttc cctccacccc cacaccccag cegtgtccct 2160  
 aaccctggc aaccaggaat cactctcca tttctataat gttgtcattt caagaatgtt 2220  
 attcaatgga atcatatagt atgtaacctg ttttgagctt aaaaaaaaaa gtatacatga 2280  
 cttaatgag gaaaataaaa atgaatattg aaaaaaaaaa cttagag 2328

<210> 3  
 <211> 350  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3  
 Met Asp Ser Phe Asn Tyr Thr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr Pro Val Asp Lys Thr Ser Asn Thr  
 20 25 30  
 Leu Arg Val Pro Asp Ile Leu Ala Leu Val Ile Phe Ala Val Val Phe  
 35 40 45  
 Leu Val Gly Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Val Trp Val Thr Ala Phe  
 50 55 60  
 Glu Ala Lys Arg Thr Ile Asn Ala Ile Trp Phe Leu Asn Leu Ala Val  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Phe Leu Ser Cys Leu Ala Leu Pro Ile Leu Phe Thr Ser Ile  
 85 90 95  
 Val Gln His His His Trp Pro Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser Ile Leu  
 100 105 110  
 Pro Ser Leu Ile Leu Leu Asn Met Tyr Ala Ser Ile Leu Leu Leu Ala  
 115 120 125

ES 2 587 344 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4  
 < 211> 22  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Cebador

<400> 4  
 tggactacag ccacgacaaa cg 22

10

<210> 5  
 < 211> 22  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

# ES 2 587 344 T3

<220>  
< 223> Cebador

<400> 5  
aggaaggaca tcattatccc cg      22

5      <210> 6  
         < 211> 21  
         < 212> ADN  
         < 213> Secuencia artificial

10      <220>  
         < 223> Cebador

<400> 6  
caccagcccc gagattttt c      21

15      <210> 7  
         < 211> 18  
         < 212> ADN  
         < 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Cebador

20      <400> 7  
         tcagaaacca gatggcgt 18

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ratón transgénico que comprende y expresa un polinucleótido que codifica un C5aR humano o humanizado, en el que se ha sustituido de forma dirigida la región que codifica C5aR del exón 3 endógeno del locus de C5aR de ratón por una secuencia correspondiente que codifica C5aR humano o humanizado y en donde dicho C5aR humanizado difiere de C5aR de ratón codificado por dicho locus de ratón en que los dominios extracelulares se sustituyen por dominios extracelulares correspondientes de C5aR humano.
2. Un ratón transgénico según la reivindicación 1, que comprende un polinucleótido que codifica un C5aR humano.
3. Un ratón transgénico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el polinucleótido codifica C5aR humano que comprende una secuencia tal y como se muestra en SEQ ID NO: 3, o una variante alélica de la misma.
- 10 4. Un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polinucleótido comprende una secuencia tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2, o una variante alélica de la misma.
5. Un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ratón transgénico es homocigótico para un C5aR humano o humanizado.
- 15 6. Una célula aislada, una línea celular, un tejido o un órgano obtenidos a partir de un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo y expresando la célula aislada, la línea celular, el tejido o el órgano dicho polinucleótido que codifica un C5aR humano o humanizado y en donde dicho C5aR humanizado difiere de C5aR de ratón codificado por dicho locus de ratón en que los dominios extracelulares se sustituyen por dominios extracelulares correspondientes de C5aR humano.
- 20 7. Un método para producir un ratón transgénico para someter a ensayo compuestos para estudiar un efecto sobre un fenotipo asociado con la señalización de C5aR, comprendiendo el método una sustitución dirigida de la región que codifica C5aR del exón 3 endógeno del locus de C5aR de ratón por una secuencia correspondiente que codifica C5aR humano o humanizado, por lo que dicho ratón expresa un C5aR humano o humanizado y en donde dicho C5aR humanizado difiere de C5aR de ratón codificado por dicho locus de ratón en que los dominios extracelulares están reemplazados por dominios extracelulares correspondientes de C5aR humano.
- 25 8. Un método según la reivindicación 7, en el que hay una sustitución dirigida de la región que codifica C5aR del exón 3 endógeno del locus de C5aR de ratón por una secuencia correspondiente que codifica C5aR humano.
9. Un método según la reivindicación 7 u 8, en el que dicha sustitución dirigida proporciona una estructura artificial de polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia tal y como se muestra en SEQ ID NO: 3, o una variante alélica de la misma
- 30 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde dicha sustitución dirigida proporciona una estructura artificial de polinucleótido que comprende una secuencia tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2, o una variante alélica de la misma
11. Un método según la reivindicación 7, en el que dicha sustitución dirigida proporciona una estructura artificial de polinucleótido que comprende al menos los dominios extracelulares de un C5aR humano.
- 35 12. Un método para evaluar al menos un efecto farmacocinético y/o farmacodinámico de un compuesto candidato, comprendiendo el método administrar un compuesto candidato a un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un tejido aislado o células obtenidas a partir del mismo según la reivindicación 6, y examinar al menos un efecto farmacocinético y/o farmacodinámico del compuesto candidato en el ratón transgénico.
- 40 13. Un método según la reivindicación 12, que comprende (i) administrar un compuesto candidato a un ratón transgénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un tejido aislado o células obtenidas a partir del mismo según la reivindicación 6, en condiciones en las que se expresa al menos un fenotipo asociado con la señalización de C5aR; y (ii) realizar un seguimiento de la evolución del al menos un fenotipo después de la administración del compuesto.
- 45 14. Un método según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste en: un péptido, incluyendo un péptido obtenido a partir de C5aR o C5a u otro péptido que no es C5aR y que es capaz de inhibir, reducir o reprimir una función de C5aR; un mutante dominante negativo de C5aR; un inhibidor no peptídico de C5aR; un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a C5aR e inhibe una función de C5aR; una molécula orgánica pequeña, un ácido nucleico que codifica dicho péptido obtenido a partir de C5aR o C5a u otro inhibidor peptídico que no es C5aR, un ácido nucleico antisentido dirigido contra ARNm que codifica C5aR, una ribozima anti-C5aR y un ARN pequeño de interferencia (ARNi) que se dirige a la expresión del gen C5aR.
- 50

### Construcción de un ratón con el gen C5aR humano activado

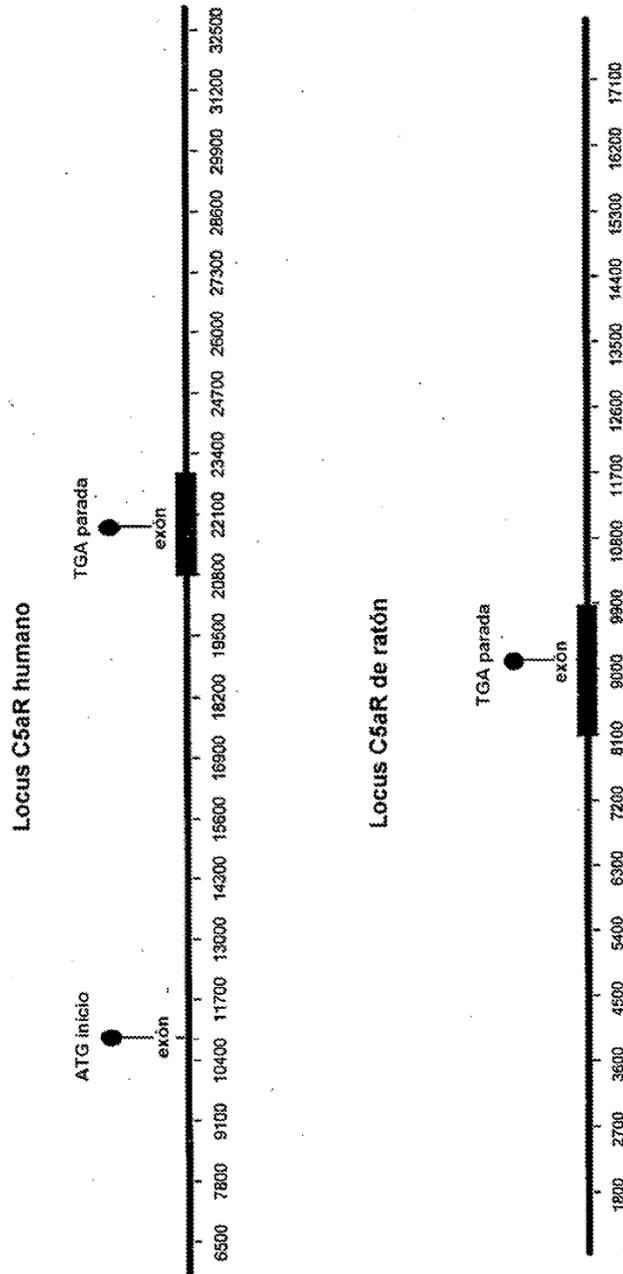
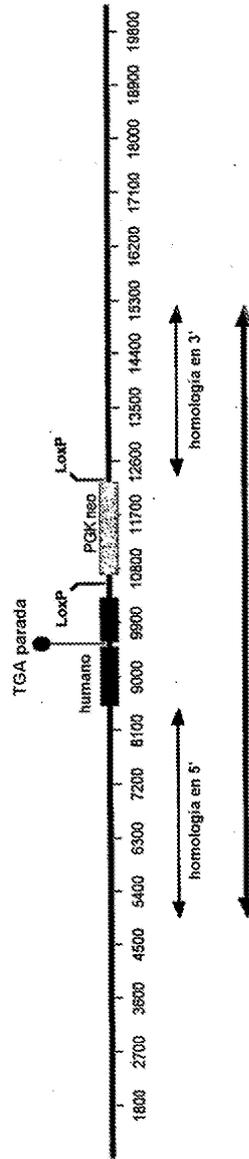


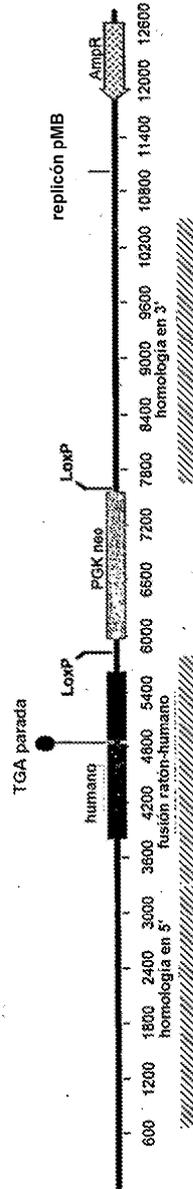
Figura 1

**Construcción de un ratón con el gen C5aR activado**

**Locus del C5aR de ratón señalado como diana**

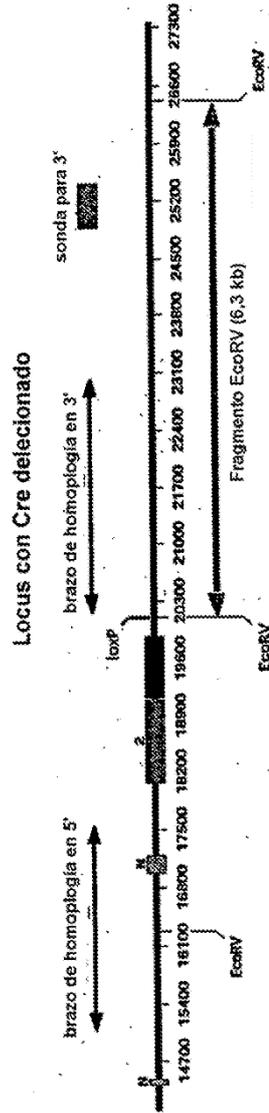


**Vector con la diana**



**Figura 1 continuación**

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



**Figura 2**

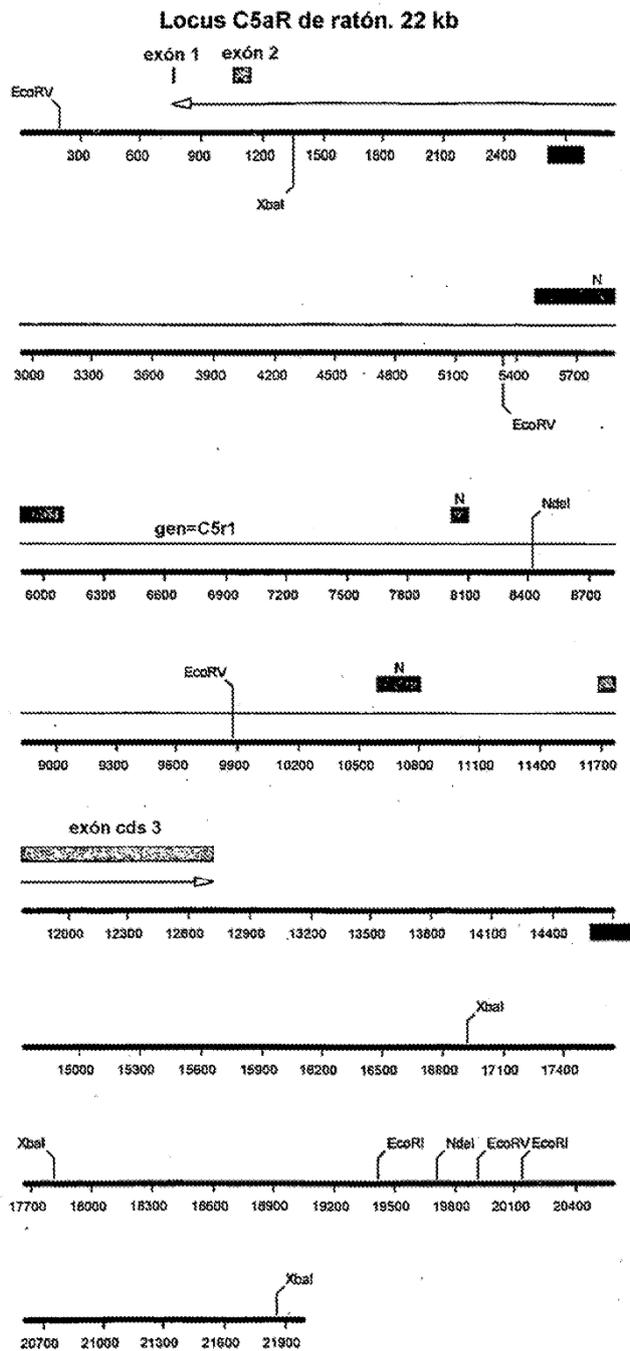
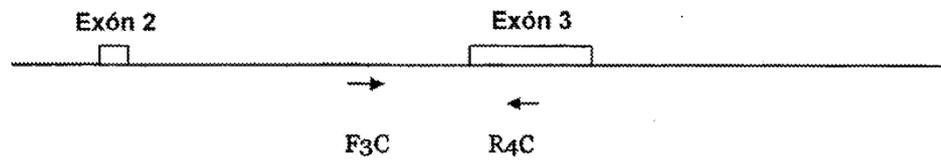


Figura 3



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

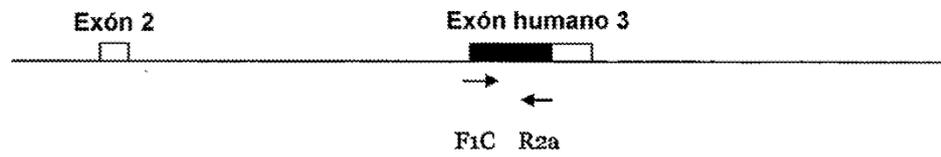
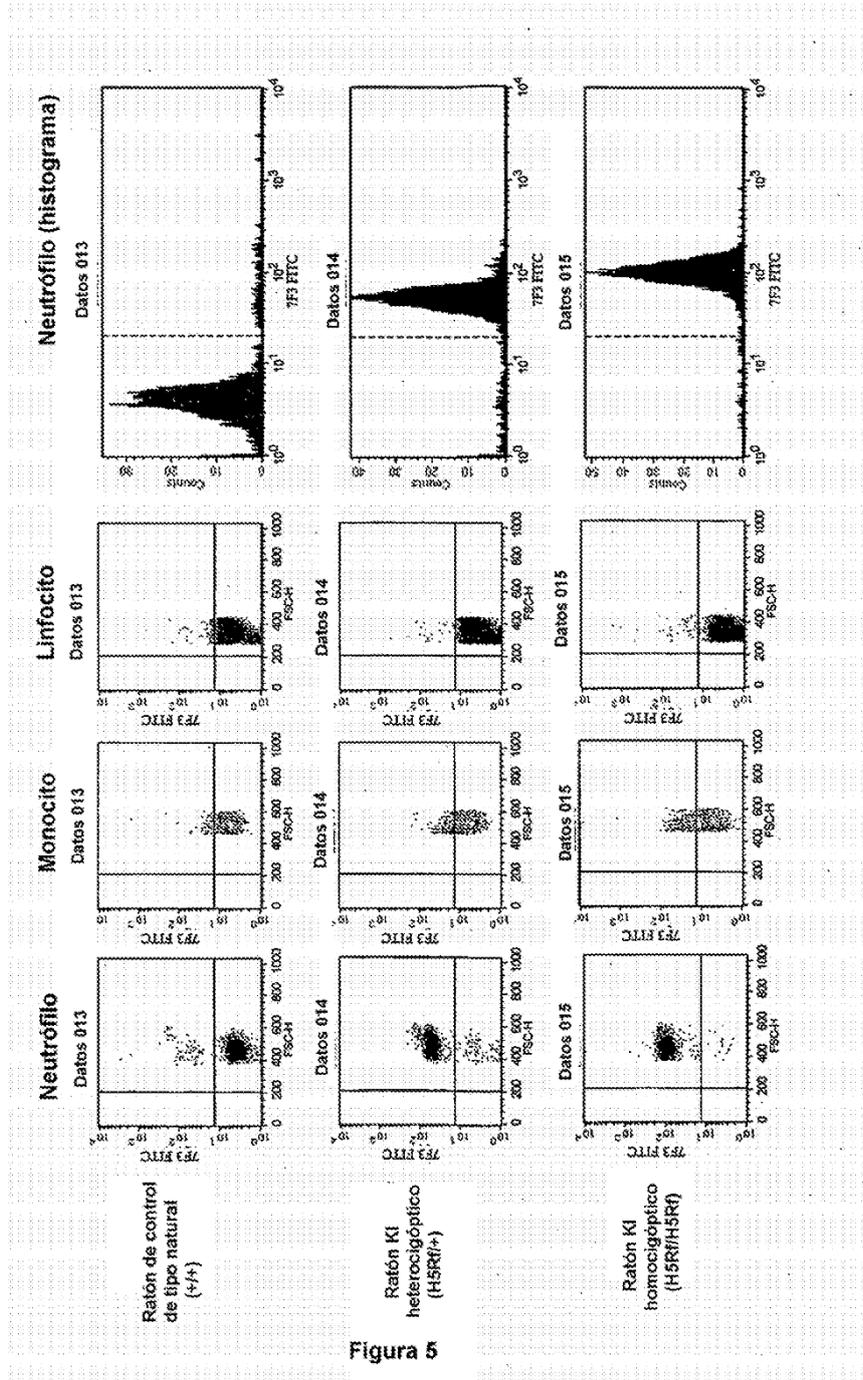


Figura 4



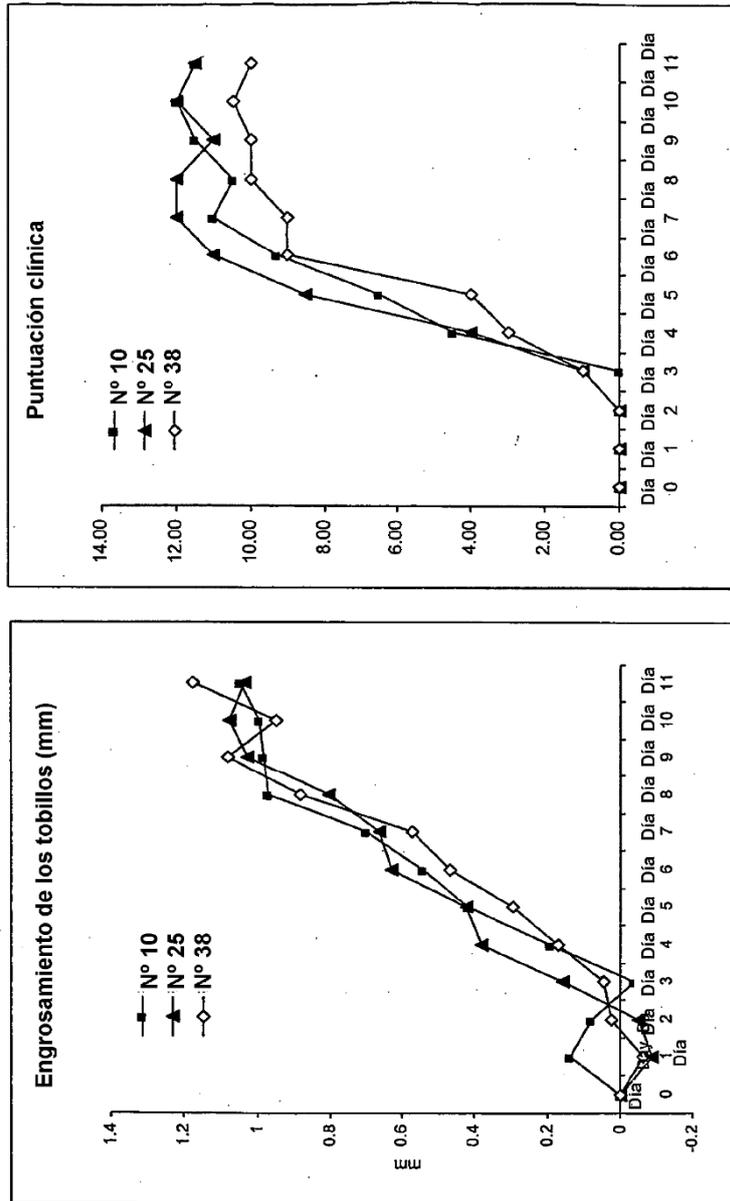


Figura 6

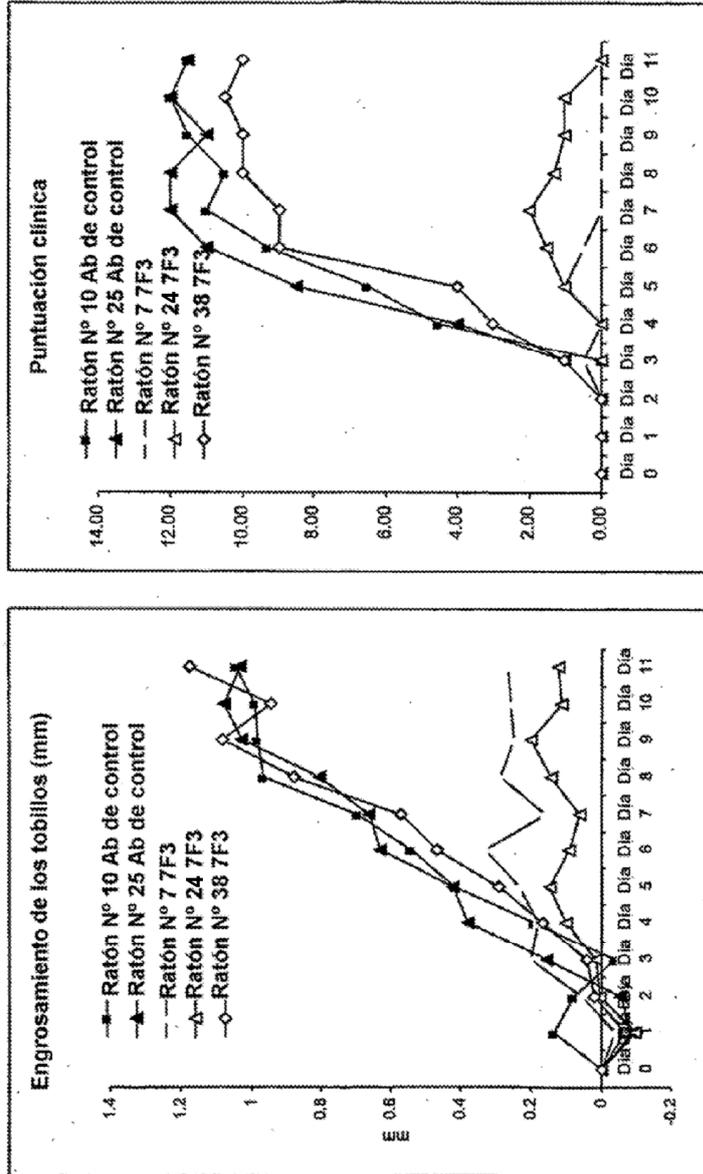


Figura 7