

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 184**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2014 PCT/EP2014/062529**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14202515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2014 E 14729929 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 3011340**

54 Título: **Moduladores del receptor MRG**

30 Prioridad:

18.06.2013 EP 13172485

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

14.03.2018

73 Titular/es:

**BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT
(100.0%)
Müllerstrasse 178
13353 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**GOLZ, STEFAN y
MICUS, SINA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 659 184 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

Moduladores del receptor MRG

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se encuadra en el campo de la biología molecular, más en particular, la presente invención se refiere al cribado de fármacos, el desarrollo de ensayos y la identificación y uso de moduladores para el par receptor acoplado a proteína G/ligando MRGX2/CXCL14 dentro del descubrimiento de fármacos.

Antecedentes de la invención**Citoquinas**

10 Las citoquinas quimioatrayentes o quimoquinas constituyen una familia de proteínas estructuralmente relacionadas que se encuentran en los vertebrados, las bacterias o los virus. Hasta ahora, se han identificado 48 genes de quimoquinas en los seres humanos, que se unen a aproximadamente 20 receptores de quimoquinas. Dichos receptores pertenecen a la familia del receptor acoplado a proteína G de siete segmentos de transmembrana. Las quimoquinas y sus receptores fueron estudiados en principio por su papel en el tráfico celular de leucocitos durante la inflamación y la vigilancia inmune. Hoy se sabe que ejercen diferentes funciones en condiciones fisiológicas, tales como homeostasia, desarrollo, reparación de tejido y angiogénesis, aunque también actúan en virtud de trastornos patológicos, incluyendo tumorigénesis, metástasis de cánceres y enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Las propiedades físico-químicas de las quimoquinas y los receptores de quimoquina confieren la capacidad de homo- y hetero- oligomerizar. Actualmente, se está dedicando un gran esfuerzo para establecer compuestos terapéuticamente nuevos capaces de dirigirse al sistema quimoquina /receptor de quimoquina. En esta revisión, el interés se centra en el papel de las quimoquinas en las enfermedades inflamatorias y el tráfico de leucocitos, con el punto de mira en las enfermedades inflamatorias vasculares, sinergia operativa y los enfoques terapéuticos emergentes de quimoquinas.

CXCL14

25 Quimoquina (motivo C-X-C) ligando 14 (CXCL14) es una citoquina pequeña que pertenece a la familia de las quimoquinas CXC también conocida como BRAK (quimoquina expresada en riñón y en mama) [10]. CXCL14 madura tiene muchas de las características conservadas de la subfamilia de quimoquinas CXC, pero también tiene algunas diferencias, como pueden ser un N-término más corto y cinco aminoácidos extra en la región entre sus cisteínas tercera y cuarta. CXCL14 se expresa constitutivamente a altos niveles en muchos tejidos normales, en los que se cree que la fuente celular son fibroblastos. Sin embargo, en la mayoría de las células cancerosas está reducido o ausente. Esta quimoquina es quimiotáctica para monocitos y puede activar estas células en presencia de un mediador inflamatorio denominado prostaglandina-E2 (PGE2). Es también un potente quimoatrayente y activador de células dendríticas, participa en el desplazamiento dirigido de estas células y puede estimular el desplazamiento de células NK activadas. CXCL14 también inhibe la angiogénesis, posiblemente como resultado de su capacidad para bloquear la quimotaxis de célula endotelial [11]. El gen para CXCL14 contiene cuatro exones y está localizado en el cromosoma 5 en los seres humanos. Hasta ahora no se había descrito un receptor para CXCL14. En la Fig. 1 se muestran las secuencias de CXCL14 humana (con y sin péptido de señal (aminoácidos 1 a 34). En la SEQ ID NO: 1 se da el polipéptido de CXCL14 humana y en la SEQ ID NO: 2 se presenta el polinucleótido de CXCL14 humana (véase Figs. 1 y 2).

40 Los ratones deficientes en CXCL14 no presentan anomalías claras del sistema inmune. CXCL14 suprime el crecimiento *in vivo* de células de carcinoma de pulmón y cabeza y cuello, mientras que la capacidad invasiva de las células cancerosas de mama y próstata parece estar promovida por CXCL14. Por otra parte, se ha revelado según las pruebas que CXCL14 participa en el metabolismo de la glucosa, alimentando circuitos neuronales asociados a la conducta y la defensa antimicrobiana. Sobre la base de los modelos de expresión de CXCL14 y CXCL12 durante el desarrollo embrionario y en el cerebro perinatal de ratones, las funciones de estas dos quimoquinas pueden ser opuestas o interactivas [22].

45 Anteriormente, se ha demostrado que CXCL14 es un quimoatrayente altamente selectivo para monocitos humanos tratados previamente con prostaglandina E2 (PGE2) o foscolina [24]. Sin embargo, los últimos estudios han revelado que las iDC derivadas de monocitos humanos, pero no las células dendríticas maduras, son sensibles a CXCL14 en ausencia de tratamiento PGE2. En los seres humanos, CXCL14 es un quimoatrayente para iDC aisladas de la sangre periférica o inducidas *in vitro* desde monocitos CD14⁺ o células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ [25, 26, 27]. CXCL14 regula a la alza la expresión de marcadores de maduración de célula dendrítica y potencia la proliferación de linfocitos T alogénicos en reacciones de linfocitos mixtos. Por tanto, la quimoatracción de iDC y la maduración funcional de células dendríticas mediante CXCL14 podría contribuir sustancialmente a la vigilancia inmune anti-tumor. Por otra parte, se ha notificado que los linfocitos citolíticos naturales (NK) son quimoatraídos por CXCL14. Muy recientemente, se ha notificado que ratones CXCL14 transgénicos presentan una mayor incidencia de artritis inducida por colágeno como consecuencia de una potenciación de la respuesta Th1 y niveles de auto-anticuerpos elevados [28]. El número total de linfocitos, células dendríticas y macrófagos no cambió significativamente en estos ratones CXCL14 transgénicos, lo que indica una vez más que CXCL14 es prescindible

para la inmunidad en estado constante [22].

Por otra parte, CXCL14 se describe como relacionado con la progresión del cáncer, p.ej. metástasis y angiogénesis. Se describe que CXCL14 está relacionado con la ruta SDF1a-CXCR4 [40] y como gen anti-cáncer [41-43].

Enfermedades asociadas con CXCL14

5 CXCL14 se describe en la bibliografía como posiblemente asociado con enfermedades como puedan ser (pero sin limitarse a ellas). cáncer [12, 15, 19], fibrosis pulmonar [13], infección y actividad bactericida [14, 22], enfermedad renal [16], enfermedad de la mácula [17], colitis [18], angiogénesis [26], artritis [28], diabetes (metabolismo de la glucosa) [22], asma [20], EPOC [83], embolia pulmonar [84], trastornos del SNC [85], cáncer y enfermedades asociadas con la modulación de la ruta SDF1a-CXCR4, actividad de mastocitos, función o inflamación de ganglios radicales posteriores.

10 Sin embargo, aunque la quimioquina CXCL14 está relacionada con diversas enfermedades graves, hasta el momento no se ha descrito el receptor cognado. No obstante, para el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de productos farmacéuticos es de máxima importancia conocer la identidad del receptor de un ligando dado, p.ej., CXCL14 para identificar y estudiar moduladores, es decir, agonistas o antagonistas de dicha interacción receptor-ligando.

15 Sin embargo, con la presente invención, sus autores describen la identificación del receptor MrgX2 acoplado a proteína G como receptor cognado para la quimioquina CXCL14. Esto abre por primera vez la puerta hacia el descubrimiento de un fármaco de moduladores de par receptor-ligando MrgX2/CXCL14

Sumario de la invención

20 La invención se define en las reivindicaciones. La invención se refiere al uso de CXCL14 como ligando para MrgX2 en el descubrimiento de un fármaco.

La invención se refiere al uso de CXCL14 para la caracterización de moduladores de MrgX2 en el descubrimiento de un fármaco.

25 La invención se refiere al uso de CXCL14 para la caracterización de moduladores miembros de la familia Mrg en el descubrimiento de un fármaco.

La invención se refiere al uso de CXCL14 para la caracterización de receptores ortólogos de MrgX2 en el descubrimiento de un fármaco.

La invención se refiere al uso de anticuerpos CXCL14 para la caracterización de MrgX2 y sus ortólogos en el descubrimiento de un fármaco.

30 La invención se refiere al uso de CXCL14 en ensayos de MrgX2 a base de células.

La invención se refiere al uso de CXCL14 en ensayos de MrgX2 sin células.

La invención se refiere al uso de CXCL14 en ensayos de MrgX2 *in vitro*, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, ensayos de unión, ensayos de actividad, ensayos a base de células y ensayos sin células.

35 La invención se refiere al uso de ensayos de CXCL14 para caracterizar un compuesto, péptidos o anticuerpos que modifican la actividad de MrgX2.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: La Fig. 1 muestra la secuencia de aminoácidos del precursor de CXCL14 humana (que incluye el péptido de señal de los aminoácidos 1 a 34).

40 Fig. 2: La Fig. 2 muestra la secuencia de nucleótidos del precursor de CXCL14 humana (que incluye la secuencia que codifica el péptido de señal)

Fig. 3: La Fig. 3 muestra la secuencia de aminoácidos de MrgX2 humano.

Fig. 4: La Fig. 4 muestra la secuencia de nucleótidos de MrgX2 humano.

Fig. 5: La Fig. 5 ofrece una panorámica sobre algunas funciones (pero sin limitarse a ellas) de la activación de mastocitos (Fig. de [79])

45 Fig. 6: La Fig. 6 muestra una tabla con aminoácidos idénticos (en %) de CXCL14 de rata y humana.

Fig. 7: La Fig. 7 muestra la curva de respuesta a dosis de CXCL14 que activa MrgX2 en un formato de ensayo a base de células (ensayo Fluo8) (UFR: unidades de fluorescencia relativa).

Fig. 8: La Fig. 8 muestra la curva de respuesta a dosis de CXCL14 sobre células CHEM1 (ensayo Fluo8) (UFR: unidades de fluorescencia relativa).

50 Fig. 9: La Fig. 9 muestra la curva de respuesta a dosis de PAMP que activa MrgX2 en un formato de ensayo a base de células (ensayo Fluo8) (UFR: unidades de fluorescencia relativa).

Fig. 10: La Fig. 10 muestra la curva de respuesta a dosis de PAMP sobre células CHEM1 (ensayo Fluo8) (UFR:

unidades de fluorescencia relativa)

Fig. 11: La Fig. 11 muestra la actividad de diferentes péptidos sobre MrgX2 en un formato de ensayo a base de células (ensayo Fluo8) (UFR: unidades de fluorescencia relativa).

Fig. 12: La Fig. 12 muestra los resultados del análisis de expresión de células Chem1 y Chem1-MrgX2 (eje de las y-: expresión relativa, eje de las x: línea celular)

Fig. 13: La Fig. 13 muestra la secuencia de nucleótidos de MrgX2 humano de cebador directo

Fig. 14: La Fig. 14 muestra la secuencia de nucleótidos de MrgX2 humano de cebador de sonda

Fig. 15: La Fig. 15 muestra la secuencia de nucleótidos de MrgX2 humano de cebador inverso

Fig. 16: La Fig. 16 muestra la secuencia de nucleótidos de L32 humana de cebador directo

Fig. 17: La Fig. 17 muestra la secuencia de nucleótidos de L32 humana de cebador de sonda

Fig. 18: La Fig. 18 muestra la secuencia de nucleótidos de L32 humana de cebador inverso

Fig. 19: La Fig. 19 muestra la secuencia de aminoácidos de CXCL14 de ratón

Fig. 20: La Fig. 20 muestra la red de CXCL14 con sus receptores y rutas seleccionadas y asociaciones de enfermedad.

Fig. 21: La Fig. 21 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 1 de CXCL14

Fig. 22: La Fig. 22 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 2 de CXCL14

Fig. 23: La Fig. 23 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 3 de CXCL14

Fig. 24: La Fig. 24 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 4 de CXCL14

Fig. 25: La Fig. 25 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 5 de CXCL14

Fig. 26: La Fig. 26 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 6 de CXCL14

Fig. 27: La Fig. 27 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 7 de CXCL14

Fig. 28: La Fig. 28 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 8 de CXCL14

Fig. 29: La Fig. 29 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 9 de CXCL14

Fig. 30: La Fig. 30 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 10 de CXCL14

Fig. 31: La Fig. 31 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 11 de CXCL14

Fig. 32: La Fig. 31 muestra la secuencia de aminoácidos de fragmento 12 de CXCL14

Fig. 33: La Fig. 33 muestra la actividad de diferentes fragmentos de péptido CXCL14 (1 a 7) sobre MrgX2 en un formato de ensayo a base de células (ensayo Fluo8) (UFR: unidades de fluorescencia relativa). A. CXCL14 y PAMP; B. Fragmento 1, 2, 5; C. Fragmento 3, 4, 6, 7

Fig. 34: La Fig. 34 muestra la actividad de diferentes fragmentos de péptido CXCL14 (8 a 12) sobre MrgX2 en un formato de ensayo a base de células (ensayo Fluo8) (UFR: unidades de fluorescencia relativa). A. CXCL14 y PAMP; B. Fragmento 8, 9; C. Fragmento 11, 12, 10

Descripción detallada de la invención

Identificación de receptor CXCL14

Se sometió a ensayo el receptor MrgX2 en cuanto a la liberación de calcio intracelular dependiente de CXCL14. Sorprendentemente, se observó que MrgX2 se activaba con CXCL14 dependiendo de la dosis. En la Fig. 7 se muestra una curva de respuesta a dosis para CXCL14 que activa MrgX2 en un formato de ensayo a base de células. La línea celular utilizada sobre-expresa MrgX2 en CHEM1 por expresión recombinante. CXCL14 no presenta ninguna liberación del calcio significativa sobre células CHEM1 sin sobreexpresión de MrgX2 (tal como se muestra en la Fig. 8) en las mismas condiciones experimentales. Se calculó la EC50 de CXCL14 humana en CHEM1-MrgX2 como $5,7 \times 10^{-07}$ M. CXCL14 de ratón presenta una liberación de calcio dependiente de la dosis en CHEM1-MrgX2 (pero no en CHEM1 sin MrgX2) con una EC50 comparable.

El agonista de MrgX2 PAMP conocido presenta a liberación de calcio dependiente de la dosis en CHEM1-MrgX2, pero no en la línea celular CHEM1 (sin MrgX2) (tal como se muestra en la Fig. 9 para PAMP en CHEM1-MrgX2 y en la Fig. 10 para PAMP en CHEM1). Se calculó la EC50 de PAMP sobre CHEM1-MrgX2 como $4,9 \times 10^{-07}$ M. Asimismo, se observó que CXCL14 es un antagonista del receptor acoplado a proteína G CXCR4.

Especificidad de CXCL14

Para caracterizar la especificidad de CXCL14 para la activación de MrgX2 se analizaron 3 péptidos (NPY, angiotensina II y galanina) en un ensayo de liberación de calcio a base de células con líneas celulares CHEM1-MrgX2 y CHEM1. Ni NPY ni angiotensina II ni galanina presentaron una liberación de calcio dependiente de la dosis en ninguna de las dos líneas celulares de ensayo (tal como se muestra en la Fig. 11). Se pudo demostrar que CXCL14 es un agonista específico de MrgX2.

Para confirmar la sobreexpresión de MrgX2 en células CHEM1-MrgX2 solamente, se llevó a cabo un análisis de QPCR de muestras de ARN total de ambas líneas celulares. Tal como se muestra en la Fig. 12 solamente en ARN total de CHEM1-MrgX2 se pudo detectar ARN de MrgX2 humano. En CHEM1 (control) no se pudo detectar MrgX2. Se pudo demostrar que CXCL14 es un agonista específico de MrgX2.

Identificación de péptidos derivados de CXCL14 como moduladores de actividad de MrgX2 y CXCL14

Para identificar péptidos derivados de CXCL14 con actividad de CXCL14 modulada, se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron diferentes péptidos. En las Fig. 22 a 32 se dan las secuencias de los péptidos derivados de CXCL14 1 a 12. Se sometieron a ensayo todos los péptidos en líneas celulares CHEM1-MrgX2 y CHEM1 (control) utilizando una lectura a base de Fluo8 (como en el ejemplo 2). Sorprendentemente péptidos truncados con secuencias definidas presentan actividad CXCL14 en MrgX2. Los péptidos 12 y 8 presentan únicamente una baja actividad (tal como se muestra en la Fig. 33).

Los péptidos a base de CXCL14 truncados tienen diferentes características en lo que se refiere a la farmacocinética, la actividad, la solubilidad u otras propiedades importantes para el tratamiento farmacológico o el desarrollo del fármaco. Los péptidos descritos o sus variantes podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con CXCL14, MrgX2 o CXCR4 como cáncer, fibrosis pulmonar, infección, actividad bactericida, enfermedad renal, enfermedad de la mácula, colitis, angiogénesis, artritis, diabetes (metabolismo de la glucosa), asma, EPOC, embolia pulmonar, trastornos del SNC y enfermedades asociadas con la modulación de la ruta SDF1a-CXCR4, actividad de mastocitos, función o inflamación de ganglios radicales posteriores.

Dado que se describe CXCL14 como un inhibidor de la ruta SDF1-CXCR4 [40] los péptidos CXCL14 descritos relacionados y sus variantes podrían utilizar como moduladores de dicha ruta.

Otra realización más de la divulgación es un péptido relacionado con CXCL14 o una variante del mismo comprendido en el grupo de fragmentos que consiste en el fragmento 1, 2, 4, 5, 9, 10 y 11.

Una realización preferente de la divulgación es el péptido PKLQSTKRFIKWYNA (SEQ ID NO: 21) o una variante del mismo. Una realización preferente más de la divulgación es el péptido LQSTKRFIKWY (SEQ ID NO: 20) o una variante del mismo. Una realización preferente más de la divulgación es el péptido STKRFIKWYNA (SEQ ID NO: 22) o una variante del mismo. Los péptidos o variantes de los mismos que se han mencionado son útiles para la caracterización y análisis de las rutas CXCL14- o SDF1- o MrgX2 p.ej. en ensayos de cribado y el desarrollo de moduladores de dichas rutas y como modulador para la ruta SDF1/CXCR4.

MrgX2 (MRGPRX2)

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR), también conocido como receptores de siete dominios de transmembrana, receptores 7TM, receptores heptahelicoidales, receptor de serpiente y receptores unidos a proteína G (GPLR) comprenden una gran familia de proteínas de receptores de transmembrana que detectan moléculas fuera de la célula y activan rutas de transducción de señal dentro y, finalmente, respuestas celulares. Los ligandos que se unen y activan estos receptores incluyen compuestos sensibles a la luz, olores, feromonas, hormonas y neurotransmisores y varían en el tamaño desde moléculas pequeñas a péptidos y proteínas grandes. Los receptores acoplados a proteína G están relacionados con muchas enfermedades y también son la diana de aproximadamente un 40 % de todos los fármacos de la medicina moderna [8].

Existen dos rutas de transducción de señal principales en la que participan los receptores acoplados a proteína G: la ruta de señal cAMP y la ruta de señal fosfatidilinositol. Cuando se une un ligando a GPCR, provoca un cambio conformacional en GPCR que da cabida a que actúe como factor de intercambio de nucleótido de guanina (GEF). GPCR puede activar una proteína G asociada intercambiando su GDP unida por GTP. La subunidad α de la proteína G, junto con GTP unido, pueden disociarse entonces desde las subunidades β e γ y para seguir afectando a las proteínas de señalización intracelular o las proteínas funcionales diana que dependen directamente del tipo de subunidad α (Gas, Gai/o, Gq/11, G α 12/13) [9].

Recientemente, se ha descrito una gran familia de receptores acoplados a proteína G, denominados genes relacionados con Mas (Mrg), que se expresan selectivamente en neuronas sensoriales de diámetro reducido de los ganglios radicales posteriores. Un subgrupo de receptores Mrg humanos fue definido como MrgX1-X4. Se clonaron receptores MrgX de monos rhesus y se caracterizaron funcionalmente junto con sus ortólogos humanos. La mayoría de los receptores MrgX humanos y rhesus presentaron una alta actividad constitutiva en un ensayo de proliferación celular. Las respuestas proliferativas mediadas por MrgX1 humano o rhesus, o MrgX2 rhesus fueron parcialmente bloqueadas por la toxina pertussis (PTX). Las respuestas proliferativas mediadas por MrgX3 rhesus y MrgX4 tanto humano como rhesus fueron PTX intensivas. Estos resultados indican que los receptores MrgX1 y MrgX2s humano y rhesus activan las rutas reguladas por Gq- y por Gi-, mientras que los receptores MrgX3 y MrgX4 estimulan principalmente las rutas reguladas por Gq-. Los péptidos conocidos por activar los receptores MrgX1 y MrgX2s humano activaron los receptores rhesus correspondientes en los ensayos de proliferación celular, los ensayos de movilización de Ca(2+) y los ensayos de unión a GTP-gammaS. Cortistatina-14 fue selectiva para los receptores MrgX2s humano y rhesus con respecto a los receptores MrgX1 humano y rhesus. BAM22 y los péptidos relacionados activaron fuertemente receptores MrgX1 humanos, pero activaron débilmente los receptores MrgX1 rhesus, MrgX2 humano y MrgX2s rhesus. Estos datos indican que el mono rhesus puede ser un modelo animal adecuado para explorar los papeles fisiológicos de los receptores MrgX [30]. MrgX2 sirve como receptor para el péptido antimicrobiano LL37 (CAMP) [29]. Se notifica que la línea celular de mastocitos humanos que expresa MRGX2, así como los mastocitos derivados de células madre pluripotentes, respondieron a LL37 (CAMP) para movilización y degranulación de Ca(2+) sostenida. En contraste, una línea celular de mastocitos inmaduros que

carecía de MRGX2 y una línea celular de mastocitos tratada con ARN horquillado corto (shRNA) contra MRGX2 no respondieron a LL37. La línea celular de mastocitos que expresa establemente MRGX2 respondió a LL37 por quimiotaxis, desgranulación y producción de CCL4. MRGX2 resistió a la fosforilación, desensibilización e internalización inducida por LL37.

- 5 En las Fig. 3 y 4 se dan las secuencias de MrgX2 humano (secuencia de aminoácidos y de nucleótidos respectivamente; SEQ ID NO: 3 y 4).

Enfermedades asociadas con MrgX2

10 Tal como se describe en la bibliografía, MrgX2 posiblemente esté asociado a enfermedades o trastornos como (pero sin limitarse a ellos): infecciones [29], inflamación [29, 31], enfermedades relacionadas con mastocitos [29], sistema inmune [32], cáncer [33] y nocicepción / dolor [34].

Ligandos y moduladores de MrgX2

Los moduladores agonistas de MrgX2 son LL37 [22]), PAMP [38], corticostatina 14 [35, 36], BAM22 [35] y morfina [37]. Asimismo, se describen varios moduladores peptídicos y no peptídicos [35].

15 Por otra parte, se describen cortistatina 17, somatostatina (diferentes isoformas), NPFF, oxitocina, ciclosomatostatina, dinorfina A, [Arg8] vasopresina, sustancia P y hexarelina [82] como modulador de MrgX2.

Mastocitos

20 Un mastocito (también conocido como célula cebada y labrocito) es una célula residente de diversos tipos de tejidos y contiene muchos gránulos ricos en histamina y heparina. Aunque, se los conoce sobre todo por su papel en alergia, inflamación y anafilaxis, los mastocitos desempeñan un importante papel protector también, ya que están íntimamente relacionados con la cicatrización de las heridas y la defensa contra patógenos. Los mastocitos tienen un aspecto y una función muy similares a la de los basófilos, un tipo de glóbulo blanco. Sin embargo, no son iguales, ya que se derivan cada uno de ellos de diferentes líneas celulares.

25 Los mastocitos (MC) tienen la característica única de ser células residentes del tejido embaladas con gránulos citoplásmicos llenos de mediadores preformados de naturaleza diversa, ricos en receptores superficiales que, tras la unión a ligando pueden inducir no solamente la rápida liberación de los mediadores almacenados, sino también la síntesis de novo de metabolitos de ácido araquidónico y una serie de quimioquinas y citoquinas. Por lo tanto, desempeñan un papel prominente en el mantenimiento de la homeostasia, al actuar como células centinela armadas en los tejidos, en los que residen extendiéndose desde los tejidos mucosales a los conectivos y más. Sin embargo, su localización estratégica y su potencial han demostrado claramente que los MC van más allá de la inflamación; son actores muy importantes también en las respuestas inmunes innatas y adaptativas, inflamación y cambios de tejido. Los papeles inmunomoduladores de MC pueden tener como resultado un efecto negativo o positivo para el huésped, potenciando o suprimiendo ciertos rasgos de las respuestas inmunes/inflamatorias [7]. En la Fig. 5, se muestra el efecto de la activación de mastocitos dentro de la inflamación, las rutas inmunes y el inicio de la remodelación de tejido.

35 Enfermedades asociadas con mastocitos

Se describen enfermedades o trastornos relacionados con mastocitos y la activación de mastocitos, pero sin limitarse a ellas:

Enfermedades inmunológicas/neoplásicas: tumor cardinoide, feocromocitoma, alergia gastrointestinal primaria, síndrome hipereosinofílico, angioedema hereditario, vasculitis, linfoma Intestinal [39]

40 Trastornos gastrointestinales: gastritis por helicobacter, enteritis infecciosa, gastroenteritis eosinofílica, infecciones parasitarias, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad celiaca, intolerancia a la lactosa primaria, colitis microscópica, amiloidosis, obstrucciones intestinales por adhesiones, volvulus y otras razones, hepatitis, colelitiasis, hiperbilirubinemia hereditaria [39]

45 Trastornos endocrinos: Diabetes mellitus, tumores endocrinos pancreáticos, porfiria, trastornos de la glándula del tiroides, Morbus Fabry [39]

Mastocitosis [44]

Trastorno o síndrome por activación de mastocito (MCAD) [45, 51]

50 Otros: filtración vascular [46], cardiomiopatía [47], fibrosis pulmonar idiopática [48], enfermedad mucosal [49], remodelación vascular [50], hipertensión arterial pulmonar [52], hipertensión pulmonar [58], alergia a fármacos [53], enfermedad autoinmune [54], fibrosis renal [55], cistitis intersticial [56], EPOC [57], asma [60], anafilaxis [61], miocarditis [62], formación de aneurisma aórtico [63], sarcoidosis [64], fibrosis cística [65], enfermedades renales [66], enfermedades inmunológicas de la piel [67], infarto de miocardio [68], síndromes coronarios agudos [69],

fibrosis hepática [70], esclerosis múltiple [71], artritis crónica y aguda [72], fibrosis cardiaca [73], insuficiencia cardiaca [74], cardiomiopatía [75], enfermedad vascular [76], cáncer [77], oftalmología [78] y otros.

MrgX2 en los ganglios radicales posteriores

5 MrgX2 se describe como expresado en ganglios radicales posteriores [81]. Un ganglio radicular posterior (o ganglio medular) es un nódulo sobre una raíz dorsal de la médula que contiene cuerpos celulares de células nerviosas (neuronas) que llevan señales desde los órganos sensoriales hacia el centro de integración apropiado. Los nervios que llevan señales hacia el sistema nervioso central (el cerebro o la médula espinal) son conocidos como nervios aferentes. Los ganglios radicales dorsales participan en la transducción somatosensorial, mecanosensitiva y la nocicepción. La modulación de la actividad de MrgX2 mediada por CXCL14 debería tener efectos en las funciones del ganglio radicular posterior. La inhibición de la activación de MrgX2 dependiente de CXCL14 debería ser útil para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la nocicepción y transducción sensorial.

Descubrimiento de fármaco

15 El procedimiento de investigación de fármacos modernos ha invertido la estrategia farmacológica clásica. Hoy en día, los programas de investigación se inician sobre la base de una evidencia biológica que indica que un gen o producto génico en particular es una diana valiosa para fármacos de molécula pequeña útiles para terapia. El proceso está concebido para identificar moduladores específicos de diana que carecen de varios efectos secundarios. Asimismo, permite establecer un procedimiento de descubrimiento de fármaco lineal partiendo de la identificación de la diana para suministrar finalmente las moléculas para desarrollo clínico. Un elemento central es el descubrimiento de cabezas de serie a través de un cribado de alto rendimiento de colecciones de compuestos corporativas completas. La investigación farmacológica en la mayoría de los centros está organizada en fases por separado que en conjunto construyen una “cadena de valor” con la que se desarrollan programas de descubrimiento para obtener finalmente fármacos como candidatos de ensayos clínicos.

25 Hoy en día, los investigadores disponen de un gran arsenal de tecnologías en la industria y los centros académicos para generar datos que corroboran asociación funcional entre un gen determinado y una patología. Las grandes empresas farmacéuticas cuentan normalmente con grupos especializados que se dedican a la biología de diana. La generación de una hipotética asociación con enfermedades suele ir seguida con frecuencia de una serie de experimentos diseñados para validar una vez más la hipótesis inicial. En muchos casos, se han implementado tecnologías de alto rendimiento como PCR en tiempo real, en las que se usan sistemas de detección TaqMan para explorar sistemáticamente genes con patrones de expresión de interés o regulación significativa en una patología pertinente. Como resultado, la mayoría de las empresas han establecido bases de datos bioinformáticas completas que contienen datos de expresión y biología molecular. Dichos datos se complementan además con la información derivada de estudios genéricos y de población y animales transgénicos. La introducción de tecnología ARNi marca otro avance tecnológico empleado para la identificación de dianas y la validación *in vitro* y en animales de laboratorio. Tras la secuenciación y publicación del genoma humano en 2001, el catálogo de posibles candidatos diana es de dominio público. Sin embargo, todavía no está clara lo que se comprende sobre la función génica y su potencial relevancia para el tratamiento de enfermedades.

40 Una vez realizada una evaluación técnica de la “candidatura a fármaco” de las dianas [1], se desarrollan la probabilidad de identificar moduladores de molécula pequeña y ensayos específicos de la diana de viabilidad técnica para sondear la colección de compuestos corporativos en cuanto a cabezas de serie valiosas. El descubrimiento de nuevos fármacos en la industria farmacéutica sigue dependiendo hoy por hoy en gran medida del cribado experimental de colecciones de compuestos. Para este fin, la industria ha realizado una fuerte inversión para extender sus registros de compuestos y ha establecido recursos de cribado apropiados para manejar grandes números de compuestos dentro de un período de tiempo razonable. El “cribado de alto rendimiento” (HTS) comenzó aproximadamente hace una década con la introducción de la automatización de laboratorio para manejar diferentes etapas de ensayo llevadas a cabo normalmente en placas de microtitulación. Las tecnologías HTS durante la última década han sido testigo de un notable desarrollo. Las tecnologías de ensayo han avanzado para proporcionar una gran variedad de varios formatos de ensayo bioquímicos y a base de células para un gran espectro de clases de diana pertinentes para enfermedad [2]. Paralelamente, la mayor miniaturización de los volúmenes de ensayo y la paralelización de los tratamientos han aumentado aún más el rendimiento de los ensayos. Por ejemplo, es posible realizar HTS enteramente en placas de 1536 pocillos con volúmenes de ensayo comprendidos entre 5 y 10 µl. Este vehículo de ensayo junto con sistemas robóticos totalmente automatizados permite analizar más de 200.000 compuestos al día. Dicho rendimiento ultra alto es necesario para explotar registros de compuestos de >1.500.000 de compuestos. Dichas colecciones completas de sustancias, junto con las sofisticadas tecnologías de cribado han tenido como resultado una clara ventaja en el descubrimiento de nuevos fármacos especialmente para dianas que en el pasado tenían escasas posibilidades de ser candidato a fármaco con un historial insuficiente. Por otra parte, el tamaño y la composición de la biblioteca de compuestos en gran medida patentados por la empresa facilitan la identificación nuevos fármacos que proporcionen un camino más sencillo para establecer la propiedad intelectual sobre la composición en cuestión [3]. Se realizan esfuerzos de forma habitual para identificar anticuerpos, p.ej., a través de tecnología de despliegue de fagos.

Compuestos de ensayo

Los compuestos de ensayo adecuados para su uso en los ensayos de cribado de la invención se pueden obtener a partir de cualquier fuente adecuada, p.ej., bibliotecas de compuestos convencionales. Los compuestos de ensayo se pueden obtener asimismo aplicando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de biblioteca combinatoria de la técnica conocidos, incluyendo: bibliotecas biológicas, bibliotecas en fase sólida o solución paralelas espacialmente direccionables; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; método de biblioteca de “una perla un compuesto”; y métodos de biblioteca de síntesis utilizando selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de biblioteca biológica está limitado a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques se pueden aplicar a bibliotecas de compuestos de péptido, oligómero no peptídico o molécula pequeña. [Lam, (1997)]. En la técnica se pueden encontrar ejemplos de métodos de síntesis de bibliotecas moleculares. Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución o en perlas, bacterias, esporas, plásmidos o fagos.

Ensayos de unión

Para los ensayos de unión, preferentemente, el compuesto de ensayo es una molécula pequeña que se une y que ocupa un sitio activo de un polipéptido receptor Mrg, en virtud de lo cual queda inaccesible el sitio de unión a CXCL14 al sustrato, tal que se impide la actividad biológica normal. Entre los ejemplos de dichas moléculas pequeñas se incluyen, pero sin limitarse a ellas, péptidos pequeños o moléculas de tipo péptido. En los ensayos de unión, el compuesto de ensayo o el receptor Mrg o el polipéptido CXCL14 pueden comprender un marcador detectable, como por ejemplo un marcador fluorescente, radioisotópico, quimioluminiscente o enzimático, como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa. La detección de un compuesto de ensayo que está unido al receptor Mrg puede llevarse a cabo entonces, por ejemplo, por recuento directo de radioemisión, por recuento por centelleo o determinando la conversión de una sustancia apropiada a un producto detectable. Alternativamente, la unión de CXCL14 al polipéptido receptor Mrg puede determinarse sin marcar ninguno de los interactuantes. Por ejemplo, se puede utilizar un microfisiómetro para detectar la unión de un polipéptido CXCL14 con un receptor Mrg en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo. Un microfisiómetro (p.ej. Cytosensor™) es un instrumento de análisis que mide el índice en el que la célula acidifica su entorno utilizando un sensor potenciométrico direccionable por luz (LAPS). Los cambios en el índice de acidificación pueden utilizarse como indicador de la interacción entre el polipéptido CXCL14 con el receptor Mrg en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo [Haseloff, (1988)].

La determinación de la capacidad de un polipéptido CXCL14 con un receptor Mrg en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo puede llevarse a cabo aplicando una tecnología como por ejemplo Análisis de Interacción Biomolecular en tiempo real (BIA) [McConnell, (1992); Sjolander, (1991)]. BIA es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real sin marcar ninguno de los interactuantes (p.ej. BIAcore™). Se pueden emplear los cambios en la resonancia de plasmón superficial de fenómenos ópticos (SPR) como indicación de las reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

Los agonistas de un receptor Mrg son moléculas que, cuando se unen al receptor Mrg, aumentan o prolongan la actividad de un receptor Mrg. Los agonistas de un receptor Mrg incluyen proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, moléculas pequeñas o cualquier otra molécula que activa FAP. Los antagonistas de un receptor Mrg son moléculas que, cuando se unen a un receptor Mrg, disminuyen la cantidad o la duración de la actividad de un receptor Mrg estimulado por un ligando, preferentemente un polipéptido CXCL14. Los antagonistas incluyen proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, anticuerpos, moléculas pequeñas o cualquier otra molécula que disminuye la actividad de un receptor Mrg. Un antagonista preferente de la divulgación es un antagonista de la activación de MrgX2 humano a través del polipéptido humano CXCL14. Un antagonista más preferente aún es dicho antagonista que no es un antagonista de la activación de MrgX2 humano a través de otro agonista de MrgX2. Esto permite interferir específicamente con la activación mediada por el polipéptido humano CXCL14 humano de MrgX2 humano. Preferentemente, dicho antagonista no interfiere con la activación de MrgX2 mediada por LL37, PAMP, corticostatina 14, BAM22 o morfina.

La presente invención es particularmente útil para el cribado de compuestos terapéuticos mediante el uso de MrgX2 y CXCL14 en una cualquiera entre una variedad de técnicas de cribado de fármacos. Dado que MrgX2 es un receptor acoplado a proteína G, potencialmente, es posible utilizar cualquiera de los procedimientos utilizados habitualmente en la técnica para identificar moduladores de MrgX2. Por ejemplo, la actividad de un receptor acoplado a proteína G como MrgX2 puede medirse aplicando uno cualquiera entre una variedad de ensayos funcionales apropiados en los que la activación del receptor tiene como resultado un cambio observable en el nivel de algún sistema de segundo mensajero como adenilato ciclasa, guaniliciclasa, movilización del calcio o hidrólisis de fosfolípidos de inositol. Alternativamente, el polipéptido o fragmento empleado en dicho ensayo o bien se encuentra libre en la solución o bien está fijado a un soporte sólido o está soportado sobre una superficie celular o está localizado intracelularmente. En un procedimiento de cribado de fármacos se emplean células huésped eucariotas o procariotas que se transforman establemente con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido o fragmento. Se criban los fármacos frente a dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Dichas células, ya sea en forma viable o fija, se utilizan para ensayos de unión convencionales. Se mide por ejemplo la formación de complejos entre MrgX2 y CXCL14 dependiente del agente que se está analizando. Alternativamente, se examina la disminución en la formación de complejo entre MrgX2 y CXCL14 dependiente del agente que se está analizando.

Diferencias entre especies

Se aisló CXCL14 (originalmente identificado como BRAK, BMAC o Mip-2a) como un gen cuya expresión se pierde o se regula a la baja en varias líneas celulares de cáncer humano y especímenes de tumor. El precursor de 99 restos de aminoácidos de CXCL14 tiene un péptido de señal de 22 aminoácidos que se escinde para producir una proteína madura de 77 aminoácidos. El peso molecular calculado de la proteína CXCL14 humana es 9,4 kDa con un punto isoeléctrico de 10.3. CXCL14 humano y murino difieren tan solo en dos restos de aminoácidos. La composición de aminoácidos de CXCL14 se conserva bien entre humanos, aves, ranas y peces [22, 23].

Se ha descrito en diferentes especies una gran familia de receptores acoplados a proteína G denominados genes relacionados con Mas (Mrg). El número de receptores descrito para cada subfamilia depende de la especie. Especialmente en ratón y en rata, se ha descrito un gran número de miembros de la familia MrgX, si bien no están bien caracterizados.

Quimioquinas en mastocitos

Además de su papel como centinelas en el reconocimiento de patógenos, los mastocitos (de tipo plaquetas) son capaces de comunicarse con células inmunes facilitando el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección. De hecho, los mastocitos son capaces de producir diferentes quimioquinas incluyendo CCL4, CXCL8 o CCL11 que facilitan el reclutamiento de linfocitos T CD8⁺, eosinófilos y linfocitos citolíticos naturales, respectivamente [5]. CCL3/MIP-1a y CCL4/MIP-1b pueden iniciar diversas respuestas celulares que regulan la inflamación tanto aguda como crónica a través de su interacción con CCR1 y CCR5. Por otra parte, se utiliza CCL4 unido a proteoglicano para activar e inducir eficazmente la adhesión de linfocitos en la circulación para su extravasación a través del endotelio del nódulo linfático. Las estructuras cuaternarias de CCL3 y CCL4 son decisivas por su actividad biológica. La liberación continua y lenta de monómeros desde el polímero lleva a un gradiente superficial con un gradiente prolongado y eficaz para el reclutamiento de leucocitos. Se ha encontrado CXCL8/interleuquina-8/IL8 en gránulos intracelulares de los mastocitos de la piel y líneas celulares de mastocitos. [6]. Recientemente, se sabe que la síntesis de CXCL8 es inducida a través de la ruta leucotrieno B4/receptor 2 de leucotrieno B4 como respuesta a IL-1b en mastocitos primarios humanos y la línea celular de mastocitos HMC-1. CXCL8 liberado por los mastocitos está relacionado con la quimiotaxis selectiva de linfocitos citolíticos naturales que expresan CXCR1. CXCL8 induce también el desplazamiento de neutrófilos y la activación de receptores acoplados a proteína G en su superficie, concretamente CXCR1 y CXCR2 humanos. Durante la inflamación, se produce CXCL8 y se presenta a la superficie endotelial en asociación con GAG. Por otra parte, esta quimioquina está entre las más importantes en el reclutamiento de células inflamatorias, sobre todo neutrófilos, en EPOC y enfermedad pulmonar [4]. Hasta el momento, no se ha descrito el impacto o la función de CXCL14 sobre los mastocitos o la activación de mastocitos.

Activación de mastocitos

En la bibliografía se han descrito diferentes procedimientos para determinar la activación de mastocitos [59]. La mayoría de los procedimientos se basan en la determinación de los niveles de proteína liberada o los cambios transcripcionales.

Red CXCL14 y asociaciones de ruta

CXCL14 forma parte de una red de receptores que están relacionados con diferentes procesos fisiológicos. Aparte de la actividad antimicrobiana de CXCL14, el efecto de CXCL14 sobre la actividad celular está mediado por la modulación de la actividad de MrgX2. En la Fig. 20 se muestran las uniones de CXCL14 a su receptor MrgX2 y receptores seleccionados, ligandos, células y sus asociaciones con enfermedades.

Sorprendentemente, los autores de la invención han identificado MrgX2 como el receptor de CXCL14. La modulación de la actividad de MrgX2 a través de la inhibición de la activación o unión de receptor dependiente de CXCL14 lleva a una modulación de la activación de receptor dependiente de ligandos u otros agonistas de MrgX2 conocidos. La inhibición de la actividad de MrgX2 dependiente de CXCL14 debería conducir a la modulación de la activación de células mediadas por MrgX2 de mastocitos, macrófagos, monocitos o fibroblastos (pero sin limitarse a ellos). El papel de la activación de dichas líneas celulares en diferentes enfermedades está descrito en la bibliografía.

Debe ser razonable que la inhibición de la actividad de MrgX2 dependiente de CXCL14 sirva para el tratamiento dichas enfermedades. La inhibición de la actividad de MrgX2 dependiente de CXCL14 mediante el uso de moduladores de receptor mantiene intacta la actividad antimicrobiana de CXCL14 y otros ligandos de MrgX2 (como LL37). El mantenimiento de las rutas antimicrobianas CXCL14/LL37/defensina debería crear un efecto positivo adicional dentro del tratamiento de la enfermedad.

En el presente documento se desvela:

1. Un procedimiento de cribado para un antagonista de un receptor Mrg que comprende las etapas de

a. poner en contacto de un compuesto de ensayo con un polipéptido receptor Mrg en presencia de un

- polipéptido CXCL14,
- b. detectar la unión de un polipéptido CXCL14 con dicho polipéptido receptor Mrg en presencia de dicho compuesto de ensayo,
- c. poner en contacto de CXCL14 con un polipéptido receptor Mrg en ausencia del compuesto de ensayo, y
- 5 d. detectar la unión de un polipéptido CXCL14 con dicho polipéptido receptor Mrg en ausencia de dicho compuesto de ensayo. En una realización aún más preferente, el procedimiento comprende además una etapa e, en la que se determina un antagonista sobre la base de la diferencia de unión del polipéptido CXCL14 de la etapa b. y d. Se determina un antagonista cuando la unión de un polipéptido CXCL14 de la etapa b. es inferior que en la etapa d.
- 10 2. Un procedimiento de cribado para un antagonista de un receptor Mrg que comprende las etapas de
- a. determinar la actividad de un polipéptido receptor Mrg en presencia de un polipéptido CXCL14, y
- b. determinar la actividad de un polipéptido receptor Mrg en presencia de un polipéptido CXCL14 y un compuesto de ensayo. En una realización más preferente aún, el procedimiento comprende además una etapa c., en la que se determina un antagonista sobre la base de la diferencia de actividad del receptor Mrg de la etapa a. y b. Se determina un antagonista cuando la actividad de receptor Mrg de la etapa b. es inferior que en la etapa a.
- 15 3. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que, además, se determina la unión o actividad de un agonista MrgX2 en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo con realización 3, en el que el agonista de MrgX2 está comprendido en el grupo de agonistas que consiste en LL37, PAMP, BAM22, cortistatina 17, somatostatina, isoformas de somatostatina, NPFF, oxitocina, ciclosomatostatina, Dinorfina A, [Arg8] vasopresina, sustancia P y hexarelina.
5. Un procedimiento de cribado para un agonista de un receptor Mrg que comprende las etapas de
- a. generar una variante de CXCL14 reemplazando uno o más aminoácidos de un polipéptido CXCL14 por otro aminoácido de origen natural o no natural, y
- 25 b. determinar la actividad de un polipéptido receptor Mrg en presencia de una variante CXCL14.
6. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el receptor Mrg es MrgX2.
7. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el receptor Mrg es MrgX2 humano. En una realización más preferente, MrgX2 humano está representado en la SEQ ID NO: 3. En otra realización MrgX2 humano puede variar en una o más posiciones de aminoácido de la SEQ ID NO: 3 siempre y cuando la molécula tenga actividad MrgX2.
- 30 8. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el polipéptido CXCL14 es polipéptido CXCL14 humano. En otra realización más preferente, el CXCL14 humano está representado en la SEQ ID NO: 1. En otra realización CXCL14 humano puede variar en una o más posiciones de aminoácido de la SEQ ID NO: 1 siempre y cuando la molécula tenga actividad CXCL14, p.ej. una variante CXCL14. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa de poner en contacto es dentro o en la superficie de una célula.
- 35 9. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la célula es *in vitro*.
10. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la etapa de poner en contacto es un sistema sin células.
- 40 11. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el polipéptido CXCL14 o variante de CXCL14 se acopla a un marcador detectable.
12. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el compuesto se acopla a un marcador detectable.
- 45 13. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el polipéptido CXCL14 o variante de CXCL14 se fija a un soporte sólido.
14. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el compuesto se fija a un soporte sólido.

Ejemplos**Ejemplo 1**Análisis de expresión (QPCR)

5 Para la cuantificación relativa de los niveles de ARNm MrgX2 en células Chem1, se aplicó un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan™ sobre LC480 (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se llevó a cabo ADNc de acuerdo con el protocolo de los fabricantes con transcriptasa inversa Omniscript (Qiagen, Hilden, Alemania) en el tampón suministrado más 9,5 µM cebador hexámero aleatorio, 0,5 mM por dNTP y RNaseOUT™ (Invitrogen). Una mezcla de reacción PCR (25 µl), además de ADNc, tuvo un contenido de 0,2 µM por cebador de amplificación y 0,2 µM sonda marcada con FAM™/TAMRA™ y mezcla de reacción TaqMan. Se ajustó el protocolo térmico a 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Para normalizar la cantidad de ADNc por ensayo, se midió en paralelo la expresión de L32. A continuación, se calculó la expresión relativa de MrgX2 utilizando los valores de expresión normalizada a L32 (RL32 humano).

Ejemplo 2Determinación de activación de mastocitos

15 Para determinar la actividad de β-hexosaminidasa en células MC/9 o mastocitos, se desgranularon las células en HEPES-Tyrode suplementado con 0,1 % de BSA desprovisto de ácido graso. Se añadieron 50 µl de sobrenadante a 50 µl de 2 mM 4-nitrofenil N-acetil-b-D-glucosaminida en 0,2 M citrato (pH 4,5) y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Tras la adición de 150 µl de 1 M Tris (pH 9,0), se midió la absorbancia a 405 nm. Para medir la liberación de quimasa y triptasa tras la desgranulación, se añadieron 50 µl de sobrenadante a 2 mM S-2288 (sustrato de triptasa, Chromogenix, Lexington, Estados Unidos) o S-2586 (sustrato de quimasa, Chromogenix) en PBS suplementado con 100 U/ml de heparina. Al cabo de 2 horas (triptasa) o 48 horas (quimasa) a 37 °C, se midió OD405. Se midieron los niveles de histamina y VEGF con ELISA de histamina (Neogen, Lansing, MI) y ELISA de VEGF (Biosource, Etten-Leur, Los Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se lisaron células 2.5*10E5 MC/9 o mastocitos en 1 ml 2% Triton en HEPES-Tyrode y se utilizaron para una liberación total en cada ensayo y se utilizó como control sobrenadante de mastocitos sin desgranular. [81].

Ejemplo 3Ensayo Fluo8

30 El ensayo Fluo8 es un formato de ensayo a base de células para la determinación de la liberación de calcio intracelular. Se sembraron las células en placas de microtitulación y se incubaron en condiciones de cultivo de células normales. Al cabo de 24 horas, se separó el medio y se lavaron las células con PBS. Se incubaron las células con tampón de carga (40 ml PBS con 2 mM calcio + 800 µl negro brillante (2%) + 732 µl pobenedid (0,5 M) en 1N NaOH + 400 µl Pluronic (10 %) en agua + 152 µl Fluo8 (5,7 µg/ml) en agua durante 30 minutos. Para la lectura de fluorescencia y analizar el compuesto se utilizó un sistema FLIPR tetra de acuerdo con el protocolo del fabricante (Molecular Devices, CA 94089-1136, Estados Unidos).

Ejemplo 3Cultivo celular

Las líneas celulares utilizadas CHEM1 y CHEM1-MrgX2 son líneas celulares de rata adherentes (Millipore, Billerica, MA 01821, Estados Unidos) que fueron cultivadas en las condiciones normales de cultivo celulares.

Ejemplo 4Ensayo de actividad de CXCR4

45 El receptor CXCR4 es un receptor de quimioquina y pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G(GPCR). Su único ligando endógeno conocido es factor derivado de célula estromales 1 (SDF-1a). CXCR4 es un receptor acoplado a Gi. Su activación lleva a una disminución de cAMP intracelular, de la que se puede llevar un seguimiento por la expresión de luciferasa regulada por elemento sensible a cAMP recombinante (CRE). Para la caracterización de moduladores de la actividad de CXCR4, se establecieron líneas celulares estables que expresan CXCR4 y vector informador CRE-luciferasa. Se incubaron las células con forskolina a una concentración de 0,5 µM, SDF-1a (a 20 nM) y el compuesto de ensayo durante 4h en condiciones normales de cultivo de células. Se añadió sustrato de luciferasa y se midió la luminiscencia durante 60 segundos.

Referencias

- 50
1. Hopkins & Groom, Nature Drug Discovery 2002
 2. Walters, W.P. y col. (2003) Nature Reviews in Drug Discovery 2, 259-266
 3. Golz, S. and Hüser, J. (2007) Clin. Lab. 53:77-79

4. von Hundelshausen y col (2012) *Front Immunol.* 3:175
5. Abraham, S.N. y col. (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10, 440-452.
6. Möller, A. y col. (1993) *J. Immunol.* 151, 3261-3266.
7. Schaffer y col. (2012) *Front Immunol.* 3:238
- 5 8. Filmore, David (2004) *Modern Drug Discovery* (American Chemical Society) 24-28
9. Kolakowski LF Jr (1994) *Receptors Channels* 2 (1): 1-7
10. Hromas, R. y col. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255: 703-706
11. Shellenberger TD y col. (2004) *Cancer Res.* 15 nov de 2004; 64(22):8262-70
12. Tessema M. y col. (2010) *Oncogene.* 16 sept. 2010; 29(37):5159-70
- 10 13. Emblom-Callahan MC y col. (2010) *Genomics.* sept. 2010; 96(3):134-45
14. Maerki C y col. (2009) *J Immunol.* 1 enero 2009; 182(1):507-14.
15. Kleer CG y col. (2008) *Clin Cancer Res.* 1 Sept. 2008; 14(17):5357-67.
16. Bennett MR y col. (2007) *Nephron Exp Nephrol.* 2007; 107(1):e30-40.
17. Radeke MJ y col. (2007) *Exp Eye Res.* sept. 2007; 85(3):366-80.
- 15 18. Abad C y col. (2005) *Inflamm Bowel Dis.*, julio 2005; 11(7):674-84.
19. Hromas R y col. (1999) *Biochem Biophys Res Commun.* 24 feb. 1999; 255(3):703-6.
20. Ferreira MA y col. (2011) *Eur J Hum Genet.*, abril 2011; 19(4):458-64.
21. Beaven y col. (2011) *Crit Rev Immunol.* 31(6): 475-529.
22. Hara, y col. (2012) *J. Biochem.* 151(5): 469-76
- 20 23. Huising, M.O. y col. (2004) *Eur. J. Biochem.* 271, 4094-4106
24. Kurth, I. y col. (2001) *J. Exp. Med.* 194, 855861
25. Schaerli, P y col. (2005) *Immunity.* 23, 331342
26. Shellenberger, T.D y col. (2004) *Cancer Res.* 64, 82628270
27. Shurin, G.V., Ferris, R. y col. (2005) *J. Immunol.* 174, 54905498
- 25 28. Chen, L. y col. (2010) *J. Immunol.* 184, 4455-4459
29. Subramanian, H. y col. (2011) *J. Biol. Chem.* 286: 44739-44749
30. Burstein eta al. (2006) *Br J Pharmacol.*, enero; 147(1):73-82.
31. Kashem y col. (2011) *Eur J Pharmacol.* 1 oct.; 668(1-2):299-304.
32. Von Hagen y col. (2008) *Mol Cell Endocrinol.*, 14 mayo; 286(1-2):141-7.
- 30 33. Volante y col. (2008) *Mol Cell Endocrinol.*, 14 mayo; 286(1-2):219-29.
34. Yang S y col. (2005) *Gene.* Jun 6; 352:30-5. Epub 26 abril 2005.
35. Malik y col. (2009) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 1729-1732
36. Robas y col. (2003) *J Biol Chem.* 7 nov.; 278(45):44400-4.
37. Natsuyo y col. (2007) *Journal of Cell and Animal Biology* Vol. 2 (1), pp. 004-009,
- 35 38. Katou y col. (2005) *Biochem Biophys Res Commun.*, 20 mayo; 330(4): 1146-52.
39. Molderings y col. *Journal of Hematology & Oncology* 2011, 4:10
40. Tanegashima y col. (2013), *FEBS Lett.* 2013 mayo 11. doi:pii: S0014-5793(13)
41. X1 y col. (2012), *Breast Cancer Res Treat.* oct. 2012; 135(3):725-35
42. Mishra y col. (2011), *J Leukoc Biol.*, enero 2011; 89(1):31-9
- 40 43. Tessama y col. (2010), *Oncogene.*, 16 sept. 2010; 29(37):5159-70
44. Horny y col. (2007), *Pathobiology.* 2007; 74(2):121-32.
45. Alvarez-Twose y col. (2010), *J Allergy Clin Immunol.*, junio 2010; 125(6): 1269-1278
46. St John y col. (2013), *Elife.* 30 abril 2013; 2:e00481
47. Huang y col. (2013), *PLoS One.* 2013; 8(3):e60827
- 45 48. Kosanovic y col. (2013), *Histol Histopathol.*, junio 2013; 28(6):691-9.
49. Beunk y col. (2013), *Expert Rev Clin Immunol.*, enero 2013; 9(1):53-63
50. De Vries y col. (2013), *Cardiovasc Res.*, feb. 2013. 1; 97(2):311-20
51. Frieri y col. (2013), *Curr Allergy Asthma Rep.*, feb. 2013; 13(1):27-32.
52. Farha y col. (2012), *Pulm Circ.* abril-junio 2012; 2(2):220-8
- 50 53. Brockow y col. (2012), *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, agosto 2012; 12(4):354-60.
54. Brown y col. (2012), *Front Immunol.* 2012; 3:147.
55. Summers y col. (2012), *Kidney Int.* sept. 2012.; 82(6):676-85.
56. Park y col. (2011), *Int Neurourol J.*, junio 2011; 15(2):61-3.
57. Mortaz y col. (2011), *Pulm Pharmacol Ther.*, agosto 2011; 24(4):367-72.
- 55 58. Hoffmann y col. (2011), *Eur Respir J.* junio 2011; 37(6):1400-10.
59. Kuehn y col. (2010), *Curr Protoc Immunol.*, nov. 2010; capítulo 7: Unidad 7.38.
60. Balzar y col. (2011), *Am J Respir Crit Care Med.* 1 feb. 2011; 183(3):299-309.
61. Kalesnikoff y col. (2010), *Chem Immunol Allergy.* 2010; 95:45-66.
62. Matsumori y col. (2010), *Circ Res.*, 14 mayo 2010; 106(9):1533-40.
- 60 63. Sun y col. (2009), *Circulation.* 15 sept. 2009; 120(11):973-82.
64. Bargagli y col. (2009), *Inflammation.*, oct. 2009; 32(5):310-4.
65. De Lisle y col. (2009), *PLoS One.* 2009; 4(1):e4283.
66. Holdsworth y col. (2008), *J Am Soc Nephrol.* dic. 2008; 19(12):2254-61.
67. Navi y col. (2007), *Clin Rev Allergy Immunol.* oct. 2007; 33(1-2):144-55.#
- 65 68. Nistri y col. (2008), *Pharmacol Res.* 2008 enero; 57(1):43-8. Epub 9 nov 2007.
69. Baldoma y col. (2009), *Int J Cardiol.* 2009 enero 24; 131(3):403-4. Epub 7 nov 2007.

70. Shen (2008), Med Hypotheses. 2008; 70(4):760-4. Epub 4 oct. 2007.
 71. Theoharides y col. (2007), Adv Exp Med Biol. 2007; 601:423-30.
 72. Nigrovic (2007), (Immunol Rev., junio 2007; 217:19-37.
 73. Kong y col. (2013), Cell Mol Life Sci., 7 mayo 2013.
 5 74. Liu y col. (2013), Antioxid Redox Signal., 15 abril 2013.
 75. Huang y col. (2013), PLoS One. 2013; 8(3):e60827
 76. Kennedy y col. (2013), Pharmacol Ther., abril 2013; 138(1):53-65.
 77. Ribatti y col. (2013), Immunol Lett. 15 mayo 2013. doi:pii: S0165-2478(13)00063-1.
 78. Liang y col. (2012), Br J Ophthalmol. sept. 2012; 96(9):1246-51.
 10 79. Bischoff(2007), Nat Rev Immunol. feb. 2007; 7(2):93-104.
 80. Bot y col. (2007), Circulation. 2007; 115:2516-2525.
 81. Robas y col. (2003), J Biol Chem. 2003 nov. 7; 278(45):44400-4
 82. EP 1 340 979 A2
 83. Shaykhiev y col. (2013), Am J Respir Cell Mol Biol. 2013
 15 84. Lv y col. (2013), Mol Med Rep. abril 2013; 7(4):1245-50
 85. Yamamoto y col (2011), Neurosci Lett., 10 ene. 2011; 487(3):335-40.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Pharma AG

20 <120> Moduladores de receptor Mrg

<130> BHC 13 1 026

25 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 77

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ser Lys Cys Lys Cys Ser Arg Lys Gly Pro Lys Ile Arg Tyr Ser Asp
1 5 10 15

Val Lys Lys Leu Glu Met Lys Pro Lys Tyr Pro His Cys Glu Glu Lys
20 25 30

Met Val Ile Ile Thr Thr Lys Ser Val Ser Arg Tyr Arg Gly Gln Glu
35 40 45

His Cys Leu His Pro Lys Leu Gln Ser Thr Lys Arg Phe Ile Lys Trp
50 55 60

35 **Tyr Asn Ala Trp Asn Glu Lys Arg Arg Val Tyr Glu Glu**
65 70 75

<210> 2

<211> 1989

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 659 184 T3

aatgtgtgcg	cgctgtggta	tgggtgtgca	agtgtgcgaa	ggcggcgtgt	tgtgtgagcg	60
agagggtagc	ggatgtgtgt	gtgctgtgtc	gcgcgtggct	ccgggtgtgc	gccgctgcga	120
tagcgggtcc	tttcccgggg	cgggcgacgg	gcgggctggg	aaggtctcot	ccctcaacca	180
cattgagaaa	tctcagttag	tcaccgagtg	gttctgcata	ttaatgagct	cgctcgctgc	240
gagggcagga	gcggatttaa	aagaggccag	ggcgggcgga	gggaggctgt	ggagagagcg	300
cggagacaag	cgcagagcgc	agcgcacggc	cacagacagc	cctgggcata	caccgacggc	360
gcagccggag	ccagcagagc	cggaaggcgc	gccccgggca	gagaaagccg	agcagagctg	420
ggtggcgtct	ccgggcgcgc	gctccgacgg	gccagcgccc	tccccatgtc	cctgctccca	480
cgccgcgcc	ctccggtcag	catgaggctc	ctggcggccg	cgctgctcot	gotgctgtg	540

ES 2 659 184 T3

gcgctgtaca ccgcgcgtgt ggacgggtcc aaatgcaagt gctcccggaa gggacccaag 600
 atccgctaca gcgacgtgaa gaagctggaa atgaagccaa agtaccgca ctgagaggag 660
 aagatggtta tcatcaccac caagagcgtg tccaggtacc gaggtcagga gcaactgctg 720
 caccccaagc tgcagagcac caagcgttc atcaagtgtt acaacgcctg gaacgagaag 780
 cgcagggctc acgaagaata gggtgaaaaa cctcagaagg gaaaactcca aaccagttgg 840
 gagacttgtg caaaggactt tgcagattaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900
 aaaaaaaaaa agcctttctt tctcacaggc ataagacaca aattatatat tgttatgaag 960
 cactttttac caacggtcag tttttacatt ttatagctgc gtgcgaaagg cttccagatg 1020
 ggagacccat ctctcttgtg ctccagactt catcacaggc tgctttttat caaaaagggg 1080
 aaaactcatg cctttccttt ttaaaaaatg cttttttgta tttgtccata cgtcactata 1140
 catctgagct ttataagcgc ccgggaggaa caatgagctt ggtggacaca tttcattgca 1200
 gtgttgetcc attcctagct tgggaagctt ccgcttagag gtccctggcgc ctgggcacag 1260
 ctgccacggg ctctcctggg cttatggccg gtcacagcct cagtgtgact ccacagtggc 1320
 ccctgtagcc gggcaagcag gagcaggtct ctctgcatct gttctctgag gaactcaagt 1380
 ttggttgcca gaaaaatgtg cttcattccc ccctgggttaa tttttacaca ccctaggaaa 1440
 catttccaag atcctgtgat ggcgagacaa atgatcctta aagaaggtgt ggggtctttc 1500
 ccaacctgag gatttctgaa aggttcacag gttcaatatt taatgcttca gaagcatgtg 1560
 aggttcccaa cactgtcagc aaaaacctta ggagaaaact taaaaatata tgaatacatg 1620
 cgcaatacac agctacagac acacattctg ttgacaaggg aaaaccttca aagcatgttt 1680
 ctttccctca ccacaacaga acatgcagta ctaaagcaat atatttgtga ttccccatgt 1740
 aattcttcaa tgtaaacag tgcagtcctc tttcgaaagc taagatgacc atgcccctt 1800
 tcctctgtac atataccctt aagaacgcc cctccacaca ctgcccccca gtatatgccg 1860
 cattgtactg ctgtgttata tgctatgtac atgtcagaaa ccattagcat tgcagcagg 1920
 tttcatattc tttctaagat ggaaagtaat aaaatatatt tgaaatgtac caaaaaaaaa 1980
 aaaaaaaaa 1989

<210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 3

5

ES 2 659 184 T3

Met Asp Pro Thr Thr Pro Ala Trp Gly Thr Glu Ser Thr Thr Val Asn
1 5 10 15

Gly Asn Asp Gln Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Lys Glu Thr Leu Ile

ES 2 659 184 T3

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

ES 2 659 184 T3

Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Lys Gln
275 280 285

Trp Arg Leu Gln Gln Pro Ile Leu Lys Leu Ala Leu Gln Arg Ala Leu
290 295 300

Gln Asp Ile Ala Glu Val Asp His Ser Glu Gly Cys Phe Arg Gln Gly
305 310 315 320

Thr Pro Glu Met Ser Arg Ser Ser Leu Val
325 330

- 5
<210> 4
<211> 2131
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 4

ES 2 659 184 T3

gtttgccagt	cccaggaaag	cacttctcaa	ctcaccaact	ccagtagaaa	gaaggggtgtt	60
aaggggcacc	agtggagggtt	ttctgagcat	ggatccaacc	accccggcct	ggggaacaga	120
aagtacaaca	gtgaatggaa	atgaccaagc	ccttcttctg	ctttgtggca	aggagaccct	180
gatcccggtc	ttcctgatcc	ttttcattgc	cctggtcggg	ctggtaggaa	acgggtttgt	240
gctctggctc	ctgggcttcc	gcatgocgag	gaacgccttc	tctgtctacg	tcctcagcct	300
ggcgggggcc	gacttcctct	tcctctgctt	ccagattata	aattgcctgg	tgtacctcag	360
taacttcttc	tgttccatct	ccatcaattt	ccctagcttc	ttcaccactg	tgatgaacctg	420
tgctacctt	gcaggcctga	gcatgctgag	caccgtcagc	accgagcgct	gcctgtccgt	480
cctgtggccc	atctggatc	gctgccgccc	ccccagacac	ctgtcagcgg	tcgtgtgtgt	540
cctgctctgg	gcctgtccc	tactgctgag	catcttgaa	gggaagttct	gtggttctt	600
atttagtgat	ggtgactctg	gttggtgtca	gacatttgat	ttcatcaactg	cagcgtggct	660
gatttttta	ttcatggctc	tctgtgggtc	cagtctggcc	ctgctggctca	ggatcctctg	720
tggtccagg	ggtctgccac	tgaccaggct	gtacctgacc	atcctgctca	cagtgctggt	780
gttctctctc	tgccggcctgc	cctttggcat	tcagtggctc	ctaataattat	ggatctggaa	840
ggattctgat	gtcttatttt	gtcatattca	tcagtttca	gttgtcctgt	catctcttaa	900
cagcagtgcc	aaccccatca	tttacttctt	cgtgggctct	tttaggaagc	agtggcggct	960
gcagcagccg	atcctcaagc	tggtctcca	gagggctctg	caggacattg	ctgaggtgga	1020
tcacagtgaa	ggatgcttcc	gtcagggcac	ccggagatg	tcgagaagca	gtctggtgta	1080
gagatggaca	gcctctactt	ccatcagata	tatgtggctt	tgagaggcaa	ctttgccoct	1140
gtctgtctga	tttctgaac	tttctcagtc	ctgattttaa	aacagttaag	agagtccttg	1200
tgaggattaa	gtgagacagt	gcctatgaaa	caaacactaa	gtgcagtgtc	tctggaactg	1260

ES 2 659 184 T3

ccttactcac aggcctccac cacagcccta tgagagcttt gccaaactctg cgggccatga 1320
 ctgttccac attttaatga atcctacctt tcgcagaagg ctgaaagcag ggcagaaaag 1380
 atctacattt ctttgacac tgcacttgat agggactcaa agaatggtat atttttaatt 1440
 aatttccttt tctctccgt acaatttctg tctcaacaaa attagaagaa ttaaatttaa 1500
 aactagctcc aaaagagcag tcgtctttca tttggcaga ccttagaata tccccctagc 1560
 ttaataaatc tttgttgaat ggcttaatga atgaataaac tggttaatgt ttaagttaa 1620
 cctctgaaaa gtctccattt accagatttg agtcaactaa tttattgctt tcaactactt 1680
 tgaattttgc aaacatgaaa ttaagtttta taattagata aatcaatgtc aacacatatt 1740
 taaagtttga ggtacactgt ctccctgtgg tttcctttca catgccatcc cttaaatcc 1800
 cagctacacg ccttcccatt ccttcccctt tgcctttggt ctaactctcc ctctctgggg 1860
 gctctcta at tcgtcctgga agtttccagt ggtcttatag actccatggt cttggaggac 1920
 aggcctgtatg tcagatttac cttttattcc gaagaactcg gagcatttat tttgttaatt 1980
 aaattgcaca tattttttaa agttacgtgt tccacagaat aaaatattaa ttgtaaaaaa 2040
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a a 2131

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

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 5
 caggaacgcc ttctctgtct a 21

15 <210>6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 6
 cgtcctcagc ctggccgg 18

25 <210>7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400>7
 tgaagcaga ggaagaggaa 20

35

ES 2 659 184 T3

```

5
  <210> 8
  <211> 20
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Cebador

10
  <400> 8
  aagttcatcc ggcaccagtc          20

  <210>9
  <211> 22
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Cebador

20
  <400> 9
  cccagaggca ttgacaacag gg      22

  <210> 10
  <211>21
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Cebador

30
  <400> 10
  tggcccttga atcttctacg a       21

  <210> 11
  <211> 99
  <212> PRT
  <213> Mus musculus

40
  <400> 11

  Met Arg Leu Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Cys
  1          5          10          15

  Val Arg Ala Leu Asp Gly Ser Lys Cys Lys Cys Ser Arg Lys Gly Pro
          20          25          30

  Lys Ile Arg Tyr Ser Asp Val Lys Lys Leu Glu Met Lys Pro Lys Tyr
          35          40          45

  Pro His Cys Glu Glu Lys Met Val Ile Val Thr Thr Lys Ser Met Ser
  50          55          60

```

ES 2 659 184 T3

Arg Tyr Arg Gly Gln Glu His Cys Leu His Pro Lys Leu Gln Ser Thr
65 70 75 80

Lys Arg Phe Ile Lys Trp Tyr Asn Ala Trp Asn Glu Lys Arg Arg Val
85 90 95

Tyr Glu Glu

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cribado para un antagonista de un receptor Mrg que comprende las etapas de
- a. poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido receptor Mrg en presencia de un polipéptido CXCL14.
 - b. detectar la unión de un polipéptido CXCL14 con dicho polipéptido receptor Mrg en presencia de dicho compuesto de ensayo,
 - c. poner en contacto el CXCL14 con un polipéptido receptor Mrg en ausencia de dicho compuesto de ensayo,
 - d. detectar la unión de un polipéptido CXCL14 con dicho polipéptido receptor Mrg en ausencia de dicho compuesto de ensayo.
2. Un procedimiento de cribado para un antagonista de un receptor Mrg que comprende las etapas de
- a. determinar la actividad de un polipéptido receptor Mrg en presencia de un polipéptido CXCL14, y
 - b. determinar la actividad de un polipéptido receptor Mrg en presencia de un polipéptido CXCL14 y un compuesto de ensayo.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina además la actividad o unión de un agonista de MrgX2 en presencia o ausencia de dicho compuesto de ensayo.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agonista de MrgX2 está comprendido en el grupo de agonistas que consiste en LL37, PAMP, BAM22, cortistatina 17, somatostatina (isomorfos diferentes), NPDF, oxitocina, ciclosomatostatina, dinorfina A, [Arg8] vasopresina, sustancia P y hexarelina.
5. Un procedimiento de cribado de un agonista de un receptor Mrg que comprende las etapas de
- a. generar una variante de CXCL14 reemplazando uno o más aminoácidos de un polipéptido CXCL14 por otro aminoácido de origen natural o no natural, y
 - b. determinar la actividad de un polipéptido receptor Mrg en presencia de una variante de CXCL14.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el receptor Mrg es MrgX2.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el receptor Mrg es MrgX2 humano.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido CXCL14 es polipéptido CXCL14 humano.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido CXCL14 está representado en la SEQ ID NO: 1.

30

Fig. 1

CXCL14

MSLLPRRAPPVSMRLLAALLLLLLALYTARVDGSKCKCSRKGPKIRYSDVKKLEMK
PKYPHCCEKMVIITTKSVSRYRGQEHCLHPKLQSTKRFIKWYNWNEKRRVYEE

Los aminoácidos subrayados representan la secuencia de polipéptido CXCL14 humano maduro sin secuencia de péptido de señal

SEQ ID NO: 1

SKCKCSRKGPKIRYSDVKKLEMKPKYPHCCEKMVIITTKSVSRYRGQEHCLHPKLQS
TKRFIKWYNWNEKRRVYEE

Fig. 2

SEQ ID NO: 2

AATGTGTGCGCGCTGTGGTATGGGTGTGCAAGTGTGCGAAGGCGGCGTGTGTGT
GAGCGAGAGGGTAGCGGATGTGTGTGTGCGTGTGCGCGCGTGGCTCCGGGTGTG
CGCCGCTGCGATAGCGGGTCTTTCCCGGGGCGGGCGACGGGCGGGCTGGGAAG
GTCTCCTCCCCTACCACATTGAGAAATCTCAGTGAGTCACCGAGTGGTTCTGCAT
ATTAATGAGCTCGCTCGCTGCGAGGGCAGGAGCGGATTTAAAAGAGGCCAGGGC
GGGCGGAGGGAGGCTGTGGAGAGAGCGCGGAGACAAGCGCAGAGCGCAGCGCA
CGGCCACAGACAGCCCTGGGCATCCACCGACGGCGCAGCCGGAGCCAGCAGAGC
CGGAAGGCGCGCCCCGGGCAGAGAAAGCCGAGCAGAGCTGGGTGGCGTCTCCGG
GCCGCCGCTCCGACGGGCCAGCGCCCTCCCCATGTCCCTGCTCCCACGCCGCGCC
CCTCCGGTCAGCATGAGGCTCCTGGCGGCCGCGCTGCTCCTGCTGCTGGCGC
TGTACACCGCGCGTGTGGACGGGTCCAAATGCAAGTGTCCCGGAAGGGACCCA
AGATCCGCTACAGCGACGTGAAGAAGCTGGAAATGAAGCCAAAGTACCCGCACT
GCGAGGAGAAGATGGTTATCATCACCACCAAGAGCGTGTCCAGGTACCGAGGTC
AGGAGCACTGCCTGCACCCCAAGCTGCAGAGCACCAAGCGCTTCATCAAGTGGT
ACAACGCCTGGAACGAGAAGCGCAGGGTCTACGAAGAATAGGGTGAAAAACCTC
AGAAGGGAAAACCTCAAACCAAGTTGGGAGACTTGTGCAAAGGACTTTGCAGATT
AAAGCCTTTCTTT
CTCACAGGCATAAGACACAAATTATATATTGTTATGAAGCACTTTTTACCAACGG
TCAGTTTTTACATTTTATAGCTGCGTGCGAAAGGCTTCCAGATGGGAGACCCATCT
CTCTTGTGCTCCAGACTTCATCACAGGCTGCTTTTTATCAAAAAGGGGAAAACCTC
ATGCCTTTCCTTTTTAAAAAATGCTTTTTTGTATTTGTCCATACGTCACTATACATC
TGAGCTTTATAAGCGCCCCGGGAGGAACAATGAGCTTGGTGGACACATTTCAATTGC
AGTGTGCTCCATTCCCTAGCTTGGGAAGCTTCCGCTTAGAGGTCTGGCGCCTCGG
CACAGCTGCCACGGGCTCTCCTGGGCTTATGGCCGGTCACAGCCTCAGTGTGACT
CCACAGTGGCCCCGTAGCCGGGCAAGCAGGAGCAGGTCTCTCTGCATCTGTTCT
CTGAGGAACTCAAGTTTGGTTGCCAGAAAAATGTGCTTCATTCCCCCTGGTTAA
TTTTTACACACCCTAGGAAACATTTCCAAGATCCTGTGATGGCGAGACAAATGAT
CCTTAAAGAAGGTGTGGGGTCTTTCCCAACCTGAGGATTTCTGAAAGGTTACAG
GTTCAATATTTAATGCTTCAGAAGCATGTGAGGTTCCCAACACTGTCAGCAAAAA
CCTTAGGAGAAAACCTTAAAAATATATGAATACATGCGCAATACACAGCTACAGA
CACACATTCTGTTGACAAGGGAAAACCTTCAAAGCATGTTTCTTTCCCTCACCAC
AACAGAACATGCAGTACTAAAGCAATATATTTGTGATTCCCATGTAATTCTTCA
ATGTTAAACAGTGCAGTCTCTTTTCGAAAGCTAAGATGACCATGCGCCCTTTCTC
TGTACATATACCCTTAAGAACGCCCCCTCCACACACTGCCCCCAGTATATGCCG

CATTGTA CTGCTGTGTTATATGCTATGTACATGTCAGAAACCATTAGCATTGCATG
CAGGTTTCATATTCTTTCTAAGATGGAAAGTAATAAAATATATTTGAAATGTACC
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 3

SEQ ID NO: 3

MDPTTPAWGTESTTVNGNDQALLLLCGKETLIPVFLILFIALVGLVGNFVLLWLLGFR
MRRNAFSVYVLSLAGADFLFLCFQIINCLVYLSNFFCSISINFPSFFTTVMTCAYLAGLS
MLSTVSTERCLSVLWPIWYRCRRPRHLSAVVCVLLWALSLLLILEGKFCGFLFSDGD
SGWCQTFDFITAAWLIFLMVLCGSSLALLVRILCGSRGLPLTRLYLTILLTVLVFLLC
GLPFGIQWFLILWIWKDSDVLFCHIHPVSVVLSLSSANPIIYFFVGSFRKQWRLQQPI
LKLALQRALQDIAEVDHSEGCFRQGTPEMSRSSLV

Fig. 4

SEQ ID NO: 4

GTTTGCCAGTCCCAGGAAAGCACTTCTCAACTCACCAACTCCAGTAGAAAGAAGG
GTGTTAAGGGGCACCAGTGGAGGTTTTCTGAGCATGGATCCAACCACCCCGGCT
GGGGAACAGAAAGTACAACAGTGAATGGAAATGACCAAGCCCTTCTTCTGCTTTG
TGGCAAGGAGACCCTGATCCCGGTCTTCTGATCCTTTTCATTGCCCTGGTCGGGC
TGGTAGGAAACGGGTTTGTGCTCTGGCTCCTGGGCTCCGCATGCGCAGGAACGC
CTTCTCTGTCTACGTCCTCAGCCTGGCCGGGGCCGACTTCTTCTCTGCTTCC
AGATTATAAATTGCCTGGTGTACCTCAGTAACTTCTTCTGTTCCATCTCCATCAAT
TTCCCTAGCTTCTTACCCTGTGATGACCTGTGCCTACCTTGCAGGCCTGAGCAT
GCTGAGCACCGTCAGCACCGAGCGCTGCCTGTCCGTCTGTGGCCCATCTGGTAT
CGCTGCCCGCCGCCAGACACCTGTCAGCGGTCTGTGTGTCTGCTCTGGGCCC
TGTCCTACTGCTGAGCATCTTGAAGGGAAAGTTCTGTGGCTTCTTATTTAGTGAT
GGTACTCTGGTTGGTGTGACACATTTGATTTTCACTGCAGCGTGGCTGATTTT
TTTATTCATGGTTCTCTGTGGGTCCAGTCTGGCCCTGCTGGTCAGGATCCTCTGTG
GCTCCAGGGGTCTGCCACTGACCAGGCTGTACCTGACCATCCTGCTCACAGTGCT
GGTGTTCCTCCTCTGCGGCCTGCCCTTTGGCATTCAAGTGGTTCCTAATATTATGGA
TCTGGAAGGATTCTGATGTCTTATTTTGTACATTCATCCAGTTTCAGTTGTCTGT
CATCTCTTAACAGCAGTGCCAACCCCATCATTTACTTCTTCGTGGGCTCTTTTAGG
AAGCAGTGGCGGCTGCAGCAGCCGATCCTCAAGCTGGCTCTCCAGAGGGCTCTGC
AGGACATTGCTGAGGTGGATCACAGTGAAGGATGCTTCCGTCAGGGCACCCCGG
AGATGTCGAGAAGCAGTCTGGTGTAGAGATGGACAGCCTCTACTTCCATCAGATA
TATGTGGCTTTGAGAGGCAACTTTGCCCTGTCTGTCTGATTTGCTGAACCTTCTC
AGTCTGATTTTAAAACAGTTAAGAGAGTCTTGTGAGGATTAAGTGAGACAGTG
CCTATGAAACAAACACTAAGTGCAGTGTCTCTGGAACCTGCCTTACTCACAGGCTT
CCACCACAGCCCTATGAGAGCTTTGCCAACTCTGCGGTCCATGACTGTTCCACA
TTTTAATGAATCCTACCTTTCCGAGAAGGCTGAAAGCAGGGCAGAAAAGATCTAC
ATTTCTTTGGACACTGCACTTGATAGGGACTCAAAGAATGTTATATTTTAAATTA
TTTCTTTTTCTTCCGTACAATTTCTGTCTCAACAAAATTAGAAGAATTAATTT
AAAAGTCTCCAAAAGAGCAGTCGTCTTTTCAATTTTGGCAGACCTTAGAATATCC
CCCTAGCTTAATAAATCTTTGTTGAATGGCTTAATGAATGAATAAACTGGTTAAT
GTTAAGTTAAACCTCTGAAAAGTCTCCATTTACCAGATTTGAGTCACTAAATTA
TTGCTTTCACTACTTTTGAATTTTGCAAACATGAAATTAAGTTTATAATTAGATA
AATCAATGTCAACACATATTTAAAGTTTGGAGTACACTGTCTTCTGTTGTTTCT
TTCACATGCCATCCCTTAAATCCCAGCTACACGCCTTCCCATTCCTTCCCCTTTG
CCTTTGTTCTAATCTTCCCTCTCTGGGGGCTCTCTAATTCGTCTGGAAGTTTCCAG
TGGTCTTATAGACTCCATGTTCTTGGAGGACAGGCTGTATGTCAGATTTACCTTT
ATCCGAAGAACTCGGAGCATTTATTTTGTAAATTAATTAATGCACATATTTTAAAA

GTTACGTGTTCCACAGAATAAAAATATTAATTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 5

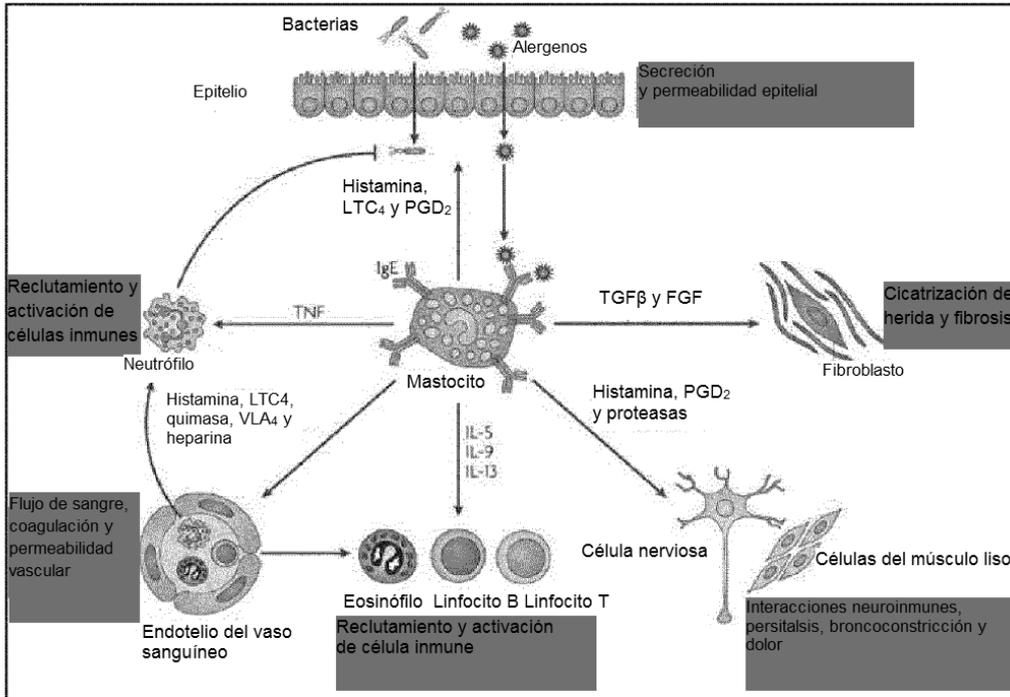


Fig. 6

	MRGX2	rMrgx2	rMrgx2I	rMrgx2I2
MRGX2	100	59	53	56
rMrgx2	59	100	95	73
rMrgx2I	53	95	100	70
rMrgx2I2	56	73	70	100

Fig. 7

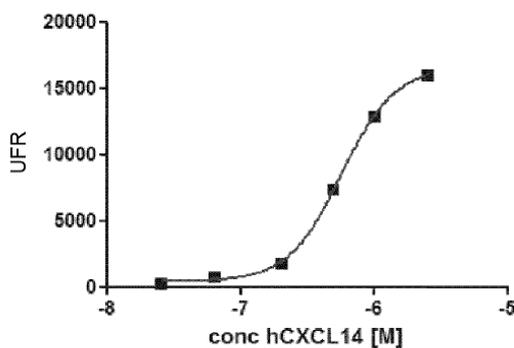


Fig. 8

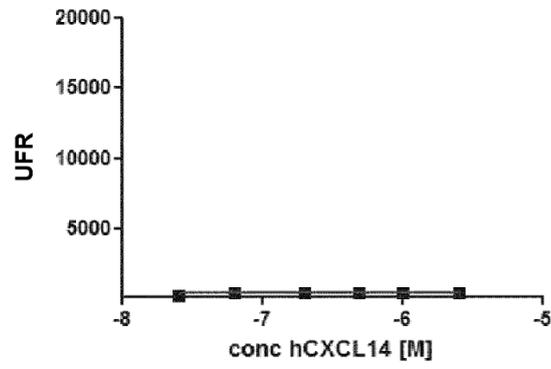


Fig. 9

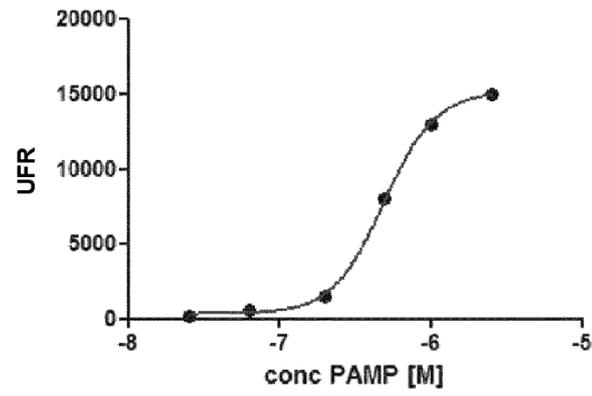


Fig. 10

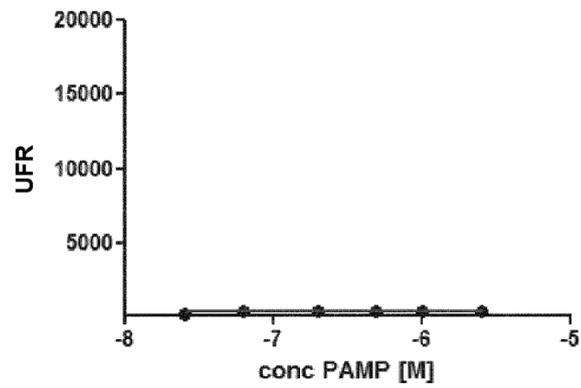


Fig. 11

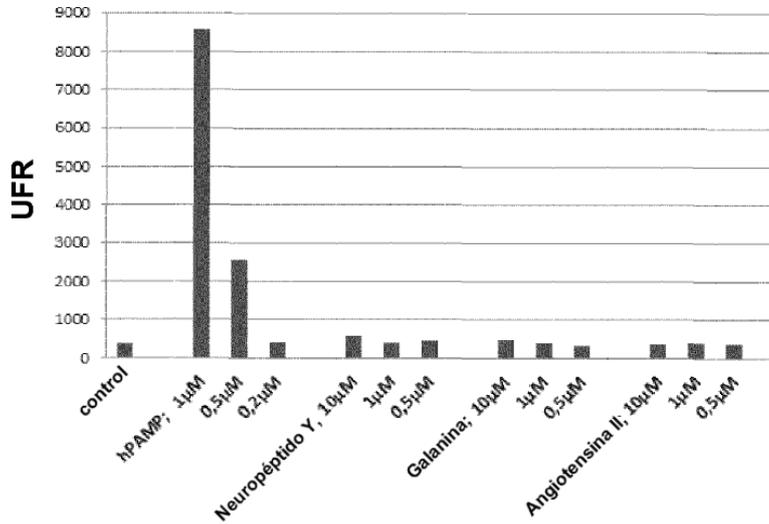


Fig. 12

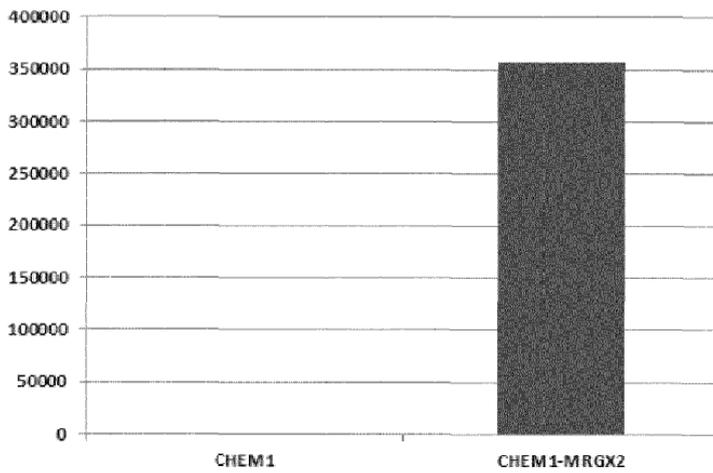


Fig. 13

SEQ ID NO: 5
caggaacgccttctctgtcta

Fig. 14

SEQ ID NO: 6
Cgtcctcagcctggccgg

Fig. 15

SEQ ID NO: 7
tggaagcagaggaagaggaa

Fig. 16

SEQ ID NO: 8

AAGTTCATCCGGCACCAGTC

Fig. 17

SEQ ID NO: 9
CCCAGAGGCATTGACAACAGGG

Fig. 18

SEQ ID NO: 10
TGGCCCTTGAATCTTCTACGA

Fig. 19

SEQ ID NO: 11
MRLAAALLLLLLALCVRALDGSKCKCSRKGPKIRYSDVKKLEMKPKYPHCEEKMOV
IVTTKSMSRYRGQEHCLHPKLQSTKRFIKWYNWNEKRRVYEE

Fig. 20

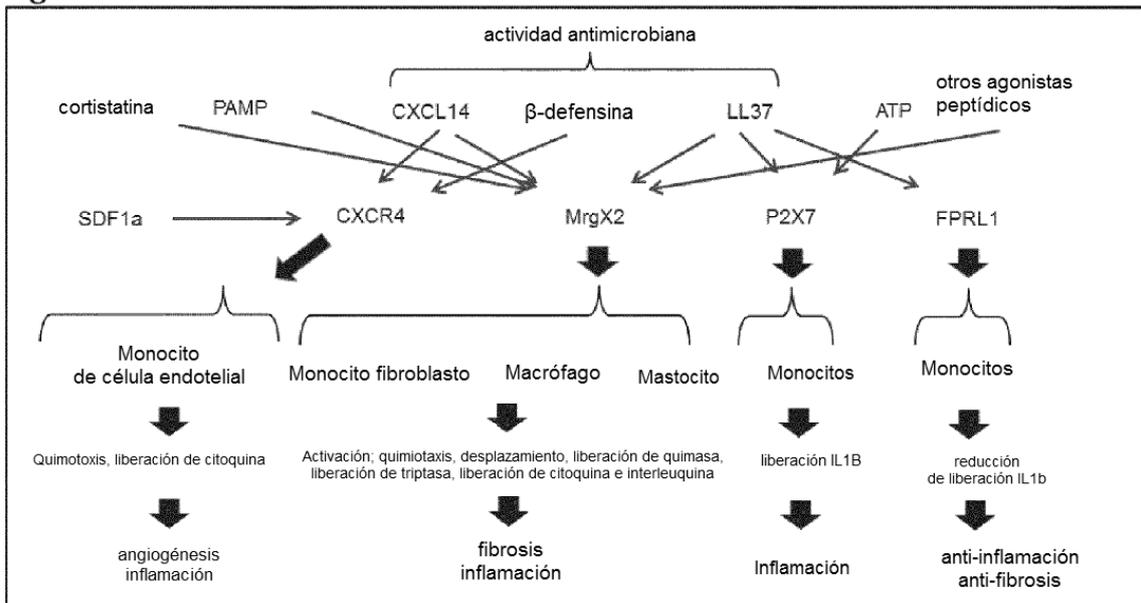


Fig. 21

SEQ ID NO: 12
SKCKCSRKGPKIRYSDVKKLEMKPKYPHCEEKMOVIITTKSVSRYRGQEHCLHPKLQS
TKRFIK

Fig. 22

SEQ ID NO: 13
SDVKKLEMKPKYPHCEEKMOVIITTKSVSRYRGQEHCLHPKLQSTKRFIKWYNWNE
KRRVYEE

Fig. 23

SEQ ID NO: 14

SKCKCSRKGPKIRYSDVKKLEMKPKYPHCEEK MVIITTKSVSRYRGQEHCLHPKLQW
YNAWNEKRRVYEE

Fig. 24

SEQ ID NO: 15

SKCKCSRKGPKKKLEMKPKYPHCEEK MVIITTKSVSRYRGQEHCLHPKLQSTKRFIK
WYNAWNEKRRVYEE

Fig. 25

SEQ ID NO: 16

SKCKCSRKGPKIRYSDVKKLEMKPKYPHCEEK QEHCLHPKLQSTKRFIKWYNAWNE
KRRVYEE

Fig. 26

SEQ ID NO: 17

KSVSRYRGQEHCLHPKLQSTKRFIKWYNAWNEKRRVYEE

Fig. 27

SEQ ID NO: 18

SKCKCSRKGPKIRYSDVKKLEMKPKYPHCEEK MVIITTKSVSRY

Fig. 28

SEQ ID NO: 19

STKRFIK

Fig. 29

SEQ ID NO: 20

LQSTKRFIKWY

Fig. 30

SEQ ID NO: 21

PKLQSTKRFIKWYNA

Fig. 31

SEQ ID NO: 22

STKRFIKWYNA

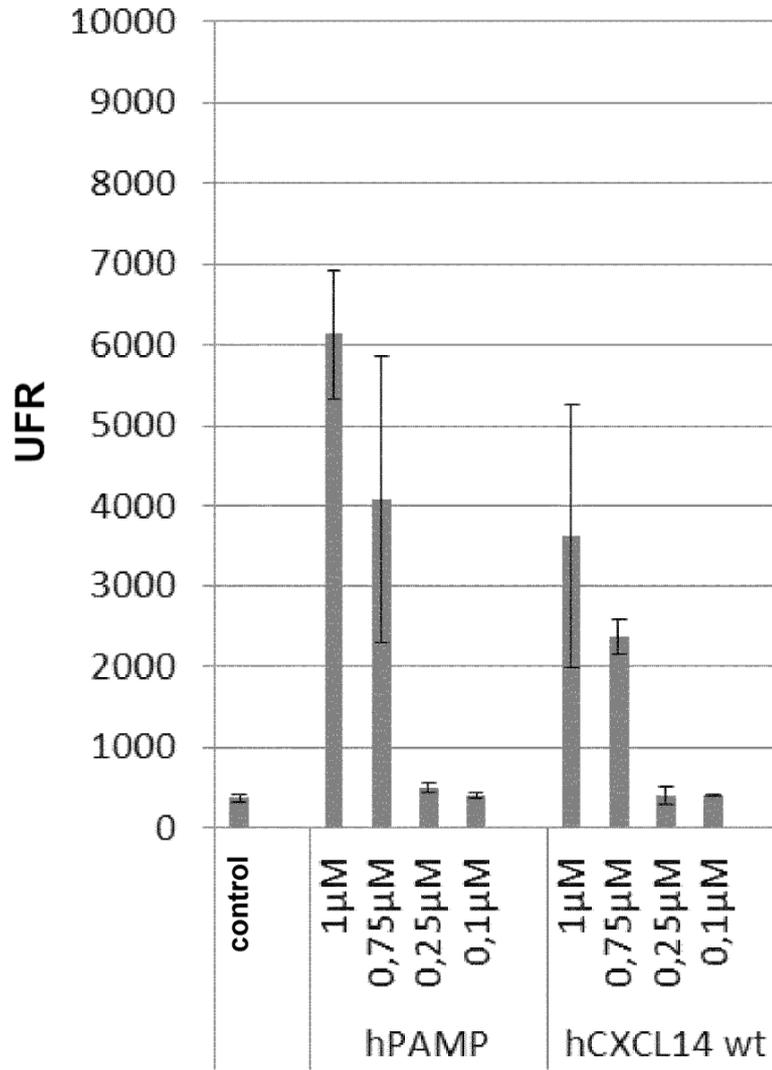
Fig. 32

SEQ ID NO: 23

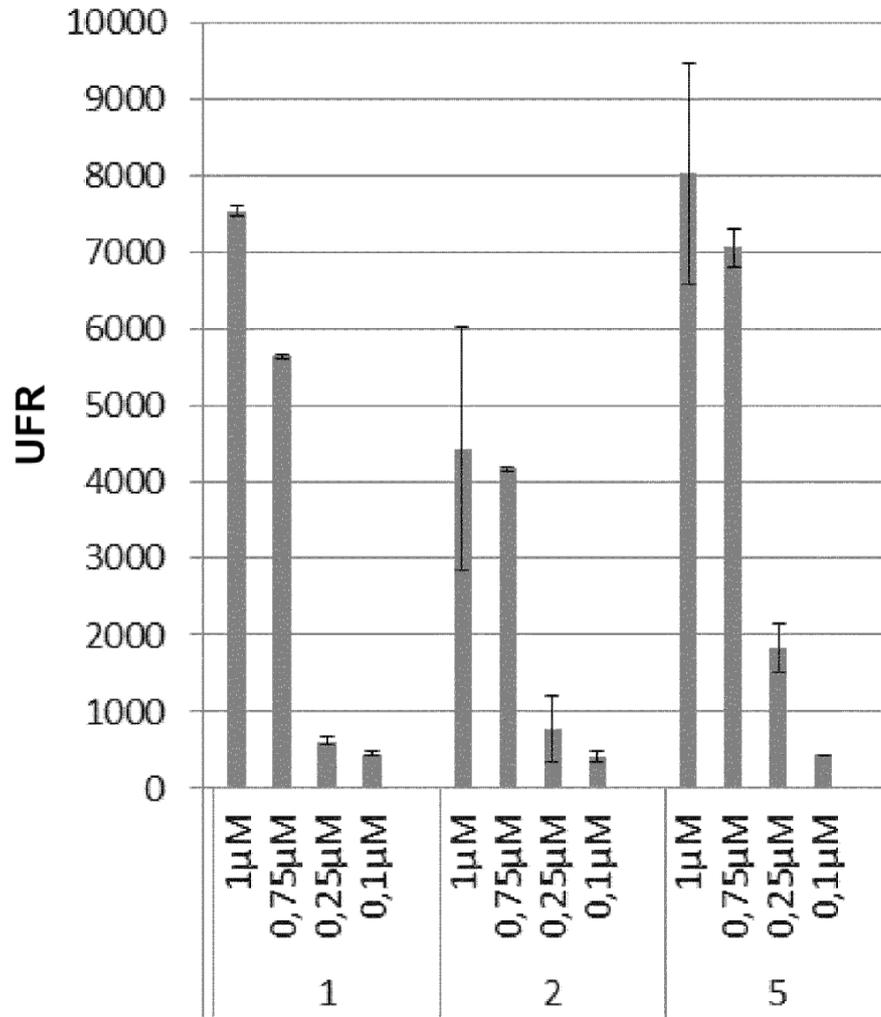
PKLQSTKRFIK

Fig. 33

A



B



C

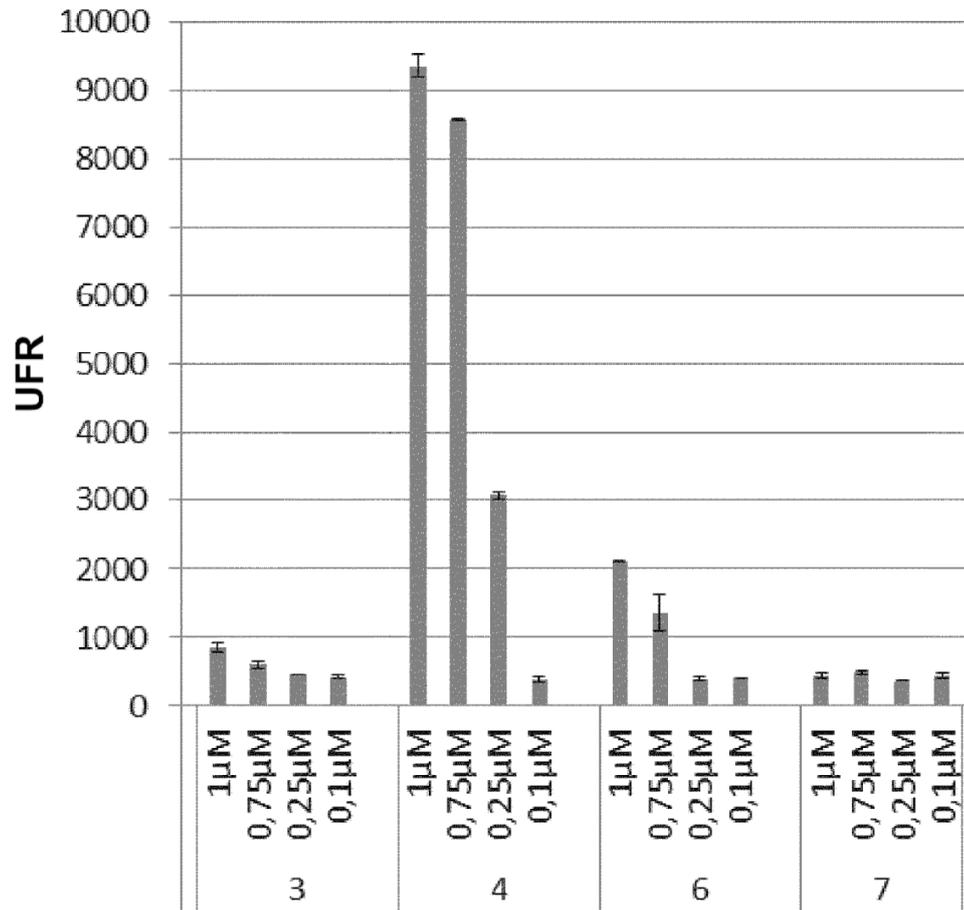
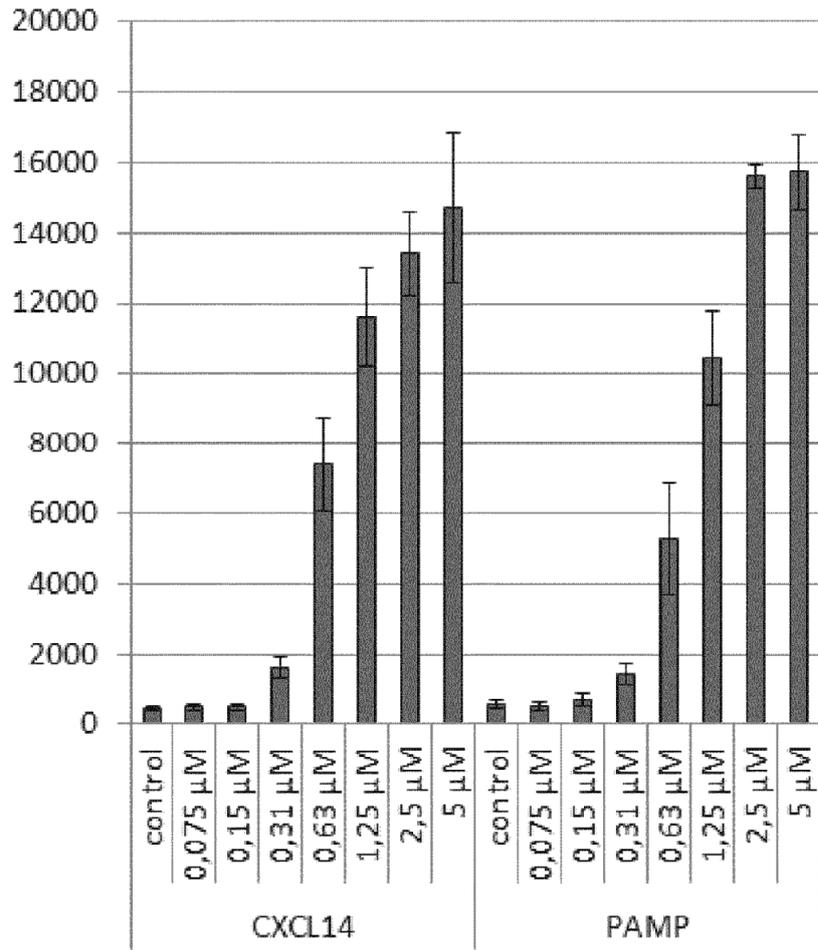
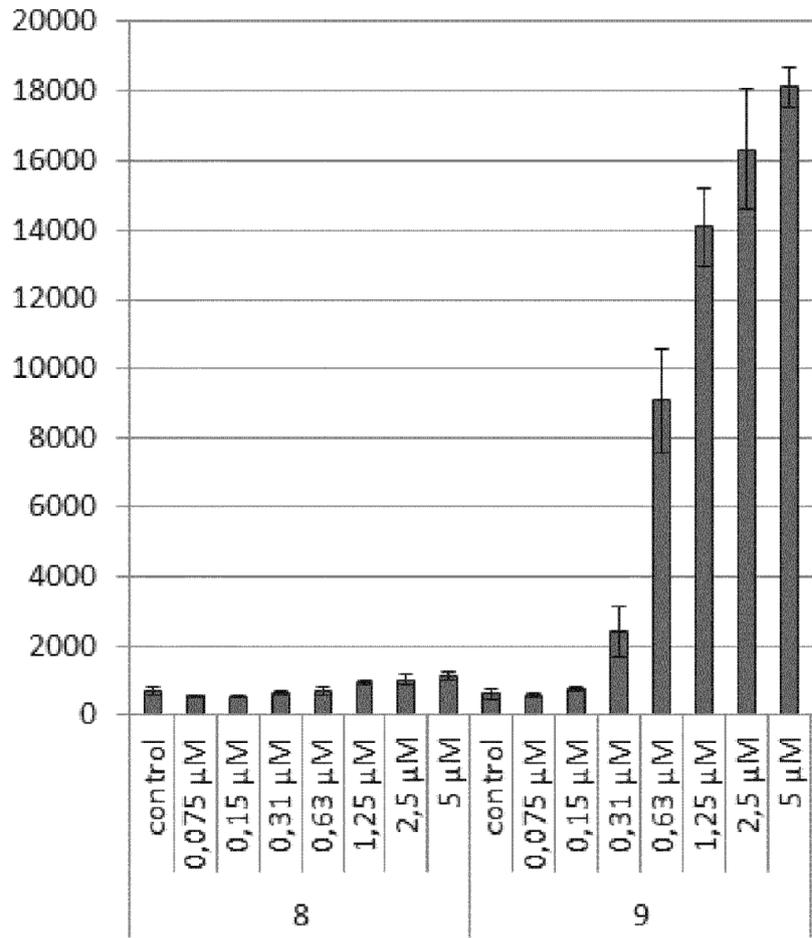


Fig. 34

A



B



C

