



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 399**

51 Int. Cl.:

A61K 39/085 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04740883 .6**

96 Fecha de presentación : **08.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1641926**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54

Título: **Uso terapéutico de LPI, un inhibidor de la vía de las lectinas de origen estafilocócico, en enfermedades inflamatorias.**

30

Prioridad: **08.07.2003 EP 03077138**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73

Titular/es: **UMC UTRECHT HOLDING B.V.**
Yalelaan 40
3584 CM Utrecht, NL

72

Inventor/es: **Van Wamel, Willem, Jan, Bastiaan;**
Rooijackers, Suzan, Huberdina, Maria;
Van Kessel, Cornelis, Petrus, Maria y
Van Strijp, Johannes, Antonius, Gerardus

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 399 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).

DESCRIPCION

La presente invención se refiere a un (poli)péptido que posee actividad de Inhibidor de la Vía de las Lectinas (Lectin Pathway Inhibitor) (LPI), para usar en la profilaxis y el tratamiento de reacciones inflamatorias,

5 El complemento es la serie compleja de más de 20 proteínas séricas que forman parte de nuestro sistema inmunitario innato. El complemento actúa por sí mismo (a través de la lisis de microbios) o en asociación con otros componentes del sistema inmunitario innato (por ejemplo, fagocitosis). Nuestro sistema inmunitario innato está implicado principalmente en la protección del cuerpo contra invasores extraños (por ejemplo, bacterias, virus, hongos, y también células cancerosas).

10 Las células más importantes del sistema inmunitario innato son las células dendríticas, monocitos/macrófagos y neutrófilos. Junto a esto, nuestro sistema inmunitario innato contiene una gran variedad de factores solubles tales como proteínas de fase aguda, péptidos antimicrobianos, peptidasas, partes de la cascada de la coagulación, y el sistema del complemento. La muerte y eliminación de invasores se realiza principalmente mediante los monocitos y los neutrófilos, por reconocimiento directo de los invasores o con ayuda de anticuerpos específicos y/o del sistema del complemento (opsonización).

15 Las células del sistema inmunitario innato reaccionan de un modo relativamente agresivo. Dado que ellas constituyen parte de la primera línea de defensa del cuerpo, su tarea más importante es matar y retirar el agente invasor tan rápidamente como sea posible. Esto se lleva a efecto por medio de sustancias muy agresivas (por ejemplo, radicales libres y enzimas) que no solamente son letales para el invasor, sino que también causan daño a las células huésped de los alrededores. Las sustancias procedentes de estas células dañadas y de las células activadas localmente que proceden del propio sistema innato atraen cantidades crecientes de neutrófilos y monocitos, lo que ocasiona inflamaciones locales adicionales.

20 En la mayor parte de los casos, es innecesaria una reacción inflamatoria agresiva y dañina tal, ocasionada por neutrófilos sobreactivados. En algunos casos esta respuesta inflamatoria es responsable de lesiones graves, a veces letales, e incluye afecciones tales como el Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto (ARDS), daño tisular grave que sigue a acontecimientos tromboticos tales como ataques cardiacos y apoplejia, enfermedades intestinales inflamatorias y artritis reumatoide.

25 La inflamación disminuirá una vez que todos los invasores hayan sido muertos y retirados, junto con las diversas células que hayan muerto durante el proceso. Después puede comenzar la curación de la herida causada por la respuesta inflamatoria. Aun cuando existe algún solapamiento de función, la tarea principal de los neutrófilos es atacar a los invasores y la tarea principal de los monocitos es retirar los desechos que resultan de este ataque. Además, los neutrófilos tienen otra tarea pacífica, la de ayudar al proceso de curación de las heridas.

30 Cuando el cuerpo ha sido invadido por bacterias, sustancias de origen microbiano activan el sistema del complemento directamente o por medio de anticuerpos preexistentes. La primera molécula implicada en la activación del complemento mediada por anticuerpos, es la C1q seguida de la activación de C1r y C1s. Una vía paralela no necesita anticuerpos específicos, debido a que reconoce directamente estructuras de la superficie microbiana. La H-ficolina, la L-ficolina o la Lectina que une Manosa (MBL), reconocen microbios y mediante la activación de unas enzimas específicas, Proteasas de Serina Asociadas a MBL, (MASP-2), es activado el resto del sistema del complemento.

35 En ambos casos, la activación prosigue a través de C4 y C2 y es activada la molécula central C3 del sistema del complemento. Esto lleva a más deposición de C3 mediante la vía alternativa (factores B, D, H, I, P). Una vez convertida C3 en C3b, C3bi o, incluso, en C3d, es la opsonina más importante y media en la absorción de microbios por los fagocitos, y, importantemente, activa también estos fagocitos en el proceso. A continuación de esta acción dirigida por los fagocitos, el sistema del complemento puede continuar desde C3 por medio de C5, C6, C7, C8 y C9 hasta la lisis de la célula tumoral, la célula infectada por virus, bacterias gram-negativas o durante acontecimientos inflamatorios no deseados, una de las células saludables de nuestro cuerpo.

40 Normalmente nuestras células están protegidas del ataque indeseado del complemento por una diversidad de mecanismos (C1INH, C4bp, CR1, MCP, DAF, H, I, P, CD59) pero en casos de alteración o de activación local sumamente alta, puede ocurrir todavía daño directo mediado por el complemento. Además, en el proceso de activación del complemento, la formación de opsoninas y el ataque a la membrana, corren en paralelo con la formación de moléculas pequeñas inflamatorias muy fuertes (C5a, C3a). Estas sustancias activan directamente fagocitos y otras células (por medio de receptores de C5a y C3a) de un modo muy eficaz, dando por resultado daño para los microbios o células sanas. La interacción con diferentes tipos de células da lugar también a la producción de otras quimioquinas (tales como la interleuquina-8, IL-8): sustancias que pueden activar y atraer células desde los vasos sanguíneos (el proceso de migración). Los neutrófilos interaccionan con estas sustancias, debido a que poseen receptores para estas sustancias en el exterior de sus membranas celulares. Una visión de conjunto de los componentes del sistema del complemento se proporciona en la Tabla 1.

55

Tabla 1

PROTEINAS IMPLICADAS EN LA CASCADA DEL COMPLEMENTO

	Unión a complejos Ag:Ab:	Clq	
	Reconocimiento directo de estructuras		
5	de la superficie microbiana:	MBL, H-Ficolina, L-Ficolina, M-Ficolina	
	Activación de enzimas:	C1r, C1s, C2b, B, D, MASPI,2,3,	
	Opsoninas de unión a membranas:	C4b, C3b	
	Mediadores de inflamación:	C5a, C3a, C4a	
10	Ataque a la membrana:	C5b, C6, C7, C8, C9	
	Receptores del complemento:	CR1, CR2, CR3, CR4, C1qr,	M-Ficolina
	Proteínas reguladoras del complemento:	C1INH, C4bp, CR1, MCP,	H, I, P, CD59

* Adaptado de Janeway and Travers Immunobiology, 1996; Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.

15 Los neutrófilos activados pueden emigrar fácilmente desde los vasos sanguíneos. Este hecho es debido a que las quimioquinas y los productos microbianos pueden haber aumentado la permeabilidad de los vasos y estimulado las células endoteliales de las paredes de los vasos para expresar ciertas moléculas de adhesión. Los neutrófilos expresan selectinas e integrinas (por ejemplo, CD11b/CD18) que se unen a estas moléculas de adhesión. Este proceso se denomina cebado (priming). Una vez que el neutrófilo se ha adherido a las células endoteliales, es capaz de emigrar a través de las células, bajo la guía de quimioquinas, hacia el lugar de la infección, donde la concentración de esas sustancias está en su máximo.

20 Estas sustancias activan también los neutrófilos produciendo una gama de otras moléculas, algunas de las cuales atraen más neutrófilos (y seguidamente monocitos), pero, principalmente, son responsables de la destrucción de las bacterias invasoras. Algunas de estas sustancias, (por ejemplo, radicales libres, enzimas que escinden proteínas (proteasas) y membranas celulares (lipasas), son tan reactivas e inespecíficas que destruyen células procedentes del tejido circundante (y de los propios neutrófilos), ocasionando daño a los tejidos. Este daño es exacerbado por la presencia de fluidos derivados de la sangre, que han traspasado la pared del vaso dañado y que es responsable del hinchamiento que siempre acompaña a la inflamación (denominado edema). La presión acumulada causada por estos fluidos en exceso da como resultado daño y muerte celular adicionales.

25 El comienzo de la reacción inflamatoria no tiene que tener, per se, origen microbiano. El daño tisular originado, en general, por falta de oxígeno, cambios de pH, desequilibrio salino o lesión físico, puede iniciar las reacciones inflamatorias. En muchos casos el acaecimiento clave es la activación del sistema del complemento. En enfermedades autoinmunitarias, la presencia de auto-anticuerpos da lugar a la activación de la vía clásica de complemento. En casi todos otros casos la activación de complemento ocurre por medio de la vía de las lectinas (véase, Jordan et al., Circulation, 2001, 104(12):1413-8; Collard et al., Am. J. Pathol. 2001, 159:1045-54; Roos et al., J. Immunol. 2001, 167:2861-8; Collard et al., Am. J. Pathol., 2000, 156:1549-56; Collard et al., Mol. Immunol., 1999, 36:941-8). Por consiguiente, la vía de las lectinas de activación del complemento tiene una importancia crucial como la primera etapa de muchos estados y enfermedades inflamatorias.

30 Más tarde, en el proceso inflamatorio, los monocitos emigran hacia la escena y llegan a activarse. Además de su papel para eliminar bacterias y restos celulares, los monocitos producen también sustancias tales como el factor de la necrosis tumoral (TNF) y la IL-8, que, a su vez, atraen más neutrófilos activados, ocasionando más daño local. El TNF ejerce también un efecto estimulante directo sobre los neutrófilos. Una vez que todos los invasores han sido eliminados, la respuesta inflamatoria disminuye y la zona quedará libre de las restantes "pérdidas". Entonces comienza el proceso de curación de las heridas. Aunque es sabido que los neutrófilos desempeñan un papel fundamental en la curación de heridas, no está claro que sustancias que derivan de los neutrófilos estén involucradas, ni en que modo los neutrófilos son activos en la curación de heridas sin ser agresivos para el tejido circundante. En general, el tejido lesionado es reemplazado por tejido cicatrizal formado principalmente por fibroblastos y colágeno.

35 Cuanto la inflamación tiene lugar en zonas del cuerpo con una función importante, tales como tejidos formados a partir de células de la musculatura cardíaca, células del cerebro o células alveolares del pulmón, la función normal estará comprometida por la formación de cicatrices que resulta, ocasionando estados graves tales como fallo cardíaco, parálisis y enfisema. Para reducir al mínimo las consecuencias debilitantes de estos estados, es importante "enfriar" la reacción inflamatoria tan rápidamente como sea posible.

La intervención para regular la respuesta inflamatoria de la fase aguda precoz, presenta la oportunidad de mejorar el pronóstico en una amplia gama de pacientes cuyos síntomas pueden ser investigados hasta un acontecimiento tal. Tal enfoque ha sido recomendado para muchas enfermedades agudas y crónicas de base inflamatoria y ha puesto de manifiesto que posee potencial basándose en descubrimientos procedentes de modelos de enfermedad relevantes. Los fármacos antiinflamatorios clásicos tales como los esteroides y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS) no tienen el perfil de acción ideal, tanto en lo referente a eficacia como a seguridad. Los esteroides afectan al tipo de célula "errónea" (monocitos) y sus efectos desalentadores son desviados fácilmente. Los NSAIDS muestran, en general, un efecto relativamente suave debido en parte a que intervienen en una etapa tardía del proceso inflamatorio. Ambas clases de fármacos producen una serie de efectos secundarios indeseables que resultan de otros aspectos de su actividad farmacológica.

Diversos fármacos, en desarrollo precoz, solamente interfieren con mediadores tardíos de la vía de la activación de los neutrófilos (por ejemplo, inhibidores de la convertasa de C5, anticuerpos contra C5a, fármacos bloqueantes del receptor de C5a, anticuerpos contra integrinas (tales como CD11b/CD18) y L-selectina sobre neutrófilos, y anticuerpos contra moléculas de adhesión (tales como ICAM-1 y E-selectina) sobre células endoteliales).

Los anticuerpos contra el TNF y la IL-8 tienen efectos en la inflamación crónica, pero solamente efectos marginales en la inflamación aguda, debido al papel mínimo que desempeñan los monocitos (que son principalmente responsables de la producción de estas sustancias) en la fase aguda y debido a que reaccionan incluso más tarde en la cascada de la inflamación. En muchos casos sería sumamente deseable detener la cascada inflamatoria en una fase tan precoz como fuera posible. Esto es cierto, también, debido a que esta cascada no es lineal sino que se ramifica en etapas diferentes que causan redundancia en las fases tardías.

Con frecuencia, la causa de la inflamación aguda no puede ser apartada

y la inflamación se hace crónica. Con excepción de la tuberculosis, la hepatitis crónica y otros determinados estados, este es rara vez el caso con las infecciones. No obstante, la inflamación crónica puede ser causada también por otros estímulos distintos de las bacterias, tales como reacciones autoinmunitarias. La investigación realizada ha puesto de manifiesto que en la inflamación crónica el papel de los monocitos es mucho más importante, y que la emigración y activación de los neutrófilos, la emigración y activación de los monocitos, el daño tisular, la retirada de las células muertas y la curación de heridas todo ello tiene lugar al mismo tiempo.

Esta cascada compleja de interacciones entre células y muchas citoquinas y quimioquinas diferentes ha sido el objeto de una investigación intensa durante muchos años. Se pensó que los monocitos y sus productos eran los elementos más importantes que era necesario inhibir para amortiguar la inflamación crónica. Esto explica porqué los esteroides, que interactúan específicamente con los monocitos, son generalmente más eficaces en la inflamación crónica en oposición a la enfermedad aguda. El tratamiento de larga duración con esteroides, no es, sin embargo, una opción deseable debido a que pueden tener lugar efectos secundarios graves e inaceptables en las dosis requeridas para producir un efecto clínico.

Tratamientos más recientes que utilizan anticuerpos contra el TNF o la IL-8 han puesto de manifiesto buenos resultados, y fueron considerados inicialmente como prueba del papel principal que se pensaba que los monocitos desempeñaban en la inflamación crónica. Investigaciones recientes arrojan dudas sobre un papel exclusivo de los monocitos en la inflamación y apunta a un papel crítico para los neutrófilos, que actualmente se considera que representan mejores dianas para la intervención terapéutica. Asimismo en la inflamación crónica todavía podría ser deseable amortiguar la iniciación precoz de la activación en oposición a bloquear totalmente una de las fases tardías. Este tratamiento de las fases precoces (por ejemplo, la inhibición de la vía de las lectinas) podría conducir en su debido curso a modificar la progresión de la enfermedad o incluso llevar a una cura completa, y no, justamente, a un alivio sintomático.

En la investigación que condujo a la presente invención el gen, el (poli)péptido y su función para un nuevo agente con propiedades de inhibición de la inflamación, se descubrió en la bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Recientemente, los inventores han descrito un agente de modulación de neutrófilos, CHIPS (proteína de estafilococos Inhibitoria de la quimiotaxis) según se ha descrito en el documento PCT/NL99/00442, que se descubrió que estaba situada sobre un bacteriófago. En este fago se descubrió una denominada Isla de Patogenicidad que contenía cuatro genes, los genes de CHIPS (chp), estafiloquinasa (sak) y enterotoxina A (sea), y un cuarto marco de lectura abierto desconocido (**figura 1**).

Los inventores encontraron que los tres genes conocidos son factores de virulencia que poseen una cosa en común. Todos ellos interfieren con el sistema inmunitario innato. La proteína CHIPS, como encontraron, inhibe la quimiotaxis hacia C5a y fMLP. La estafiloquinasa interfiere por medio de la plasmina humana, como los inventores han indicado recientemente, con opsonización mediada por IgG y también con opsonización mediada por el complemento. Además, otros han descrito recientemente que SAK causa destrucción de defensinas, péptidos antimicrobianos importantes. La enterotoxina A se ha descrito como un superantígeno que interfiere con la inmunidad adaptativa, pero otros han encontrado también que bloquea la respuesta a ciertas quimioquinas por modulación de receptores de quimioquina.

De estos hechos, los inventores llegaron a la conclusión de que el cuarto marco de lectura abierto dentro de SaPI-5, con una función desconocida, era muy probable que codificara una proteína que pudiera interferir también con

la inmunidad innata. La hipótesis fue que este marco de lectura abierto podría inhibir algún mecanismo inmunitario innato, importante para combatir las infecciones por estafilococos de un modo u otro.

5 Para comprobar esta hipótesis los inventores clonaron y expresaron la proteína codificada de este marco de lectura abierto en *E. coli* y purificaron la proteína hasta obtener homogeneidad. Esta proteína pura fue evaluada en varios de sus ensayos de inmunidad innata *in vitro*, en particular: quimiotaxis, quimioquinesis, inducción de citoquinas (TNF, IL-1, IL-6, IL-10), inducción de quimioquinas en sangre total o en monocitos aislados o en células mononucleares aisladas, ensayos de flujo de Ca con neutrófilos o células mononucleares y citometría de flujo, ensayos de adherencia (fluorómetro), trans migración de neutrófilos a través del endotelio (fluorométrico), polimerización de actina (citometría de flujo), fagocitosis (absorción) de eritrocitos estándar opsonizados (citometría de flujo), fagocitosis (opsonización) de neutrófilos estándar con opsoninas diferentes y bacterias diferentes, ensayos cuantitativos de muerte bacteriana, ensayos de despolarización de la membrana (estación FLEX), medidas de ruptura metabólica en un luminómetro (producción de radicales O₂), ensayos de cebado para fMLP. PAF, etc. (luminómetro), ensayos de desgranulación para MPO y elastasa (estación FLEX), ensayos de expresión de receptores (fenotipificación de neutrófilos/monocitos para receptores de inmunidad innata, citometría de flujo) etc. Después de esto se llegó a la conclusión de que el LPI es, sin duda, un modulador de la inmunidad innata. Específicamente, inhibe la vía de las lectinas de activación del complemento. Por consiguiente, la proteína fue denominada LPI (Lectin Pathway Inhibitor), Inhibidor de la vía de las lectinas.

20 Así pues, la proteína LPI fue designada por evolución estafilocócica, específicamente para inhibir la vía de las lectinas de activación del complemento. Esta es la vía, que constituye la amenaza máxima para los estafilococos en las fases tempranas una vez que han invadido el cuerpo humano. Ambas, la MBL y las ficolinas pueden reconocer directamente la pared de la célula estafilocócica e iniciar la cascada del complemento, conduciendo a la atracción de neutrófilos (C5a, C3a) y a la opsonización de los estafilococos. Por esta razón, los inventores han demostrado asimismo la actividad del LPI en la fagocitosis de los estafilococos en el Ejemplo 3. Después de evaluar el LPI en todas las vías de la cascada del complemento separadas los inventores llegaron a la conclusión de que el LPI es un inhibidor específico de la vía de las lectinas (**figuras 10, 11 y 12**). Después de evaluar la proteína LPI en todas las etapas separadas de la vía de las lectinas dedujeron que el LPI inhibe la activación del complemento mediada por la vía de las lectinas, al inhibir la actividad de escisión de C2 de la MASP-2 pero no la actividad de escisión de C4 de la MASP-2 (**figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20**).

Por tanto la actividad de LPI se define del modo siguiente:

30 La proteína LPI evita la activación de la vía de las lectinas de activación del complemento evitando específicamente la escisión de C2 dependiente de la MASP-2, para dar C2a y C2b.

35 A continuación del gen de LPI (**figura 2a, SEQ ID NO:2**) fueron identificados otros tres genes homólogos, procedente también de *S. aureus*, denominados lpi-B (**SEQ ID NO: 4**), lpi-C (**SEQ ID NO:6**) y lpi-D (**SEQ ID NO: 8**). Estos genes fueron clonados, expresados y ensayados por la actividad de lpi. Las proteínas codificadas por estos genes son LPI-B (**SEQ ID NO: 5**), y LPI-C (**SEQ ID NO: 7**) y LPI-D (**SEQ ID NO: 9**) (**figura 3**). Se dedujo que las proteínas LPI-B y LPI-C poseen actividad semejante a LPI. La LPI-D tiene una homología más baja y no tiene actividad de LPI.

La presente invención, por consiguiente, proporciona un péptido o polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que corresponde a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

40 a) una secuencia de nucleótidos que comprende una parte de una de las secuencias representadas en la **figura 2a y 2b** e identificadas como **SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO:6**;

b) secuencias de nucleótidos que codifican un péptido o polipéptido que posee actividad de LPI y que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la **figura 3** e identificadas como **SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7**;

45 c) secuencias de nucleótidos que codifican un péptido o polipéptido que posee actividad de LPI y que tiene una parte de la secuencia de aminoácidos representada en la **figura 3** e identificadas como **SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7**;

d) secuencias de nucleótidos que son al menos 40% idénticas con una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a), b) o c);

50 e) secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones restrictivas con una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a), b), c) o d), y

f) secuencias de nucleótidos complementarias de cualquiera de las secuencias de nucleótidos a), b), c), d) o e),

en donde dicho péptido o polipéptido posee actividad de LPI (Inhibidor de la vía de las lectinas), que evita la activación de la vía de las lectinas de activación del complemento evitando específicamente la escisión de C2, dependiente de la MASP-2, para dar C2a y C2b.

55 y dicho péptido o polipéptido es para usar en la profilaxis o el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas y crónicas.

El documento WO94/06830 describe ya una proteína de unión de *Staphylococcus aureus* que manifiesta una identidad de 100% con SEQ ID NO: 5. La proteína se usa para inmunizar ratones contra infecciones de *S. aureus* y para bloquear infecciones de heridas. La escisión C2 dependiente de la MASP-2 para dar C2a y C2b, y su uso para la prevención o el tratamiento de inflamaciones, no se describen en este documento.

5 El genoma completo del *Staphylococcus aureus* ha sido secuenciado y puede encontrarse en las bases de datos internacionales, regulares, tales como GenBank, RefSeq y PDB. Las secuencias anteriores identificadas por SEQ ID NOS: 2, 4 y 6, pueden encontrarse en la base de datos como parte de una secuencia más larga. El ácido nucleico en forma aislada como relacionado con la función descrita es, sin embargo, nuevo. Los números de registro de las proteínas hipotéticas identificadas ahora como LPI, son:

10 gi | 14247715 | dbj | BAB58104.1 | y gi | 13701735 | dbj | BAB43028.1 |.

El LPI codifica una proteína putativa de 116 aminoácidos que comparte una homología de 35-45% con otras proteínas de *Staphylococcus aureus* del mismo tamaño, LPI-B (gi | 13700958 | dbj | BAB42254.1 | gi | 14246929 | dbj | BAB57321.1 |), y LPI-C (gnl | Sanger-159288 | *Staphylococcus* (procedente de la base de datos de Sanger (*S. aureus* 252, (MRSA 16))).

15 Estas secuencias están representadas en la **figura 2b** (lpi-B, **SEQ ID NO:4**, lpi-C, **SEQ ID NO:6**).

Se ha puesto de manifiesto que las proteínas codificadas por los genes homólogos lpi-B y lpi-C poseen, al menos, actividad de LPI (**figura 8b**).

20 Con respecto al término "idéntico" que se indica en d) anterior hay que hacer notar que identidad y homología se utilizan indistintamente. Hay que hacer notar, además, que para alineaciones abiertas, pueden estimarse parámetros estadísticos usando el algoritmo de Smith-Waterman que produce calificaciones óptimas de las alineaciones. Los homólogos de la secuencia de los ácidos nucleicos o secuencia proteínica de LPI, están definidos por una Penalización de Apertura de la Mella (Gap Open Penalty) de 12 por lo menos y una Penalización de Expresión de la Mella de 1 por lo menos.

25 La secuencia indicada en la **figura 2a** (**SEQ ID NO: 2**) es una realización de la secuencia de DNA que codifica el (poli)péptido de la invención. Esta secuencia comprende una región de promotor desde los nucleótidos 1 a 86, una secuencia de péptido conductor desde los nucleótidos 87 a 179, la región de codificación del (poli)péptido que posee actividad de LPI, desde el nucleótido 180 a 434, así como una región 3' sin traducir, desde los nucleótidos 435 a 510.

30 El gen presentado por LPI de la **figura 2a** o cualquier ácido nucleico derivado de éste puede, por ejemplo, ser ligado operablemente al sistema de expresión trc (Brosius et al., Gene 27: 161-172 (1984)). Se conocen muchas otras secuencias de control de la expresión adecuadas y métodos adecuados de expresión de proteínas recombinantes (F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, N.Y.)

35 La secuencia de nucleótidos indicada en la **figura 2a** contiene también una secuencia de péptido conductor. La región codificante de la proteína madura corresponde a los nucleótidos 180 a 434 de la **figura 2a**. Pueden usarse otras secuencias conductoras, o puede omitirse totalmente la secuencia conductora, dependiendo de la célula huésped en la que la secuencia haya de ser expresada.

La secuencia de aminoácidos de la **figura 3** (LPI) (**SEQ ID NO: 3**) está deducida desde la secuencia de DNA de la **figura 2a**. En otra realización de la invención la molécula de ácido nucleico que codifica el (poli)péptido puede tener, por tanto, una secuencia de nucleótidos que corresponde a todas las variantes degeneradas del gen de LPI, el gen lpi-B o el gen lpi-C.

40 La invención se refiere, además, a (poli)péptidos codificados por moléculas de ácidos nucleicos que no poseen las secuencias completas de LPI (**SEQ ID NO: 3**), LPI-B (**SEQ ID NO: 5**) o LPI-C (**SEQ ID NO: 7**) de la **Figura 3**, sino una o más de sus partes funcionales que por sí mismas o en conjunto constituyen un (poli)péptido biológicamente activo que posee actividad de LPI. "Una parte" tal como se emplea en esta memoria no excluye la posibilidad de que un (poli)péptido comprenda más de una parte y debe interpretarse, por tanto, como "al menos una". Tales partes pueden variar de tamaño desde la secuencia de aminoácidos completa menos un aminoácido hasta péptidos de al menos 2, preferiblemente al menos 5, aminoácidos. En el caso de que la parte activa de la proteína radique en dos o más partes de la secuencia de aminoácidos completa, la invención se refiere también a secuencias de ácidos nucleicos que codifican estas partes separadas, de un modo que conduce a una configuración peptídica que retiene la actividad biológica. En la práctica, esto puede significar, por ejemplo, que secuencias espaciadoras han de estar incorporadas entre partes biológicamente activas para llevar a una conformación biológicamente activa.

Por consiguiente, cuando se hace referencia a "al menos parte de la secuencia" esto significa que no solamente las tres partes anteriormente descritas (es decir, para LPI: nucleótidos 1-434, 87-434 y 180-434), sino también otros fragmentos del gen o sus combinaciones, con tal que ellos codifiquen todavía un (poli)péptido que posea actividad de LPI.

55 En otra de sus realizaciones, la invención se refiere, por tanto, a un (poli)péptido codificado por una molécula de ácido nucleico aislada que consiste en la región codificante de una o más partes de la secuencia de aminoácidos de LPI (**SEQ ID NO: 3**), LPI-B (**SEQ ID NO: 5**) o LPI-C (**SEQ ID NO: 7**) de la **figura 3**, en la que una parte de la secuencia

de aminoácidos constituye, sola o con otras partes de la secuencia de aminoácidos, la región o regiones del (poli)péptido que poseen actividad de LPI que conducen a actividad biológica.

5 La presente invención no se limita a (poli)péptidos codificados por moléculas de ácidos nucleicos que tienen la misma secuencia exacta que la secuencia lpi (**SEQ ID NO: 2**), lpi-B (**SEQ ID NO: 4**) o lpi-C (**SEQ ID NO: 6**) representadas en la **figura 2a** y **2b** o sus variantes descritas anteriormente. Por consiguiente, según la invención, los (poli)péptidos pueden ser codificados por moléculas de ácidos nucleicos adicionales que poseen una secuencia de nucleótidos que es al menos 40%, preferiblemente, al menos 50%, más preferiblemente, al menos 60%, todavía más preferiblemente, al menos 70% , más preferiblemente, al menos 80% y lo más preferible, al menos 90%, idéntica u homóloga respecto a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos definidas en los apartados a), b) o c) anteriores.

10 La homología tiene que ser determinada a lo largo de toda la longitud de la secuencia homóloga.

Se ha descubierto que el LPI es menos de 40% homólogo con las proteínas y los péptidos conocidos hasta la fecha. Las proteínas y los péptidos que muestran al menos 40% de homología de aminoácidos con respecto a la proteína LPI y que poseen actividad de LPI, son asimismo, por tanto, parte de esta invención.

15 La invención se refiere, además, a (poli)péptidos codificados por moléculas de ácidos nucleicos que poseen una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones restrictivas con una molécula de ácido nucleico que corresponde a la secuencia de nucleótidos lpi (**SEQ ID NO: 2**), lpi-B (**SEQ ID NO:4**) o lpi-C (**SEQ ID NO: 6**) indicada en la **figura 2a** ó **2b** o sus secuencias degeneradas, que codifican una secuencia de aminoácidos LPI (**SEQ ID NO: 3**), LPI-B (**SEQ ID NO: 5**) ó LPI-C (**SEQ ID NO: 7**), según indica la **Figura 3**. Las condiciones restrictivas están constituidas por hibridación durante la noche a 42°C en el seno de SSC 5x (SSC = NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM) y lavado a 20 65°C en SSC 0,1x. Además del SSC 5x la solución de hibridación puede comprender formamida, 50%, fosfato sódico, 50 mM (pH 7,6) solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano, 10%, y DNA de esperma de salmón cortada, desnaturalizada, 20 mg/ml.

25 La invención no se limita, asimismo, a (poli)péptidos codificados por el gen que codifica el (poli)péptido que posee actividad de LPI, sino que también se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que codifican su fragmentos, derivados y análogos. "Fragmentos" se entiende que incluye todas las partes del (poli)péptido que retienen su actividad biológica. "Los "Fragmentos" pueden consistir en una secuencia de aminoácidos consecutivos o de más de una de tales secuencias. "Derivados" son el (poli)péptido completo que posee actividad de LPI o sus fragmentos que han sido modificados de algún modo. Ejemplos de modificaciones se indican en esta memoria más adelante. Un ejemplo se expone en el Ejemplo 3, la molécula de LPI marcada con His también posee actividad de LPI. "Análogos" son 30 (poli)péptidos similares que poseen actividad de LPI aislados desde otros organismos, en particular otros organismos patógenos. Todas las categorías anteriores tienen una cosa en común, a saber, que poseen "actividad de LPI". La actividad de LPI puede medirse mediante cualquier ensayo que muestre inhibición de actividad del complemento. Como ejemplos de tales ensayos se incluyen la deposición de fragmentos de C2, C4 ó C3 sobre una bacteria o un eritrocito, medidas de CH50 usando la lisis de eritrocitos como lectura , y otros. Por consiguiente, para la presente solicitud, la expresión "(poli)péptidos que poseen actividad de LPI" se entiende que incluye las proteínas originales LPI, LPI-B y LPI-C y sus homólogos en forma aislada o recombinante, y otros (poli)péptidos, fragmentos, derivados y análogos que 35 manifiestan actividad de LPI.

También se describen en esta memoria sondas y cebadores que derivan de la molécula de ácido nucleico de la invención. Tales cebadores son oligonucleótidos o polinucleótidos de al menos, aproximadamente, 10 nucleótidos (nt) 40 consecutivos, y más preferiblemente al menos, aproximadamente, 25 nt, todavía más preferiblemente al menos, aproximadamente, 30 nt, y aún más preferiblemente aproximadamente 30-70 nt de la molécula de ácido nucleico de la invención. Las sondas son más largas y pueden ser, por ejemplo, una parte de la molécula de ácido nucleico de la invención de 50-300 nucleótidos consecutivos, o incluso tan largas como la molécula de ácido nucleico completa.

45 Tales oligonucleótidos o polinucleótidos son útiles como sondas de diagnóstico o como sondas en técnicas convencionales de hibridación de DNA o como cebadores para la amplificación de una secuencia diana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PRC) según figura descrito, por ejemplo, en la referencia de Ausubel et al., (*supra*) u otras técnicas de amplificación, tales como NASBA.

Además, se describe en esta memoria un vector recombinante que comprende al menos una molécula de 50 ácido nucleico aislada, de la invención. El vector que ha de usarse puede ser seleccionado por la persona experimentada basándose en su conocimiento general común, y dependerá del hospedador que se usa.

Además de vectores, se describe un bacteriófago que comprende por lo menos un ácido nucleico aislado que codifica el (poli)péptido de la invención. En la mayoría de los estafilococos LPI-positivos, el gen que codifica LPI está situado sobre un profago y puede cambiarse en un fago activo, por ejemplo, por tratamiento con mitomicina-C según procedimientos operatorios de aislamiento de fagos, estándar y publicados. Un bacteriófago es, por tanto, un vehículo 55 útil para introducir el gen de LPI en un hospedador.

Además, se describe un método para obtener un vector recombinante que comprende insertar al menos una molécula de ácido nucleico aislada, de la invención, en un vector. Por incorporación de más de una copia en el vector, o por introducción de más de un vector en un hospedador, puede influirse en el nivel de expresión. Cuando se usa una célula huésped que comprende un gen endógeno para el correspondiente (poli)péptido que posee actividad de LPI, su nivel de expresión puede aumentarse introduciendo más copias de la molécula de ácido nucleico (es decir, el gen) en la 60 célula huésped. o cambiando las regiones de promotor o regulador.

Asimismo se describen células huésped recombinantes que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico aislada o vector. Diversos tipos de organismos o células procedentes de procariotas, protistas, hongos, animales o plantas pueden actuar como hospedadores adecuados para la expresión de (poli)péptidos recombinantes que poseen actividad de LPI. Las células huésped incluyen la cepa bacteriana, profusamente utilizada, *Escherichia coli* (E. coli) que incluye, aun cuando no se limita a ello, el sistema de expresión trc (Brosius et al., *supra*) que permite una expresión regulada, de alto nivel, del promotor trc. Otras cepas bacterianas potencialmente adecuadas, incluyen cepas bacterianas Gram-positivas, tales como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas. Un proceso de producción preferido en *E. coli* se da en el Ejemplo 2.

El (poli)péptido que posee actividad de LPI puede producirse también como una proteína recombinante utilizando un sistema de expresión adecuado empleando eucariotas inferiores tales como células de levadura o células de insecto. Las cepas de levaduras adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Candida* o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las células de insecto usadas para la expresión de proteínas recombinantes incluyen el sistema *Drosophila* y el sistema *Baculovirus*. Alternativamente, puede ser posible producir el (poli)péptido que posee actividad de LPI en un sistema de expresión de mamífero que incluye varias células huésped adecuadas, con inclusión de células de mono COS, células de hámster CHO, BHK o RBL-2H3, células humanas 293, 3T3, HeLa, U937, HL-60, ó células Jurkat, células de ratón L y otras células transformadas para cultivo *in vitro*. Para la expresión en sistemas eucarióticos de (poli)péptidos que poseen actividad de LPI, puede ser necesario modificar la proteína producida en ellos con objeto de obtener una proteína funcional. Tales modificaciones, como uniones o sustituciones, pueden conseguirse usando métodos conocidos, químicos o enzimáticos. Además, la secuencia de la molécula de ácido nucleico pueden ser adaptada al uso de codones de la célula huésped.

El (poli)péptido de la invención que posee actividad de LPI, puede ser expresado también como un producto de animales transgénicos, por ejemplo, como un componente de la leche de vacas transgénicas, cabras, cerdos, ovejas, conejos o ratones, caracterizados por células somáticas o germinales que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el (poli)péptido que posee actividad de LPI.

Alternativamente, el (poli)péptido que posee actividad de LPI puede ser expresado en una forma que facilite su purificación. Por ejemplo, puede ser marcado con un epítipo de polihistidina (6xHis) y purificado seguidamente usando una resina a la que se hayan unido iones de níquel por medio de un agente quelante. El (poli)péptido que posee actividad de LPI que contiene la marca es eluido desde la resina por disminución del pH o por competencia con imidazol o histidina. Tal epítipo está disponible en el comercio procedente de Invitrogen (Breda, Países Bajos). La introducción de un sitio de escisión por proteasas, al igual que para la enteroquinasa, permite la separación de la marca de fusión para generar el (poli)péptido recombinante nativo, maduro, que posee actividad de LPI. Materiales y métodos para un sistema de expresión tal se encuentran disponibles en el comercio procedentes de Invitrogen, usando los vectores pTrcHis Xpress™ en combinación con la resina ProBound™, para un aislamiento eficaz de la proteína marcada con His y EnterokinaseMax™ como proteasa activa altamente catalítica y la resina de afinidad de enteroquinasa EK-Away™ para eliminar la presencia contaminante de la proteasa. Otras marcas conocidas por los expertos en la técnica, que pueden ser empleadas para facilitar la purificación, incluyen, aun cuando no se limita a ellas, glutatión S transferasa (fusión de GST), myc y HA.

El (poli)péptido que posee actividad de LPI puede producirse, también, mediante síntesis química conocida. Métodos de construcción de polipéptidos o proteínas por medios sintéticos, son conocidos por los expertos en la técnica. La proteína sintética, en virtud de poseer en común características primaria, secundaria o terciaria, estructurales y/o conformacionales con el (poli)péptido correspondiente que posee actividad de LPI, poseerá una actividad en común con éste, lo que significa propiedades de LPI. Así pues, tales proteínas obtenidas sintéticamente pueden ser empleadas como sustituto biológicamente activo o sustituto inmunológico para el (poli)péptido natural purificado que posee actividad de LPI.

Los (poli)péptidos que poseen actividad de LPI proporcionados aquí incluyen también (poli)péptidos caracterizados por secuencias de aminoácidos en las que existen modificaciones naturales o han sido producidas deliberadamente. Las modificaciones en las secuencias de (poli)péptidos o de DNA, pueden realizarse por los expertos en la materia empleando técnicas convencionales conocidas. Las modificaciones de interés en las secuencias de (poli)péptidos con actividad de LPI pueden incluir reemplazo, inserción o delección en la secuencia codificante de restos de aminoácidos seleccionados..

La información contenida en la proteína LPI, su gen y otros (poli)péptidos que poseen actividad de LPI y sus moléculas de ácido nucleico codificantes derivadas de ello, puede utilizarse para seleccionar sus fragmentos u otros agentes capaces de inhibir o bloquear la unión de un (poli)péptido que posee actividad de LPI, en ensayos de activación del complemento, y por tanto pueden actuar como inhibidores de la unión de LPI a su diana putativa. Los ensayos de selección apropiados pueden usar, por ejemplo, la proteína LPI purificada, marcada con un marcador fluorescente, que se une a las bacterias en presencia de un sistema de complemento intacto, y analizarse por citometría de flujo o fluorometría. Un ensayo de unión adecuado puede emplear, alternativamente, LPI-purificado-diana o diana-dominio sobre un soporte con una forma de proteína LPI como aglutinante. Alternativamente, puede emplearse un ensayo que seleccione por la capacidad de unión o para competir con el LPI para unirse a un anticuerpo específico anti-LPI (monoclonal, policlonal o un anticuerpo monocatenario) mediante diversos inmunoensayos conocidos en la técnica., que incluyen, aun cuando no se limita a ellos, técnicas ELISA competitivas y no competitivas o tecnología de Biosensor que emplea un chip sensor recubierto con ligando (LPI), anticuerpo o diana putativa de LPI (técnica de Resonancia de Plasma Superficial (SPR) semejante a la BiaCore). También puede usarse en los ensayos de selección

descritos cualquier (poli)péptido que posea actividad de LPI distinto de LPI. Todos estos métodos pueden adaptarse para una selección de alto rendimiento (High Throughput Screening) (HTS).

5 La actividad funcional de LPI, los (poli)péptidos, sus fragmentos, sus derivados y sus análogos, puede ser ensayada por diversos métodos. Todos los métodos que miden la activación del complemento en una de sus fases, pueden ser utilizados como medio de lectura debido a que el LPI interfiere con las primeras fases de este proceso. Así pues medidas de la deposición de los fragmentos C4, C2 ó C3 (por citometría de flujo o ensayo ELISA o inmunotransferencia), medidas de CH50 utilizando la lisis de eritrocitos, medida de complejos MAC o productos solubles escindidos de la cascada de complemento (ensayos ELISA o funcionales), son todos candidatos adecuados para medir la actividad de LPI. Los Ejemplos 3, 4, 5, 7 y 8 describen tales métodos.

10 Los (poli)péptidos aislados que poseen actividad de LPI pueden ser útiles para tratar, prevenir o mejorar estados inflamatorios que están comprometidos en muchos trastornos y muchas enfermedades, tales como las enumeradas en la **Tabla 2**.

15 Según un aspecto adicional de la misma, la invención se refiere, por tanto, a (poli)péptidos que poseen actividad de LPI para usar en la diagnosis, profilaxis o tratamiento terapéutico, en particular para usar en el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas y crónicas, tales como las enumeradas en la **Tabla 2**.

Tabla 2

Enfermedades causadas por reacciones inflamatorias que implican activación del complemento y/o implicación de neutrófilos y/o monocitos.

	Artritis aguda reactiva	Penfigoide bulloso
20	Rechazo agudo de los trasplantes	Daños de quemaduras
	Síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto (ARDS)	Quemaduras
	Hepatitis alcohólica	By-pass cardiopulmonar
	Rinitis alérgica	Enfermedades cardiovasculares
25	Alotrasplante	Bronquitis crónica
	Enfermedad de Alzheimer	Leucemia linfocítica crónica
	Arteriosclerosis	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)
	Reacción de Arthus	Dermatitis de contacto
	Asma	Enfermedad de Crohn
30	Aterosclerosis	Linfoma cutáneo de células T
	Dermatitis atópica	Fibrosis quística
	Meningitis bacteriana	Dermatosis
	Neumonía bacteriana	Enfermedades del sistema nervioso central
35	Tumor cerebral	central
	Carcinoma broncogénico	Endometriosis
	Encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)	Pancreatitis
	Neuritis alérgica experimental (EAN)	Peritonitis
40	Choque de Forssman	Enfisema pleural
	Congelación	Inflamación post-bypass cardiopulmonar (CBP)
	Carcinoma gástrico	Psoriasis
	Enfermedades gastrointestinales	Daño repetitivo de torceduras (RSI)
	Enfermedades genitourinarias	Enfermedades respiratorias
		Artritis reumatoide

	Glomerulonefritis	Sépsis
	Gota	Choque séptico
	Anemia hemolítica	Sinusitis
	Gastritis por <i>Helicobacter pylori</i>	Enfermedades de la piel
5	Hemodialísis	Apoplejía
	Angioedema hereditario	Lupus eritematoso sistémico
	Neumonía de hipersensibilidad	(SLE)
	Fibrosis pulmonar idiopática	Transplante
	Vasculitis inducida por complejo	Lesión cerebral (traumática)
10	inmunitario (IC)	Infección vaginal por <i>Trichomonas</i>
	Choque isquémico	Colitis ulcerosa
	Episodios de isquemia-reperusión	Infección del tracto urinario
	Daños de isquemia-reperusión	Síndrome de accidente vascular
	Enfermedades articulares	Vasculitis
15	Cirugía vascular (grande)	Hepatitis viral
	Fiebre por humo de metales	Meningitis viral
	Esclerosis múltiple	Infección viral del tracto
	Fallo orgánico sistémico múltiple	respiratorio
	Miastenia gravis	Xenotrasplante
20	Infección por <i>Mycobacterium tuberculo</i>	
	Infarto de miocardio.	

* Apoyo para la utilidad terapéutica de los (poli)péptidos de la invención para el tratamiento de estas enfermedades, puede encontrarse en las referencias bibliográficas que siguen: Para ARDS: Demling, RH. (1995). La versión moderna del síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto. *Ann. Rev. Med.* 46:193-202; y Fujishima, S. Aikawa, N. (1995) Daño tisular mediado por neutrófilos y su modulación. *Intensive Care Med.* 21:277-285; Para infecciones graves (meningitis): Tunkel, AR. y Scheld, WM. (1993). Patogénesis y patofisiología de meningitis bacteriana. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:118. Para daño después de isquemia/reperusión: Helier, T., et al. (1999). Selección de un antagonista del receptor de C5a desde colecciones de fagos, que atenúan la respuesta inflamatoria de la enfermedad de complejo inmunitario y daño de isquemia/reperusión. *J. Immunol.* 163:985-994. Para artritis reumatoide: Edwards, SW. y Hallett, MB. (1997). Vista del bosque para los árboles: el papel olvidado de los neutrófilos en la artritis reumatoide. *Immunology Today* 18: 320-324; y Pillinger, MH., Abramson, SB. (1995). El neutrófilo en la artritis reumatoide. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* (1995) 21:691-714. Para infarto de miocardio: Byrne, JG., Smith, WJ., Mutphy, MP., Couper, GS., Appleyard, RF., Cohn, LH. (1992). Prevención completa de la artrofia, contractura, reflujo bajo y edema, de miocardio, después de trasplante de corazón mediante bloqueo de moléculas de adhesión de neutrófilos durante la reperusión. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 104:1589-96. Para COPD: Cox, G. (1998). El papel de los neutrófilos en la inflamación. *Can. Respir. J.* 5 Suppl A:37A-40A; y Hiemstra, PS., van Wetering, S., Stolk, J. (1998). Proteinasas de serina de neutrófilos y defensinas en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica: efectos sobre el epitelio pulmonar- *Eur. Respir.J.* 12:1200-1208. Para apoplejía: Barone, FC., Feuerstein, GZ. (1999).- Mediadores inflamatorios y apoplejía : nuevas oportunidades para nuevas terapéuticas. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:819-834; y Jean, WC., Spellman, SR., Nussbaum, ES., Low, WC. (1998) Daño por reperusión después de isquemia cerebral focal: el papel de la inflamación y el horizonte terapéutico. *Neurosurgery* 43:1382-1395. Para meningitis: Tuomanen, EI. (1996) Mecanismos moleculares y celulares de la meningitis neumocócica. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 797:42 52. Para todas las enfermedades relacionadas directamente con el complemento: Adaptada desde: A. Sahu y J.D. Lambris, *Immunopharmacology* 49 (2000) 133-148.

La invención se refiere, además, al uso de los (poli)péptidos que poseen actividad de LPI para fabricar una preparación para el diagnóstico, profilaxis o tratamiento terapéutico, en particular para el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas y crónicas, y más en particular, para el tratamiento de las indicaciones a que se ha hecho referencia antes.

También son parte de la presente invención composiciones terapéuticas que comprenden un excipiente adecuado y uno o más de los (poli)péptidos de la invención que poseen actividad de LPI Tal composición puede ser empleada para los tratamientos especificados anteriormente.

La molécula de ácido nucleico de la invención, incorporada opcionalmente en una construcción mayor, puede ser usada para diversos fines, tales como obtener anticuerpos para ello, modular la actividad de LPI o en una preparación terapéutica. La invención se refiere, además, a la secuencia de aminoácidos codificada por las moléculas de ácidos nucleicos que puede identificarse mediante la denominada "clonación por ordenador". Mas específicamente, está técnica comprende usar:

5

(1) La secuencia de ácido nucleico de lpi (**SEQ ID NO:2**), lpi-B (**SEQ ID NO:4**) o lpi-C (**SEQ ID NO:6**) según se representa en la **figura 2**, o fragmentos, derivados y análogos de las mismas, o

10

15

20

(2) la secuencia de aminoácidos de LPI (**SEQ ID NO:3**), LPI-B (**SEQ ID NO:5**) o LPI-C (**SEQ ID NO: 7**) representadas en la **figura 3**, o sus fragmentos, derivados y análogos, como una pregunta para seleccionar secuencias de ácidos nucleicos o bases de datos de secuencias de ácidos nucleicos, o secuencias de proteínas o bases de datos de secuencias de proteínas, usando algoritmos que pueden identificar regiones con homología. Tales algoritmos son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, aun cuando no se limita a ellos, búsquedas de BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). Las bases de datos de secuencias que pueden ser exploradas incluyen, aun cuando no se limita a ellas, la base de datos Genbank™ y la base de datos Swissprot™. Cuando se utiliza una búsqueda en BLAST o sus modificaciones, pueden identificarse, en general, sujetos que muestran homología. La identificación se basa en el valor de la Calificación o en la Probabilidad Mínima de Suma P(N).. Los homólogos de la secuencia de los ácidos nucleicos de LPI o de la secuencia (poli)peptídica están definidos por una Calificación que es, por lo menos, 200, preferiblemente por lo menos 400, más preferiblemente al menos 800, y lo más preferible, al menos 1600. Alternativamente, el valor de P(N) puede utilizarse para identificar secuencias homólogas. Los homólogos de la secuencia de los ácidos nucleicos de LPI o de la secuencia (poli)peptídica, están definidos por un valor de P(N) que es menor que 1e-3, preferiblemente menor que 1e-6, más preferiblemente menor que 1e-12, aún más preferiblemente menor que 1e-24 y, lo más preferible, menor que 1e-48..

25

30

Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican los (poli)péptidos de la invención pueden usarse, además, para terapia génica. La molécula de ácido nucleico puede ser introducida en el sitio de inflamación para actuar localmente o en un sitio distante. La terapia génica se realiza a través de vectores virales, tales como, aun cuando no se limita a ellos, vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados o vectores lentivirales. Alternativamente, pueden usarse vectores no virales tales como los basados en liposomas o polímeros. Las estrategias terapéuticas génicas están basadas en (1) terapia génica *in vivo*, en la que las moléculas de ácidos nucleicos aisladas son introducidas en células diana *in vivo*, o (2) terapia génica *ex vivo*, en que las moléculas de ácidos nucleicos aisladas son introducidas en células diana *ex vivo*, seguido de administración de las células transducidas, o una subpoblación de las células transducidas, en un individuo. La invención se refiere también a los vectores para usar en terapia génica y a células transducidas.

35

Los (poli)péptidos de la invención pueden ser utilizados en un método para tratar un sujeto aquejado de inflamación, por administración de una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico de un (poli)péptido de la invención y en un método para tratar mediante terapia génica un sujeto aquejado de inflamación, por administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico, así como un método para tratar un sujeto aquejado de una infección por estafilococos, por administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo y/o su fragmento biológicamente activo.

40

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los (poli)péptidos de la invención pueden usarse en un método para aislar desde un organismo un gen que codifica una proteína que posee actividad de LPI, cuyo método comprende explorar una genoteca o una colección de cDNA de aquel organismo, con una sonda basada en la molécula de ácido nucleico, y aislar los clones positivos.

45

También se describen microorganismos que hospedan una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican los (poli)péptidos de la invención, para usar como medicamento para el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas y crónicas, tales como se enumeran en la **Tabla 2**

50

Todas las moléculas aquí descritas y/o reivindicadas, es decir, moléculas de ácidos nucleicos, (poli)péptidos, no (poli)péptidos, fragmentos, derivados y análogos, pueden encontrar otras diversas aplicaciones. Tales aplicaciones incluyen, aun cuando no se limita a ellas:

- Aislamiento de factores que pueden unirse a las moléculas citadas. Son ejemplos de tales factores receptores y proteínas. Tal aislamiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando el sistema híbrido de doble levadura o usando moléculas de la invención marcadas como anzuelo.

- Realización de colecciones que exponen fagos, que, a su vez, pueden usarse para determinar dominios activos, equivalentes funcionales, etc.

- Identificación de vías de transducción de señales que son activadas o inactivadas por LPI y las moléculas de la invención.

55

- Ensayo para determinar la actividad biológica de LPI (regulación ascendente de la expresión del receptor).

Según esta invención pueden diseñarse peptoides y peptidomiméticos, sobre la base de los (poli)péptidos de LPI reivindicados.

5 Varias definiciones de peptidomiméticos han sido formuladas en la bibliografía. Entre otras, los peptidomiméticos han sido descritos como “estructuras químicas diseñadas para convertir la información contenida en péptidos, en pequeñas estructuras no peptídicas”, “moléculas que imitan la actividad biológica de péptidos pero que no contienen uniones peptídicas”, “estructuras que sirven como sustitutos apropiados de péptidos en interacciones con receptores y enzimas” y como “caballos de Troya químicos”.

10 En general, los peptidomiméticos pueden clasificarse en dos categorías. La primera consiste en compuestos con estructuras no semejantes a las de péptidos, frecuentemente “andamios” sobre los que han de fijarse grupos farmacofóricos. Por tanto, son compuestos de peso molecular bajo y que no tienen semejanza estructural con los péptidos nativos, dando por resultado una estabilidad aumentada hacia las enzimas proteolíticas.

15 La segunda clase principal de peptidomiméticos consiste en compuestos de una construcción modular comparable a la de los (poli)péptidos. Estos compuestos pueden ser obtenidos por modificación de o bien las cadenas laterales de los (poli)péptidos o bien la estructura fundamental (poli)peptídica. Los peptidomiméticos de esta última categoría pueden ser considerados derivados de (poli)péptidos por reemplazo de la unión amídica por otros restos. Como resultado, es de esperar que los compuestos sean menos sensibles a la degradación por proteasas. La modificación de la unión amídica influye también en otras características tales como lipofiliidad, capacidad de unión de hidrógeno y flexibilidad conformacional, que, en casos favorables, puede dar por resultado un perfil farmacológico y/o farmacéutico global, mejorado, del compuesto.

20 En principio pueden prepararse peptidomiméticos oligómeros partiendo de bloques de construcción monoméricos en ciclos repetitivos de fases de reacción. Por consiguiente, estos compuestos pueden ser adecuados para síntesis automatizadas análogas a las de la preparación bien establecida de péptidos en sintetizadores de péptidos. Otra aplicación de los bloques de construcción monoméricos reside en la preparación de híbridos de péptidos/peptidomiméticos, combinando aminoácidos naturales y bloques de construcción de peptidomiméticos, para dar lugar a productos en los que solamente han sido reemplazadas algunas de las uniones amídicas. Esto puede dar como resultado compuestos que se diferencian suficientemente del péptido nativo que obtienen una bioestabilidad aumentada, pero que todavía posee suficiente semejanza con la estructura original para retener la actividad biológica.

25 Bloques de construcción de peptidomiméticos adecuados para usar en la invención, son sustitutos de uniones amídicas, tales como los oligo- β -péptidos (Juaristi, E. Síntesis enantioselectiva de β -aminoácidos; Wiley-VCH: Nueva York, 1996), péptidos vinílogos (Hagihari, M. et al., J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 10672-10674), peptoides (Simon, R.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 9367-9371; Zuckermann, R.N. et al., J. Med. Chem. 1994, 37, 2678-2685; Kruijtzter, J.A.W. y Liskamp, R.M.J. Tetrahedron Lett. 1995, 36, 6969-6972); Kruijtzter, J.A.W. Tesis; Universidad de Utrecht, 1996; Kruijtzter, J.A.W. et al., Chem. Eur. J. 1998, 4, 1570-1580), oligosulfonas (Sommerfeld, T. and Seebach, D. Angew. Chem., Int. Edición Inglesa, 1995, 34, 553-554), fosfodiésteres (Lin, P.S.; Ganesan, A. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 511-514), oligosulfonamidas (Moree, W.J. et al., Tetrahedron Lett. 1991, 32, 409-412; Moree, W.J. et al., Tetrahedron Lett. 1992, 33, 6389-6392; Moree, W.J. et al., Tetrahedron 1993, 49, 1133-1150; Moree, W.J. Tesis; Universidad de Leiden, 1994; Moree, W.J. et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 5157-5169; de Bont, D.B.A. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 3035-3040; de Bont, D.B.A. et al., Biorg. Med. Chem. 1996, 4, 667-672; Löwik, D.W.P.M. Tesis; Universidad de Utrecht, 1998), sulfonamidas peptoides (van Ameijde, J. y Liskamp, R.M.J. Tetrahedron Lett. 2000, 41, 1103-1106), sulfonamidas vinílogas (Gennari, C. et al., Eur. J. Org. Chem. 1998, 2437-2449), azatidas (o hidrazinopéptidos) (Han, H. y Janda, K.D. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 2539-2544), oligocarbamatos (Paikoff, S.J. et al., Tetrahedron Lett. 1996, 37, 5653-5656; Cho, C-Y. et al., Science, 1993, 261, 1303-1305), ureopeptoides (Kruijtzter, J.A.W. et al., Tetrahedron Lett. 1997, 38, 5335-5338; Wilson, M.E. y Nowick, J.S. Tetrahedron Lett., 1998, 39, 6613-6616) y oligopirrolinonas (Smith III, A.B. et al., J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 10672-10674). La Figura 22 muestra las estructuras de estos bloques de construcción de peptidomiméticos.

45 Los péptidos vinílogos y las oligopirrolinonas han sido desarrollados con objeto de poder formar estructuras secundarias (conformaciones de cadena β) similares a las de los péptidos, o estructuras secundarias imitativas de péptidos. Es de esperar que todos estos peptidomiméticos oligoméricos sean resistentes a las proteasas y puedan ser juntados en reacciones de acoplamiento de alto rendimiento a partir de monómeros ópticamente activos (excepto los peptoides).

50 Las peptidosulfonamidas están compuestas de etano sulfonamidas sustituidas en las posiciones α o β , que contienen uno o más isoésteres de estados de transición de sulfonamidas, como un análogo de la hidrólisis de la unión amídica. Análogos de péptidos que contienen un análogo de estado de transición de la hidrólisis de la unión amídica han encontrado un amplio uso en el desarrollo de inhibidores de proteasas, por ejemplo, inhibidores de proteasas de HIV.

55 Otro enfoque para desarrollar peptidomiméticos oligoméricos consiste en modificar completamente la cadena fundamental del péptido por reemplazo de todas las uniones amídicas por sustitutos no hidrolizables, por ejemplo, grupos carbamato, sulfona, urea y sulfonamido. Tales peptidomiméticos oligoméricos pueden tener una estabilidad metabólica incrementada. Recientemente, han sido diseñados peptidomiméticos oligoméricos alternativos, basados en amidas, a saber, Glicina-oligopéptidos sustituidos en el N, los denominados peptoides. Los peptoides están caracterizados por la presencia de la cadena lateral de aminoácidos sobre el nitrógeno amídico, en oposición a estar presente sobre el átomo de C en posición α de un péptido, lo que lleva a una estabilidad metabólica aumentada, así como a la retirada de la quiralidad de la estructura fundamental. La ausencia del átomo de carbono en posición α , quiral, puede considerarse como una ventaja debido a que las restricciones espaciales que están presentes en los péptidos no existen cuando se trata de peptoides. Además, el espacio existente entre la cadena lateral y el grupo carbonilo de un

peptoide es idéntico al de un péptido. A pesar de las diferencias entre péptidos y peptoides, se ha puesto de manifiesto que ellos dan lugar s compuestos biológicamente activos.

5 La traducción de una cadena de un (poli)péptido en un peptidomimético peptoide puede dar por resultado o bien un peptoide (traducción directa) o un retropeptoide (retro-secuencia). En esta última categoría se mantiene la orientación relativa de los grupos carbonilo respecto a las cadenas laterales, lo que conduce a una mejor semejanza con el péptido parental.

Son artículos de revisión acerca de peptidomimético las publicaciones de :

10 Adang, A.E.P. et al., Recl. Trav. Chim., Países Bajos, 1994, 113, 67-78; Giannis, A. y Kolter, T., Angew. Chem. Int. Edición Inglesa, 1993, 32, 1244-1267; Moos, W.H. et al., Annu. Rep. Med. Chem., 1993, 28, 315-324; Gallop, M.A. et al., J. Med. Chem., 1994, 37, 1233-1251; Olson, G.L. et al., J. Med. Chem., 1933, 36, 3039-30304; Liskamp, R.M.J., J. Recl. Trav. Chim. Países Bajos, 1994, 113, 1-19; Liskamp, R.M.J., Angew. Chem. Int. Edición Inglesa, 1994, 33, 305-307; Gante, J., Angew. Chem. Int. Edición Inglesa, 1994, 33, 1699-1720; Gordon, E.M. et al., Med. Chem., 1994, 37, 1385-1401; y Liskamp, R.M.J., Angew. Chem. Int. Edición Inglesa, 1994, 33, 633-636.

15 La invención, por tanto, se refiere, además, a moléculas que no son por sí mismas (poli)péptidos de LPI sino que poseen una estructura y función similares a las de los (poli)péptidos de LPI descritos en esta memoria. Son ejemplos de tales moléculas los peptidomiméticos antes descritos, y también compuestos en los que uno o más de los aminoácidos están reemplazados por aminoácidos o D-aminoácidos no proteínógenos. Cuando se hace referencia en esta solicitud de patente a (poli)péptidos, se entiende que incluye también tales otros compuestos que poseen una estructura y una función similar, o la misma, y como consecuencia actividad biológica de LPI similar o la misma que los (poli)péptidos.

20 Más en particular, pueden llevarse a cabo sustituciones con aminoácidos no proteínógenos seleccionados entre el grupo que consiste en 2-naftilalanina (Nal(2)), β-ciclohexilalanina (Cha), p-amino-fenilalanina ((Phe(p-NH₂)), p-benzoil-fenilalanina (Bpa), ornitina (Orn), norleucina (Nle), 4-fluoro-fenilalanina (Phe(p-F)), 4-cloro-fenilalanina (Phe(p-Cl)), 4-bromo-fenilalanina (Phe(p-Br)), 4-iodo-fenilalanina (Phe(p-I)), 4-metil-fenilalanina (Phe(p-Me)), 4-metoxi-fenilalanina (Tyr(Me)), 4-nitro-fenilalanina (Phe(p-NO₂)).

25 Los D-aminoácidos adecuados para sustituir a los aminoácidos de los (poli)péptidos de la invención, son, por ejemplo, aquellos que están seleccionado entre el grupo que consiste en D-fenilalanina, D-alanina, D-arginina, D-asparagina, D-ácido aspártico, D-cisteína, D-ácido glutámico, D-glutamina, D-histidina, D-isoleucina, D-leucina, D-Lisina, D-metionina, D-prolina, D-serina, D-treonina, D-triptófano, D-tirosina, D-valina, D-2-naftilalanina (D.Nal(2)), β-ciclohexil-D-alanina (D-Cha), 4-amino-D-fenilalanina (D-Phe(p-NH₂)), p-benzoil-D-fenilalanina (D-Bpa), D-ornitina (D-Orn), D-norleucina (D-Nle), 4-fluoro-D-fenilalanina (D-Phe(p-F)), 4-cloro-D-fenilalanina (D-Phe(p-Cl)), 4-bromo-D-fenilalanina (D-Phe(p-Br)), 4-iodo-D-fenilalanina (D-Phe(p-I)), 4-metil-D-fenilalanina (D-Phe(p-Me)), 4-metoxi-D-fenilalanina (D-Tyr(Me)), 4-nitro-D-fenilalanina (D-Phe(p-NO₂))-

30 Uno o más de los aminoácidos de los (poli)péptidos pueden ser reemplazados por bloques de construcción de peptoides, por ejemplo, seleccionados entre el grupo que consiste en glicinas sustituidas en el N, tales como N-bencilglicina (NPh), N-metilglicina (NAla), N-(3-guanidinopropil)glicina (NArg), N-(carboximetil)glicina (NAsp), N-(carbamilmetil)glicina (NAsn), N-(tioetil)glicina(NhCys), N-(2-carboxietil)glicina (NGLu), N-(2-carbamiletil)glicina (NGLn), N-(imidazoliletal)glicina (NhHis), N-(1-metilpropil)glicina (Nile), N-(2-metilpropil)glicina (NLeu), N-(4-aminobutil)glicina (NLys), N-(2-metiltioetil)glicina (NMet), N-(hidroxietil)glicina (NhSer), N-(2-hidroxipropil)glicina (NhThr), N-(3-indolilmetil)glicina (NTrp), N-(p-hidroxifenmetil)-glicina (NTyr), N-(1-metiletal)gli-

35 cina (NVal)..

Todos los compuestos de la invención pueden tener también forma cíclica. Un compuesto cíclico puede tener potencia, estabilidad, rigidez, y/u otras características farmacéuticas y farmacológicas, mejoradas.

45 Todas las moléculas de la invención pueden ser marcadas de cualquier modo. Ejemplos de marcadores incluyen aun cuando no se limita a ellos, fluorescencia, biotina, marcadores reactivos, etc. Tales moléculas marcadas pueden utilizarse para seleccionar compuestos que se parezcan o que coincidan en parte con la actividad biológica de LPI, así como para identificar sitios de unión, tanto *in vivo* como *in vitro*, o para rastrear la proteína LPI o el ácido nucleico de un organismo.

50 La presente invención será ilustrada adicionalmente en los ejemplos que siguen y que en modo alguno están destinados a limitar esta invención. En esta descripción y en los ejemplos se hace referencia a las figuras y las tablas que siguen:

55 **Figura 1:** Ilustra la organización de los genes de la parte del bacteriófago que se ha denominado la Isla de la patogenicidad, SaPI-5. Se muestra la SaPI-5 en la región 5' del bacteriófago de MRSA-16 que está incorporada en el gen estructural de β-toxina. Están indicadas la posición y orientación de los cuatro genes de interés: lpi, chp, sak y sea. Orf1 y orf2 representan genes estructurales del bacteriófago.

Figura 2a: Muestra la secuencia del gen de LPI procedente de MRSA-16 de *S. aureus*. La secuencia de Shine Dalgarno (AGGAGA) y el marco de lectura abierto (ORF) de LPI están subrayados. Los nucleótidos que codifican la

proteína madura están indicados por una línea doble. El nucleótido divergente de *S. aureus* NCTC 8325 y N315 está indicado por encima de la secuencia.

5 **Figura 2b:** Muestra la secuencia de los genes de LPI-B, LPI-C y LPI-D. Los marcos de lectura abiertos de LPI-B y LPI-C están subrayados. Los nucleótidos divergentes de secuencias de LPI-D diferentes están indicados encima de la secuencia.

Figura 3: Muestra la secuencia de aminoácidos deducida para los genes de LPI, LPI-B, LPI-C y LPI-D. La región que se equipara con las proteínas maduras LPI, LPI-B, LPI-C y LPI-D está subrayada. Los aminoácidos divergentes en LPI y LPI-D están indicados por encima de la secuencia.

10 **Figura 4:** Es una imagen representativa de un ensayo de SDS-PAGE que muestra la molécula LPI recombinante (rLPI) final, purificada, obtenida a partir de un lisado de *E. coli* después de cromatografía de afinidad sobre una columna de níquel, y escisión de la marca de Histidina por una enteroquinasa.

15 **Figura 5:** Muestra los efectos de tratamiento de rLPI sobre la absorción de *S. aureus* por neutrófilos humanos. Bacterias marcadas fueron incubadas con sueros humanos o inmunoglobulinas aisladas y neutrófilos, en presencia o ausencia de rLPI, durante 15 minutos. La fagocitosis se midió por citometría de flujo y la **figura 5** muestra el efecto inhibitorio de 3 µg/ml de rLPI sobre la absorción de *S. aureus* en sueros humanos.

Figura 6: Ilustra el efecto inhibitorio dependiente de la dosis de rLPI sobre la absorción bacteriana. La fagocitosis se realizó en sueros humanos al 10%.

20 **Figura 7:** Ilustra la falta de efecto de 8 µg/ml de rLPI sobre la fagocitosis de *S. aureus* por neutrófilos, medida por receptores Fcγ, ensayado incubando bacterias y neutrófilos con inmunoglobulinas humanas purificadas solamente, por tanto en ausencia de complemento.

Figura 8: Muestra que existen otras moléculas distintas de LPI que poseen actividad de LPI. La proteína LPI marcada con His posee la misma actividad que la rLPI normal.

25 **Figura 9:** Representa el efecto inhibitorio de rLPI sobre la deposición de moléculas C3b sobre la superficie de *S. aureus*. La deposición de C3b se llevó a cabo mediante inoculación de *S. aureus* en suero humano al 10%, en presencia de rLPI a la vez. Las bacterias fueron lavadas y se detectó la cantidad de C3b sobre la superficie mediante anticuerpos específicos marcados con fluoresceína. La deposición de C3B se midió por citometría de flujo.

Figura 10: Muestra la ausencia de efecto inhibitorio de rLPI sobre de la vía clásica, medida en un ensayo de hemólisis.

30 **Figura 11:** Muestra el efecto inhibitorio de rLPI sobre la activación de la vía de las lectinas. Se emplearon un método basado en un ensayo ELISA sobre placas recubiertas con manano, con suero agotado en Clq y deposición de C3b como sistema de lectura.

35 **Figura 12;** Muestra el efecto de rLPI sobre la activación de la vía alternativa- En la **figura 12A** la activación de la vía alternativa se verificó mediante análisis de citometría de flujo de la deposición de C3b sobre zimosán usando solamente C3 purificada, Factor D, Factor B y properdina (factor P). La **figura 12B** muestra la actividad de LPI. LPI-B y LPI-C en un ensayo de la vía alternativa, medida en un ensayo hemolítico utilizando eritrocitos de conejo.

Figura 13: Representa la unión de LPI a partículas de zimosán. Se marcó rLPI con fluoresceína y se incubó con zimosán en presencia de suero humano, a varias temperaturas. Después de midió la fluorescencia por partícula usando citometría de flujo.

40 **Figura 14:** Representa la unión de LPI a partículas de zimosán. Se marcó rLPI con fluoresceína y se incubó con zimosán con y sin suero o con suero agotado en lectina (LDS), en varios tiempos. Después se midió la fluorescencia por partícula usando citometría de flujo.

Figura 15: Representa la unión de MBL a partículas de zimosán en presencia y ausencia de LPI, Se detectó la MBL por citometría de flujo después de tinción con un anticuerpo específico anti-MBL.

45 **Figura 16:** Muestra la asociación entre rLPI y MASP-2 humana recombinante, analizada mediante cromatografía de exclusión de tamaños usando rLPI yodada.

Figura 17: Muestra la inhibición de rMASP-2 en un ensayo específico de escisión proteolítica, usando un sustrato fluorescente por rLPI.

Figura 18: Muestra la deposición de C4b mediada por la vía de las lectinas, sobre placas recubiertas con manano, en diferentes cantidades de suero y la falta de inhibición por cantidades crecientes de rLPI.

50 **Figura 19:** Muestra la deposición de C4b como resultado de la escisión por MBL-MASPs de C4 purificada, capturada sobre placas recubiertas con manano, y la falta de inhibición por LPI en comparación con la de un anticuerpo anti-MBL (inhibición total).

Figura 20: Muestra el efecto inhibitorio de rLPI sobre la escisión de C2 dando C2a y C2b, analizado por transferencia Western en suero, en diversos períodos de tiempo. La **figura 20a** muestra la transferencia después de tinción con anti-C2. La **figura 20b** muestra el análisis densitométrico de esta misma transferencia para la banda específica de C2b

5 **Figura 21:** Muestra la actividad de moléculas afines a LPI, las LPI-B y LPI-C, en un ensayo de fagocitosis similar al de la **figura 5**.

Figura 22: Muestra los bloques de construcción de peptidomiméticos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

10 Identificación de LPI como una proteína de inmunomodulación de *S. aureus*

1.1 Introducción de la Isla-5 de patogenicidad de Staphylococcus aureus (SaPI-5)

15 Recientemente el laboratorio de los inventores ha descrito CHIPS, una proteína de *Staphylococcus aureus* inhibidora de la quimiotaxis. De los resultados obtenidos de diferentes proyectos de secuenciación del genoma de *S. aureus*, quedó claro que MRSA 16, NCTC 8325 y N315, llevan el gen para CHIPS (chp). En cada cepa, el gen chp está situado sobre un bacteriófago diferentes insertado en el gen estructural de β -hemolisina (hly). El bacteriófago portador de chp de MRSA-16 (phi-MRSA-16), bacteriófagos de NCTC 8325 (phi-NCTC 8325) y los bacteriófagos de N315 (phi-N315) son, aproximadamente, de 45 kb y poseen regiones 5' casi idénticas. Los 37 kb restantes de phi-MRSA-16, phi-NCTC 8325 y phi-N315 son escasamente homólogos.

20 Además de chp la región homóloga 5' de los tres bacteriófagos puede contener los genes de los factores de virulencia: estafiloquinasa (sak), enterotoxina A (sea) (en N315 sea está reemplazado por enterotoxina P (sep)). El gen sak está situado justamente aguas abajo de los genes chp, sea o sep (en N315) está situado justamente aguas arriba de sak (**figura 1**). Además, MSSA y Mu50 llevan los bacteriófagos phi-MSSA y phi-Mu50 que contienen un extremo 5' casi idéntico al de phi-MRSA 16, phi-NCTC 8325 y phi-N315. En el extremo 5' de phi-MSSA y phi-Mu50, sak y sea fueron encontrados en la misma conformación que los otros tres bacteriófagos, con excepción de una casete de chp de 0,78 kb que está ausente. Los restantes 32,1 kb de este fago comparten poca semejanza con phi-MRSA-16, phi-NCTC 8325, phi-N315, o unos con otros.

25 En la cepa NU3-1 se encontró un fragmento de 4,2 kd que llevaba ambos genes chp y sak, idéntico a la región 5' de phi-MRSA-16, phi-NCTC 8325, phi-N315, phi-MSSA, y phi-Mu50 y aún en este caso no se encontró señal de un bacteriófago (T. Horii et al., FEMS Microbial Letters 185:221-224 (2000)). Por tanto, la región de NU3-1 codificante de chp y sak es una inserción directa en el genoma de *S. aureus*. Basándose en estos resultados se opina que chp, sak y sea están situados sobre la *isla-5 de patogenicidad de Staphylococcus aureus* (SaPI-5)- La SaPI-5 puede contener hasta 3 factores de virulencia conocidos situados en un orden estricto (**Figura 1**).

1.2 SaPI-5, un grupo de proteínas inmunomoduladoras estafilocócicas.

35 CHIPS interacciona específicamente con el receptor de C5a (C5aR) así como el receptor peptídico formilado (FPR) de los neutrófilos humanos, dando por resultado la regulación en descenso, específica y total, de la respuesta a ambos receptores.

40 Se describe la estafiloquinasa (SAK) como un factor trombolítico, por transformar el plasminógeno en plasmina de proteasa (M. Parry et al., TIBS 25:53-59 (2000)). Los inventores han descubierto recientemente que SAK y plasmina se localizan sobre la superficie estafilocócica y allí son capaces de escindir IgG humana en la región de la rótula, destruyendo con ello sus características opsónicas. Además de esto, la plasmina situada en la superficie escindió también C3b, separando de nuevo moléculas opsónicas desde la superficie de los estafilococos. Por tanto, también SAK posee una fuerte inmunidad anti-innata y por consiguiente propiedades antiinflamatorias.

45 Es bien sabido que las enterotoxinas son superantigénicas (M. Dinges et al., Clin. Microbiol. Rev., 13:16-34 (2000)) pero se ha descrito recientemente también que la Enterotoxina A regula en descenso los receptores CCR1, CCR2 y CCR5 situados sobre monocitos de sangre periférica, dando como resultado una respuesta disminuida de quimioquina de estas células (R. Rahimpour et al., J. of Imm. 162:2299-2307 (1999)).

Como se ha citado antes chp, sak y sea o sep están todos situados sobre SaPI-5, lo que significa que se está tratando con un grupo de genes que desempeñan un papel importante en la modulación del sistema inmunitario innato.

1.3 LPI es parte de SaPI-5

50 Además de estos tres inmunomoduladores conocidos se encontró un marco de lectura abierto sobre SaPI-5 que codifica una proteína putativa de 116 aminoácidos. Los análisis revelaron que se está tratando con una proteína excretada dado que contiene un péptido señal clásico de *Staphylococcus aureus*. Debido a su posición sobre SaPI-5 próxima a tres inmunomoduladores estafilocócicos, los inventores especularon sobre una función similar de esta proteína.

55

RESULTADOS

SaPI-5

5 La **figura 1** muestra la organización de SaPI-5 en la región 5' de phi-MRSA-16, que está incorporada en el gen estructural de β -toxina. La posición y orientación de LPI, chp, sak y sea están indicadas. Orf1 y orf2 representan genes estructurales del bacteriófago.

LPI (*Inhibidor de la vía de las lectinas*)

10 El gen fue denominado lpi. Este gen codifica un marco de lectura abierto de 348 bp precedido por una secuencia razonable de Shine Dalgarno para iniciar la traducción (J. Shine y L. Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1342-1346 (1974)) y seguido de un codón de detención (**Figura 2A**). En la **figura 2A**, la secuencia de Shine Dalgarno (AGGAGA) y el marco de lectura abierto (ORF) de LPI, están subrayados. Los nucleótidos que codifican la proteína madura están indicados con una línea doble. El nucleótido divergente de *S. aureus* NCTC 8325 y N315 está indicado por encima de la secuencia. Las secuencias de los genes homólogos lpi-B y lpi-C, que también son parte de esta invención, se indican en la **figura 2b** junto con la secuencia de lpi-D. Los marcos de lectura abiertos de LPI-B, LPI-C y LPI-D están subrayados. Aparte de estos tres genes no se ha encontrado, hasta la fecha en las bases de datos, otra homología importante con otros genes u otras proteínas. Los 31 aminoácidos de extremo N-terminal parecen formar un péptido señal para secreción a través de la membrana citoplásmica (3 restos cargados positivamente seguidos de una región sin carga de 20 aminoácidos y un motivo de consenso ALA-X-ALA para escisión por la peptidasa señal 1 (**figura 3**) (G, von Heijne, Nucl. Acids Res., 14:4683-4690 (1986)).

20 La **figura 3** muestra la secuencia de aminoácidos deducida para los genes de LPI, LPI-B, LPI-C y LPI-D. La región que se equipara con la proteína madura LPI, LPI-B, LPI-C o LPI-D, está subrayada. La proteína LPI madura deducida tiene un tamaño de 85 aminoácidos y 9,8 kDa, y un punto isoeléctrico de 9,06. Se encontró LPI en cinco cepas de *S. aureus* diferentes. En Mu50 la proteína fue denominada BAB58104 y en N35 BAB43028. Las secuencias fueron comparadas y se encontró que eran idénticas, con una excepción. En LPI de NCTC 8325 y N315 la adenina en la posición 315 esta reemplazada por una timidina, lo que lleva a cambio de la secuencia de aminoácidos de la glutamina en la posición 80 en leucina (**figura 2a y 3**). En la **figura 3** se indican también las secuencias de LPI-B, LPI-C y LPI-D. Las proteínas maduras poseen las características que siguen:

LPI-B: 85 aminoácidos y 9,9 kDa, y un punto isoeléctrico de 9,18.

LPI-C: 85 aminoácidos y 9,9 kDa, y un punto isoeléctrico de 8,88.

LPI-D: 86 aminoácidos y 9,9 kDa, y un punto isoeléctrico de 9,06.

30 EJEMPLO 2

Clonación y expresión de los genes que codifican LPI, LPI-B y LPI-5 (lpi, lpi-B y lpi-C) de *Staphylococcus aureus*

Material y Método

3.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

35 Se usó *Staphylococcus aureus* Newman como fuente de LPI, se usó *Escherichia coli* DH5 α como hospedador de clonación (F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, N.Y. (1990)). Todas las cepas fueron cultivadas en caldo BM (triptona, 1%, extracto de levadura, 0,5%, NaCl, 0,5%, K₂HPO₄, 0,1%, glucosa, 0,1%), a 37°C, a menos que se especifique de otro modo.

3.2 Producción de polipéptidos recombinantes que poseen actividad de LPI, en *E. coli*.

40 El método de producción que se usó para producir LPI en *E. coli* puede utilizarse también para otros (poli)péptidos que poseen actividad de LPI. Este método de producción se ilustra seguidamente en esta memoria.

45 La secuencia de DNA para LPI, LPI-B o LPI-C procedente de *S. aureus* es clonada en un vector adecuado que permite la expresión eficaz de LPI en células huésped competentes de *E. coli* usando técnicas convencionales de biología molecular. La estrategia empleada permite la expresión de la proteína LPI o semejantes a LPI, completas, ligada a una marca HIS que puede separarse, situada en el extremo N-terminal, en el citoplasma de *E. coli*. Se usó el Sistema de Expresión T7 (vector pRSET B; Invitrogen) que permite la expresión en *E. coli* de proteínas no tóxicas. Este sistema emplea el promotor fuerte del fago T7 para la obtención de una expresión de alto nivel, regulada, en una cepa de *E. coli* con un vector de multiclonación. El vector contiene una marca de polihistidina (6xHis) en el extremo N-terminal para una purificación rápida, un epitopo Xpress para obtener una detección fácil con un anticuerpo anti-Xpress y un sitio de escisión de enteroquinasa para la separación de la marca de fusión. El sitio de reconocimiento de enteroquinasa del vector pRSET-B fue cambiado desde GAC GAT GAC GAT AAG a GAC GAT GAC GAC AAG, por lo que la digestión del extremo romo por PshA1 (Westburg BV, Leusden, Países Bajos) fue posible. Una guanina extra en el extremo 5' de los cebadores de LPI se usó para complementar el sitio de escisión de la enteroquinasa.

50 Se usó como molde DNA cromosómico de la cepa *S. aureus* Newman para la reacción PCR usando la DNA-polimerasa pfuTurbo (Stratagene) lo que da por resultado un producto de PCR de extremos romos. Los cebadores

usados son LPI-5' (gagcacaagcttgccaacatcg) (una guanina extra seguida exactamente del primer aminoácido de LPI) y LPI-3' (ccggaattcttaataatttacttttagtgc) (que contiene el codón de detención autólogo y un sitio EcoRI).

5 El mismo procedimiento operatorio fue llevado a cabo para el gen de LPI-B procedente del DNA cromosómico de *S. aureus* Newman. Este fragmento tiene 255 bp, los cebadores usados son lpi-B-5' (gagtagctgacaaatatt) y lpi-B-3' (ccggaattctatctattataattcat).

El mismo procedimiento operatorio fue llevado a cabo para el gen de LPI-C procedente de DNA cromosómico de un aislado clínico de *S. aureus*, positivo para lpi-C. Este fragmento tiene 255 bp, los cebadores usados son lpi-C-5' (GAGTAGTAAGAAAGACTATAT) y lpi-C-3' (GGAATTCCTTATCTATTTA-TAATTTCA)..

10 El producto de la PCR se somete a digestión con EcoRI y el vector pRSET B con PshA1 para crear un extremo romo. Después de esto el vector es digerido con EcoRI y ligado con el producto de la PCR sometido a digestión.

Para transformar el vector se emplearon células competentes de *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS (Novagen). Los clones fueron seleccionados sobre placas que contenían carbenicilina, cloranfenicol, kanamicina y tetraciclina (Sigma) y la ligación apropiada de *lpi* se verificó por secuenciación del plásmido aislado

15 Después de expresión del gen de LPI, LPI-B o LPI-C, las bacterias de *E. coli* son lisadas y la mezcla de proteínas se aplicó a una columna de resina His-Trap (Amersham Biosciences). Para ello se inició un cultivo en medio LB con IPTG 1 mM durante 2 horas a 37°C. Las bacterias fueron centrifugadas y el glóbulo se resuspendió en solución tampón de lisis de guanidina (hidrocloruro de guanidina 6M, fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM, pH 7,8), se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con balanceo, y después se sometió a sonicación tres veces, con
20 alta intensidad, durante 5 segundos, sobre hielo. Después de separar por centrifugación los desechos insolubles, los lisados fueron aplicados a una columna de resina His-Trap previamente equilibrada,

La columna se cargó con solución 0,1 M de sulfato de níquel y se equilibró con solución tampón de unión desnaturalizante (ureum 8 M, fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM; pH 7,8). Después de aplicar el lisado, la columna se lavó con solución tampón de unión de ureum con pH decreciente (pH 7,8, pH 6,0 y pH 5,3). Las proteínas
25 unidas a la columna fueron llevadas a una solución tampón de fosfato nativa cambiando la solución tampón de unión de ureum (pH 5,3) por solución de tampón nativo (dihidrógeno fosfato sódico dihidratado 200 mM, cloruro sódico 5 M, fosfato sódico dibásico 50 mM; pH 5,3). Finalmente, los proteínas fueron eluidas con EDTA 0,05M.

La marca de HIS se separó por escisión con enteroquinasa seguido de separación de la proteasa con una preparación EK-Away de enteroquinasa. Para ello, el eluato se dializó durante la noche en solución tampón de digestión
30 fría (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM y Tween-20 al 0,1%; pH 8,0), se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se sometió a digestión el producto HIS-LPI con 0,175 µl de Enteroquinasa/ml. Esta cantidad de enteroquinasa depende de los lotes y da por resultado una digestión parcial, evitando la generación de productos de rotura. El producto digerido se dializó frente a tampón de fosfato, pH 7,8 y se hizo pasar sobre una columna de Níquel de nueva aportación para eliminar las marcas de His y la proteína LPI marcada con His (HIS-LPI) sin escindir; el producto de la operación es LPI
35 recombinante pura (rLPI). La HIS-LPI sin digerir puede ser eluida de nuevo desde la columna de Níquel para efectuar un segundo proceso de digestión. Finalmente, la columna de níquel se lava con EDTA 50 mM, NaOH 0,5 M, agua, solución de NiCl₂, 5 mg/ml, y agua y se mantuvo en etanol de 20%.

Todas las etapas del aislamiento y digestión de HIS-LPI fueron comprobadas mediante SDS-PAGE en un gel Tris-Tricine Ready (BioRad) al 16,5%. Las muestras se mezclaron 1:1 con solución tampón de muestras (Tris-HCl 200
40 mM, pH 6,8, SDS, 2%, glicerina, 40%, Coomassie, 0,4%, se sometió a ebullición durante 5 minutos y se cargó sobre el gel.

La marca de His de la proteína expresada contiene un epítipo X-press que permite la detección del producto de HIS-LPI por transferencia Western, usando el anticuerpo anti-X-press (Invitrogen). Las proteínas se hacen pasar a una membrana de nitrocelulosa, bloqueadas con gelatina al 4% en el seno de PBS y sondadas con el anticuerpo y el
45 conjugado secundario apropiado marcado con peroxidasa (Harlow y Lane, 1988, Antibodies: a laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory). Se siguió exactamente el mismo procedimiento operatorio para LPI-B y LPI-C marcadas con His.

RESULTADOS

50 La **figura 4** es una imagen representativa de un proceso de SDS-PAGE que muestra la proteína LPI recombinante (rLPI) purificada. La primera calle (1) muestra el producto recombinante completo que está codificado por vector que genera la proteína LPI con una marca adicional de Histidina y el sitio de escisión con enteroquinasa. Esto codifica una proteína con un peso molecular aparente de 13 kDa, mientras que la LPI tratada con enteroquinasa, purificada, (calle 2) aparece en un peso molecular aparente de 10 kDa. Las preparaciones de LPI-B y LPI-C marcadas con His y sometidas a escisión, eran igualmente puras.

55 EJEMPLO 3

La fagocitosis es un proceso inmunológico importante llevado a cabo por los fagocitos humanos para eliminar bacterias invasoras. Las etapas sucesivas que siguen pueden ser discriminadas, opsonización/reconocimiento/unión,

ingestión posterior de la bacteria por el fagocito y, finalmente, muerte y degradación de la bacteria y sus compuestos tóxicos.

3.1 Fagocitosis

5 La fagocitosis es resultado del reconocimiento de una partícula extraña por receptores específicos situados sobre la membrana plasmática de los fagocitos. Los neutrófilos expresan receptores para opsoninas derivadas del suero, que incluyen IgG y fragmentos opsonicos del componente C3 del complemento (C3B y C3bi). En este ejemplo se ensayó la fagocitosis de *S. aureus* por neutrófilos humanos, en presencia de suero humano. Además, se aislaron fracciones de IgG humana procedente de donantes sanos y se emplearon moléculas de IgG pura para estudiar la fagocitosis mediada por el receptor $Fc\gamma$ (mediada por =IgG). Se añadió LPI recombinante a estos ensayos para obtener percepción del papel de LPI como una molécula de inmunomodulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

15 Un cultivo de bacterias realizado durante la noche se hizo crecer 4 horas más en medio de reciente aportación. Las bacterias fueron lavadas e incubadas durante 1 hora a 37°C con FITC, 100 µg/ml, en el seno de solución tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6. El FITC libre se separó lavando las bacterias 2 veces. Se purificaron neutrófilos humanos en una gradiente de Ficoll/histopaque según se ha descrito anteriormente (Troelstra et al., J. Leukocyte Biol. 61, 173-178 (1997)) usando sangre total heparinizada procedente de un único donante. Se obtuvieron sueros humanos reuniendo sueros procedentes de 10 donantes sanos. Un total de 50 µl ($1,3 \times 10^7$ cfu/ml) de bacterias marcadas fueron incubadas con 100 µl de suero humano. 50 µl de rLPI (varias concentraciones) y 50 µl de 1×10^6 neutrófilos.

20 Las bacterias fueron mezcladas con los neutrófilos en una proporción de 10:1. Se dejó efectuar la fagocitosis durante 15 minutos a 37°C y se paró fijando muestras en 100 ml de paraformaldehído al 1%. Las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo.

RESULTADOS

25 La **figura 5** muestra el efecto inhibitorio de 3 µg/ml de rLPI sobre la absorción de *S. aureus* en suero humano normal. Bacterias marcadas fueron incubadas con concentraciones crecientes de suero humano en presencia o ausencia de rLPI. La fagocitosis por neutrófilos humanos ha sido representada como la absorción bacteriana media por los neutrófilos. La absorción de bacterias marcadas por los neutrófilos humanos aumenta con el aumento de las concentraciones séricas. Esta figura muestra un fuerte efecto inhibitorio de rLPI sobre la absorción bacteriana.

La **figura 6** ilustra el efecto inhibitorio de rLPI, dependiente de la dosis, sobre la absorción bacteriana.

30 . Con objeto de obtener percepción de las concentraciones inhibitorias efectivas de rLPI, se efectuó fagocitosis de *S. aureus* marcado en suero humano al 10% y con concentraciones crecientes de rLPI. Esta figura muestra que la proteína rLPI posee una concentración inhibitoria semimáxima ((IC50) de 0,3 µg/ml.

3.2 Fagocitosis mediada por IgG

MATERIALES Y MÉTODOS

35 Con objeto de concretar si los efectos anti-fagocíticos de rLPI observados eran mediados por inhibición de la absorción mediada por el receptor del complemento o por el receptor $Fc\gamma$, los sueros humanos fueron reemplazados por IgG purificada durante la fagocitosis. Se purificó IgG humana obtenida de suero procedente de un voluntario sano por cromatografía de afinidad con proteína G (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia, siguiendo las indicaciones del fabricante) según ha sido descrito anteriormente por Troelstra et al., (Troelstra et al., J. Leukocyte Biol. 61, 173-178 (1997)). Se añadió IgG en varias concentraciones. Se ensayó la proteína LPI recombinante en una concentración de 8 µg/ml. La fagocitosis se llevó a cabo durante 15 minutos a 37°C. Las bacterias se mezclaron con neutrófilos en una proporción de 15:1. Se evaluaron muestras por citometría de flujo y la fagocitosis se ha representado como la absorción bacteriana media por los neutrófilos.

RESULTADOS

45 La **figura 7** muestra que no hay efecto de 8 µg/ml de rLPI sobre la fagocitosis de *S. aureus* cuando ésta va mediada únicamente por receptores $FC\gamma$ sobre los neutrófilos. Este hecho se estudió incubando bacterias y neutrófilos con inmunoglobulinas humanas purificadas en lugar de suero.

3.3 En un experimento de fagocitosis similar se comparó rLPI con la molécula LPI marcada con His, extendida en el extremo N-terminal, mas grande.

RESULTADOS

50 La **figura 8** representa en efecto inhibitorio tanto de rLPI como de rHIS-LPI. Ambas moléculas muestran una inhibición comparable en concentraciones iguales. Se llegó a la conclusión de que la presencia de una marca de Histidina en el extremo N-terminal de la proteína no interfiere con la actividad de LPI.

EJEMPLO 4*4.1 Deposición de C3b sobre S. aureus*

5 La activación del complemento conduce a la deposición de las moléculas C3b y C3bi en la bacteria que son reconocidas por los receptores del complemento sobre los fagocitos. Para estudiar si el LPI es un inhibidor de la activación de complemento, se desarrolló un ensayo para medir la deposición de C3b en la superficie de *S. aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

10 Un cultivo de crecimiento estacionario de EMS de Cowan se lavó tres veces con PBS. 100 ml de 3×10^7 bacterias/ml fueron incubados en sueros humanos al 10% a 37°C. Las bacterias fueron lavadas y se detectó la molécula C3b unida a la superficie incubando bacterias con fragmento F(ab')₂ de cabra anti-C3 humana conjugado con fluoresceína (Protos Immunoresearch, Diessen, Países Bajos) por reacción con moléculas C3b intactas. Después se midió la fluorescencia por partícula utilizando citometría de flujo.

RESULTADOS

15 La **figura 9** representa el efecto inhibitorio de 3 µg/ml de rLPI sobre la deposición de C3b sobre la superficie de *S. aureus*. La deposición de C3b se llevó a cabo por incubación de *S. aureus* en suero humano al 10%, en presencia de rLPI durante intervalos de tiempo variables. Las bacterias fueron lavadas y se detectó la cantidad de C3b sobre la superficie mediante anticuerpos específicos marcados. La deposición de C3b ha sido representada como la fluorescencia bacteriana media. Se usó como testigo de la especificidad de los anticuerpos, suero inactivado por calor en el que se había destruido la actividad del complemento.

EJEMPLO 5**20 Activación del complemento por diferentes vías**

25 La activación del complemento sobre microorganismos puede iniciarse por medio de tres vías: la clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa. Con objeto de reconocer todos los diferentes microorganismos que se encontraron, estas vías actúan juntas para activar el complemento. Para estudiar si el papel inhibitorio del complemento desempeñado por LPI era debido a la inhibición de (una de) estas tres vías, se ensayó LPI en 3 ensayos bien descritos que miden, específicamente, estas vías.

5.1 La vía clásica (CP)

La CP es activada cuando C1q se une a complejos de antígeno-anticuerpo. C1q circula en el suero con dos proteasas de serina unidas, C1r y C1s. Por unión del complejo de C1 a un anticuerpo, son activadas C1r y C1s. La C1s escinde la C2 y C4 del complemento generando el complejo C4b2a que sirve como convertasa de C3.

30 MATERIALES Y MÉTODOS

35 Para medir el camino de activación de la vía clásica se llevaron a cabo medidas de CH50 similares a las de Klerx et al., (Klerx et al., J. Immunol. Methods, 1983, 63:215-20). Para abreviar, eritrocitos de oveja fueron incubados con anticuerpos anti-eritrocitos de oveja. Después eritrocitos cubiertos con Ab fueron incubados en suero humano durante 1 hora, a 37°C. La activación del complemento mediada por la vía clásica conduce a la formación de complejos de ataque a la membrana que lisan los eritrocitos. Se añadió 10 µg/ml de rLPI para ensayar el papel de LPI en la vía clásica.

RESULTADOS

40 La **figura 10** muestra la falta de efecto de LPI sobre la activación del complemento de la vía clásica, determinada mediante un ensayo de hemólisis con eritrocitos revestidos con inmunoglobulinas. La molécula LPI no inhibe la vía clásica.

5.2 La vía de las lectinas

La vía de las lectinas es iniciada cuando la MBL o las ficolinas reconocen azúcares existentes sobre las superficies microbianas. La MBL y la ficolina son complejadas también con proteasas de serina denominadas MASPs. La MASP-2 es responsable de la escisión de C2 y C4 generando una convertasa de C3.

45 MATERIALES Y MÉTODOS

50 La deposición de C3 mediada por la vía de las lectinas se llevó a cabo sobre placas recubiertas con manano según ha sido descrito por Roos et al., (Roos et al., Molecular Immunology, Volumen 39, Número 11, Enero 2003, páginas 655-668. Brevemente, se preparó suero agotado en C1q utilizando suero de un donante humano y una IgG de conejo anti-C1q humana, copulada a Biogel A5. El suero agotado en C1q se incubó sobre manano, un activador eficaz de MBL-MASPs, durante 1 hora a 37°C. La deposición de C3b se midió con anticuerpo anti-C3 humana conjugado a digoxigenina seguido de anticuerpo de oveja anti-dig conjugado a HRP.

RESULTADOS

La **figura 11** muestra el efecto inhibitorio de rLPI sobre la activación de la vía de las lectinas usando un método basado en el ensayo ELISA sobre placas recubiertas con manano y suero agotado en C1q con deposición de C3b como sistema de lectura. LPI inhibe fuertemente la vía de las lectinas de activación del complemento.

5 **5.3 La vía alternativa****MATERIALES Y MÉTODOS**

Para ensayar el efecto de LPI sobre la vía alternativa, se emplearon dos ensayos. En la **figura 12A**, se usó un método descrito por Schreiber et al., (Schreiber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, No. 8, páginas 3948-3954).

10 En breve, los componentes del complemento C3, factor D, Factor B y properdina (factor P) fueron purificados hasta homogeneidad. Después se incubó 0,5 mg de zimosán con estas proteínas purificadas en concentraciones similares a las de 25% de suero. Al cabo de 20, 30 ó 40 minutos a 37°C, se evaluó mediante citometría de flujo la deposición de C3b según se ha descrito en 4.1.

En la **figura 12B** se muestra el resultado de un ensayo de hemólisis de la vía alternativa realizado según ha sido descrito anteriormente por Klerx et al. (*supra*).

15 Brevemente, se suspendieron eritrocitos de conejo en EGTA-VB y se incubó con suero humano en presencia o ausencia de proteínas recombinantes, durante una hora, a 37°C. Los eritrocitos fueron aglomerados y 50 µl del sobrenadante fueron lisados en el seno de 100 µl de agua para determinar el tanto por ciento de hemólisis.

RESULTADOS

20 La **figura 12 A** muestra la falta de inhibición de rLPI sobre la deposición de C3b, mediante análisis por citometría de flujo de zimosán utilizando solamente C3, factor D, Factor B y properdina (factor P) purificados. La **figura 12B** muestra que el ensayo hemolítico es inhibido por LPI, LPI-B y LPI-C (CHIPS es la proteína empleada aquí como testigo negativo). Con los componentes purificados no se observa influencia de LPI sobre la vía alternativa.

EJEMPLO 6**6.1 Unión de LPI**

25 Los resultados descritos han sugerido un papel para LPI para prevenir la deposición de C3B y la subsiguiente fagocitosis por inhibición de la activación de complemento mediada por las lectinas. Se llevaron a cabo experimentos de unión de LPI sobre *S. aureus* para conseguir más información acerca de cómo la molécula LPI podría actuar como inhibidor de la activación del complemento.

MATERIALES Y MÉTODOS

30 Se marco con FITC LPI recombinante incubando 400 µg/ml de rLPI en una solución tampón de carbonato sódico 0,1 M (pH 9,6). La rLPI marcada con FITC fue purificado del FITC libre usando una columna de Desalación Rápida (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia). 0,5 mg de zimosán lavado se incubó en 0% ó 10% de sueros humanos, a 0°C y a 37°C. Asimismo, sueros humanos fueron desprovistos de moléculas de unión a polisacáridos por incubación de 500 ml de suero con un homogeneizado de la pared de células estafilocócicas. La unión de LPI sobre zimosán, en presencia de este suero agotado en lectinas, se comparó con la unión a suero normal, a 37°C. Después de incubación en suero, las bacterias fueron lavadas y se midió por citometría de flujo la rLPI marcada con FITC unida a la superficie.

RESULTADOS

40 La **figura 13** muestra una asociación dependiente de la dosis, de LPI-FITC a partículas de zimosán, en citometría de flujo. La unión depende de la presencia de suero y no tiene lugar a 0°C. La **figura 14** presenta las características cinéticas de unión de rLPI sobre zimosán. La unión de LPI recombinante-FITC depende de la presencia de suero humano., debido a que rLPI no se une a las bacterias si está sola. Además, la rLPI no se une a bacterias a 0°C. Parece que es necesario un proceso de activación. En comparación con la unión de rLPI en suero humano, esta unión está completamente suprimida en suero agotado en lectina. Este último resultado demuestra, de nuevo, que LPI afecta a la vía de las lectinas de activación del complemento y no a la vía clásica. La unión de rLPI-FITC está representada como la fluorescencia bacteriana media. De esto se deduce que es probable que la proteína LPI necesite un componente sérico para su interacción, y que este componente depende de la activación. Debido a que este componente es parte de la vía de las lectinas, la MASP-2 es el candidato más probable.

EJEMPLO 7

50 ¿Qué componente de la vía de las lectinas es inhibido por LPI?

7.1 MBL

El primer componente de la vía de las lectinas es la MBL (lectina que une manosa). Para evaluar los efectos de LPI sobre la unión de MBL se analizó la unión de MBL a zimosán en presencia o ausencia de rLPI.

MATERIALES Y MÉTODOS

5 0,5 mg de zimosán lavado se incubó con 30% de suero humano normal o en suero deficiente en C3 (Sigma) , durante 30 minutos a 0°C ó 37°C, respectivamente. Se detectó la MBL mediante la incubación subsiguiente de partículas de zimosán con anticuerpos monoclonales anti-MBL (Hbt, Uden, Países Bajos) seguido de anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados a fluoresceína.

Se determinó la fluorescencia por partícula mediante análisis por citometría de flujo.

RESULTADOS

10 La **figura 15** representa la unión de MBL a partículas de zimosán en presencia o ausencia de LPI. Se detectó la MBL mediante citometría de flujo después de tinción con un anticuerpo específico anti-MBL. La asociación de MBL no resulta afectada por la presencia de LPI.

La siguiente etapa de la vía de las lectinas implica a la proteasa de serina -2 asociada a MBL (MASP-2). La interacción de LPI con MASP-2 fue evaluada de dos modos: asociación e inhibición funcional.

15 *7.2 Asociación de MASP-2*

MATERIAL Y MÉTODOS

20 Se marcó rLPI con ¹²⁵I usando Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3a,6a-difenilglicolurilo) (Sigma) como agente oxidante (Fraker y Speck, 1978). El ¹²⁵I libre se separó por desalación en una columna de filtración por gel Sephadex G.25, PD-10 (Farmacia) que fue saturada previamente con Emulphogene BC720 (Sigma) en el seno de HBS, al 0,1% (v/v). Las fracciones proteínicas radiomarcadas fueron reunidas y mantenidas a 4°C. El LPI marcado con ¹²⁵I se incubó con proteínas del complemento purificadas, con inclusión de MASP-1 y MASP-2 recombinantes (que consistían en las dos regiones de control del complemento y los dominios de la proteasa de serina, según ha sido descrito por Ambrus et al., 2003, G. J. Immunol. 170 (2003), páginas 1374-1382), durante 15 minutos a 37°C. Las mezclas de proteínas fueron procesadas en una columna Superose-6 (Amersham) y se determinó la actividad específica de ¹²⁵I-LPI midiendo las fracciones recogidas en un contador manual g Mini-Assay tipo 6-20 (Mini Instruments, Burnham-on-Crouch. Essex, GB).

RESULTADOS

La **figura 16** muestra la asociación entre rLPI y rMASP-2, analizada mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando rLPI yodada. LPI y MASP-2 interaccionan formando un complejo molecular de mayor tamaño.

7.3 Actividad de MASP-2

30 **MATERIAL Y MÉTODOS**

35 Se incubó 0,2 mg de rMASP-2 con 0,1 mg de Protrombina (Calbiochem) y VPR-AMC 0,1 mM (Bachem, Bubendorf, Suiza) en presencia o ausencia de varias concentraciones de rLPI. La rMASP-2 puede escindir la protrombina dando trombina. La escisión del sustrato VPR-AMC, específico de trombina, se midió cada 30 segundos durante 1 hora usando un lector de placas de microtitulación (Fluoroskan, Thermo Life Sciences, Basingstoke, GB) excitando las muestras a 355 nm y leyendo la emisión a 460 nm.

RESULTADOS

La **figura 17** muestra la inhibición de actividad de rMASP-2 por rLPI, en un ensayo específico de escisión proteolítica, usando un sustrato fluorescente. El LPI inhibe la actividad de MASP-2.

EJEMPLO 8

40 *8.1 El mecanismo molecular de LPI*

La MASP-2 tiene dos actividades proteolíticas específicas: la escisión de C2 y la escisión de C4. Para determinar cual es el mecanismo de acción exacto de LPI se ensayaron ambas acciones de MASP-2 y se evaluaron los efectos de LPI sobre estas etapas separadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

45 *Deposición de C4*

50 Se midió la deposición de C4 mediada por LP exactamente como se ha descrito en la sección 5.2 para medir la deposición de C3 mediada por LP, con la excepción de que se empleó un anticuerpo monoclonal anti-C4 con objeto de detectar la deposición de C4b. Alternativamente, se capturaron complejos de MBL-MASP en placas recubiertas con manano, por incubación de 100 µl de suero humano al 50% en solución tampón de NaCl 1 M (para evitar la unión de C1q a IgG). Después de lavar el complejo de MBL-MASP con soluciones tampón de bajo contenido salino, se añadió C4

humana purificada y se dejó proseguir durante 1 hora a 37°C la escisión de C4 mediada por MBL-MASP. Las moléculas C4b depositadas fueron detectadas según se ha descrito antes.

Ensayo de escisión de C2

5 Se ensayó del modo siguiente la activación de C2 como resultado de incubar suero humano con partículas de zimosán. Se incubó 0,25 mg de zimosán con suero humano al 40% durante 0, 20 ó 40 minutos. Las moléculas C2 escindidas y sin escindir fueron detectadas sometiendo el 10% del suero incubado a electroforesis en gel y transferencia Western usando un anticuerpo de cabra anti-C2 humana (Quidel, San Diego, CA) seguido de un anticuerpo de asno anti-cabra conjugado a HRP y ECL (Amersham).

RESULTADOS

10 La **figura 18** muestra la deposición de C4b sobre placas revestidas con manano, mediada por LP, en presencia de cantidades crecientes de rLPI y diferentes cantidades de suero. No se observa inhibición. En la **figura 19** está representada la activación de C4 por complejos de MBL-MASP capturados, que escinden la C4 humana purificada. El efecto de la adición de LPI es comparado con el de un anticuerpo anti-MBL (inhibición total). La proteína LPI no muestra inhibición de la deposición de C4 dependiente de MSP-2. Sin embargo, la escisión de C2 está claramente afectada por LPI.

15 En la **figura 20** se analizó por transferencia Western la escisión de C2 para dar C2a y C2b después de haber tenido lugar la activación del complemento en el seno de suero, durante diversos períodos de tiempo, con o sin LPI. La **figura 20a** muestra la transferencia después de tinción con anti-C2. La **figura 20b** muestra el análisis densitométrico de esta misma transferencia para la banda de C2b específica. La molécula LPI inhibe claramente la escisión de C2.

20 Tomado en conjunto, se ha designado que el LPI interfiere con la escisión de C2 mediada por MASP-2, bloqueando con ello la totalidad de la vía de las lectinas (la MBL y las picolinas son todas dependientes de MASP-2). Además, esta acción hace al LPI también completamente específico de la vía de las lectinas, sin interferir con otras vías del complemento.

EJEMPLO 9

25 La actividad de LPI de las moléculas LPI-B y LPI-C, semejantes a LPI

9.1 En un experimento de fagocitosis separado se ensayaron LPI-B y LPI-C para determinar actividad de LPI

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo de fagocitosis se llevó a cabo según se ha descrito en 3.1

RESULTADOS

30 La **figura 21** representa el efecto anti-fagocítico de ambas moléculas, rLPI-B y LPI-C, en presencia de concentraciones diferentes de suero. De este hecho se dedujo que LPI-B y LPI-C poseen, por lo menos, actividad de LPI.

REIVINDICACIONES

1.- Péptido o polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que corresponde a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 5 a) una secuencia de nucleótidos que comprende una parte de una de las secuencias representadas en la **Figura 2a** y **2b** e identificada como **SEQ ID NO: 2**, **SEQ ID NO:4**, **SEQ ID NO:6**;
- b) secuencias de nucleótidos que codifican un péptido o polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos representada en la **Figura 3** e identificada como **SEQ ID NO:3**, **SEQ ID NO:5** o **SEQ ID NO: 7**;
- 10 c) secuencias de nucleótidos que codifican un péptido o polipéptido que posee una parte de la secuencia de aminoácidos representada en la **Figura 3** identificada como **SEQ ID NO:3**, **SEQ ID NO:5** o **SEQ ID NO: 7**;
- d) secuencias de nucleótidos que son, al menos, 40% idénticas a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a), b) o c);
- e) secuencias nucleótidos que se hibridan en condiciones restrictivas con una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a), b), c) o d), y
- 15 f) secuencias complementarios de cualquiera de las secuencias de nucleótidos a), b), c), d) o e),
- en que dicho péptido o polipéptido posee actividad de LPI (Inhibidor de la Vía de las Lectinas), que evita la activación de la vía de las lectinas de activación del complemento evitando específicamente la escisión de C2 a C2a y C2b dependiente de MASP-2 (Proteasa-2 de Serina Asociada a Lectina que Une Manosa), y dicho péptido o polipéptido es para usar en la profilaxis o el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas y crónicas, y dicho péptido es, homólogo, al menos 40%, con la proteína del LPI.
- 20 2.- Péptido o polipéptido según la reivindicación 1, en que la parte de la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado a), corresponde a los nucleótidos 1 a 490 de la **Figura 2a (SEQ ID NO: 2)**.
- 3.- Péptido o polipéptido según la reivindicación 1, en que la parte de la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1 apartado a), corresponde a los nucleótidos 41 a 490 de la **Figura 2a (SEQ ID NO: 2)**.
- 25 4.- Péptido o polipéptido según la reivindicación 1, en que la parte de la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado a), corresponde a los nucleótidos 125 a 490 de la **Figura 2a (SEQ ID NO: 2)**.
- 5.- Péptido o polipéptido según la reivindicación 1, en que la parte de la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado a), corresponde a los nucleótidos 1 a 490 de Ipi-B (**SEQ ID NO:4**) o Ipi-C (**SEQ ID NO: 6**) de la **Figura 2b**.
- 30 6.- Péptido o polipéptido según la reivindicación 1, en que la parte de la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado a), corresponde a los nucleótidos 41 a 490 de Ipi-B (**SEQ ID NO:4**) o Ipi-C (**SEQ ID NO: 6**) de la **Figura 2b**.
- 7.- Péptido o polipéptido según la reivindicación 1, en que la parte de la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado a), corresponde a los nucleótidos 125 a 490 de Ipi-B (**SEQ ID NO:4**) o Ipi-C (**SEQ ID NO: 6**) de la **Figura 2b**.
- 35 8.- Péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-7, en que la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado d), posee una identidad que es, al menos 50%, idéntica a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a, b o c.
- 9.- Péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-7, en que la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado d), posee una identidad que es, al menos 60%, idéntica a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a, b o c.
- 40 10.- Péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-7, en que la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado d), posee una identidad que es, al menos 70%, idéntica a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a, b o c.
- 45 11.- Péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-7, en que la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado d), posee una identidad que es, al menos 75%, idéntica a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a, b o c.
- 50 12.- Péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-7, en que la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado d), posee una identidad que es, al menos 80%, idéntica a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a, b o c.

13.- Péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-7, en que la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 1, apartado d), posee una identidad que es, al menos 90%, idéntica a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos a, b o c.

5

14.- Péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-13, en que las condiciones restrictivas están constituidas por hibridación durante la noche a 42°C en SSC 5x y lavado a 65°C en SSC 0,1x..

15.- Péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-14, en que una parte de la secuencia de aminoácidos según la reivindicación 1, apartado c), constituye sola o con otras partes de la secuencia de aminoácidos, la región o regiones del péptido o polipéptido que posee actividad de LPI.

10

16.- Uso del péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-15, para fabricar una preparación terapéutica para la profilaxis o el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas y crónicas.

17.- Una composición terapéutica que comprende un excipiente adecuado y el péptido o polipéptido según las reivindicaciones 1-15, para la profilaxis o el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas y crónicas

18.- Microorganismo que aloja una molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 1-15, para usar como medicamento para el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas y crónicas.

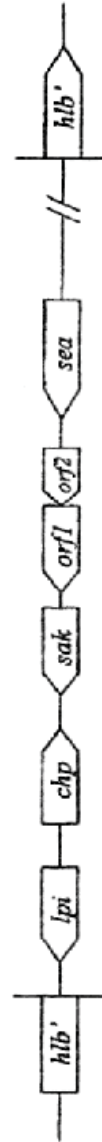


Figura 1

Figura 2b

lpi (SEQ ID NO 2)

ATCTRTATAGTTAATGAATTAATTAAATGTACTTTTTTTAGTTAGTCATTAATAATAAATTAGTACTAATTACT

AGGGGAATTAATAAATGAATAATTAGRAAATCTATACTTTGCCGGAACTTTAGCCHATCGTTTTAGCATCCCCAC

TAGTAACTAATCTAGATAAATAATGAGGCCACAAGCTAGCCACAAGCTTGCCACACTCGAATGAAATATCRAAAG

AAAAGTTAGCTAAATGAATTAATAATCGTTATTAGATGACATAAATGTTAAATGAAATAGCTACTGGCAGTTAA

T

ACACTTATTATAAGCGAACCTAATAATTCAGGTCMAAAGCAATGTAATGCTTTAAGTCAAAAGACTTTA

AGAAAATGTCAGGCAAAATATCRACTTCAAAAGTTTTAATACGAAATGACGGAAGCACTAAATAAGTAAAT

ATTAAAAAACCA CCGTAAAGGGTGGTTTTAATTTTCTAGATATATAAAGTGTTCATATAATAAACAG

TATAGG

Figura 3

LPI (116aa) (SEQ ID NO 3)

MKPKRSILAGTIAIVLRSPLVTNLCKNEAQA^SSLPTSGNEYQNEKLANELKSLIDELNVNELATGSLNTYYK

^L

RTIKISGQKAMYALKSKDFKRMSEAKYQLQKIYNEIDEALKSKY

LPI-B (116aa) (SEQ ID NO 5)

MKFKKYILIGTIALLLSSTGIATIEGNKADASSL^DDKYL^TTESQFHDKRIAEELRTLLNKSNVYALAGSLNPFYKRTIMNEYRAKAAKKNDFVSMADAKVALEKLYKEIDEIINR

LPI-C (116aa) (SEQ ID NO 7)

MKFKKYIVAGTAVLAVLLSTTAVSTLDGNKADASSK^DKDYI^LIQSEFFHDKRIAEELKSLDQSYVNDLAGSLNPFYKRMIMMNYRAKAAKSNNF^AKMAEAKVGLENIYKEIDEIINR

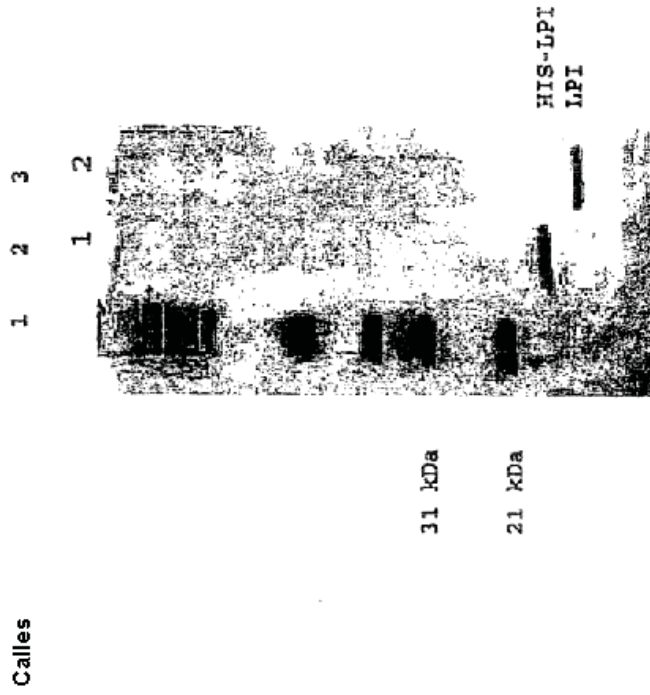
LPI-D (114aa) (SEQ ID NO 9)

MTTQMKIKTYLVAGIKAAALLDTTGIKLASKSETTSHTYHQALVDQLHELIANTDENKLSYLNLD^AFOK

^{H D}

RDILAAHYIAKSAIRTKNLDQMTKAKQKQLESIYNSISNPLHSQNN

Figura 4



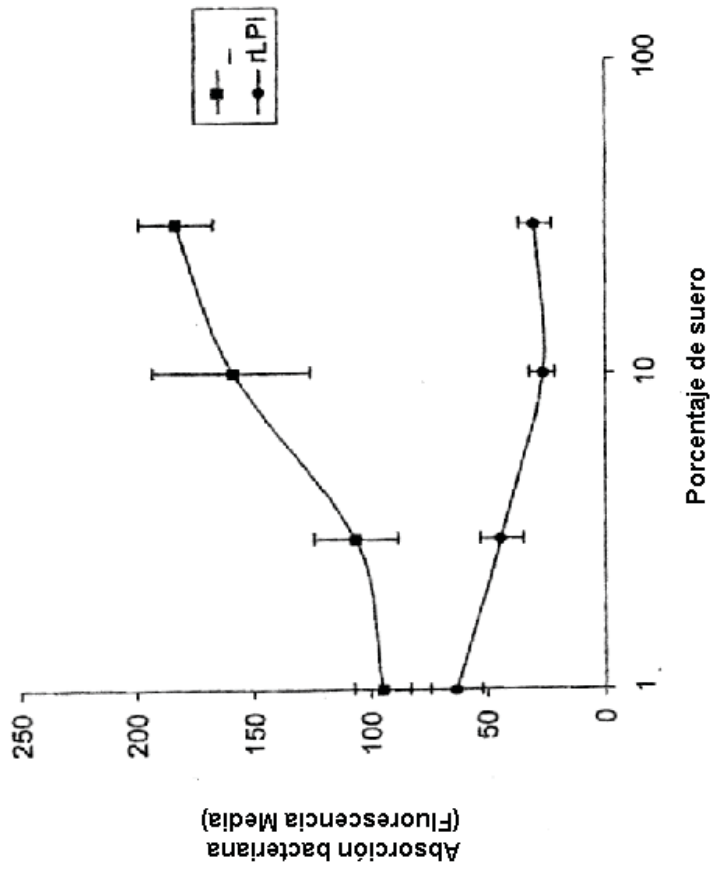


Figura 5

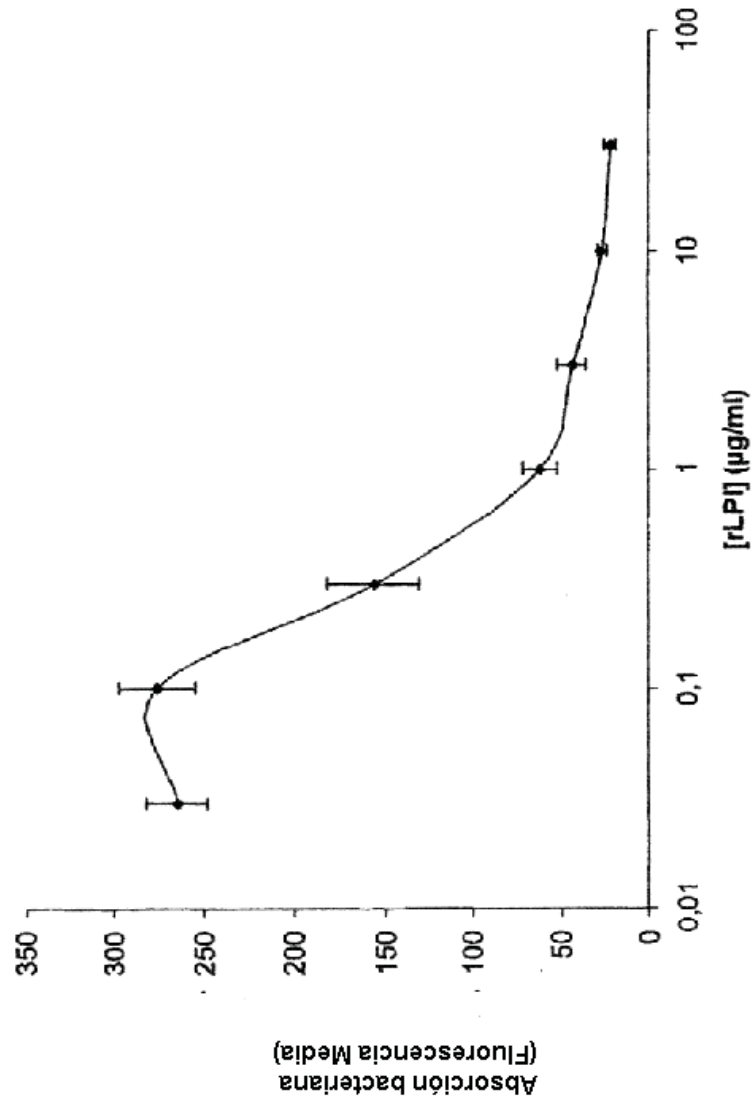


Figura 6

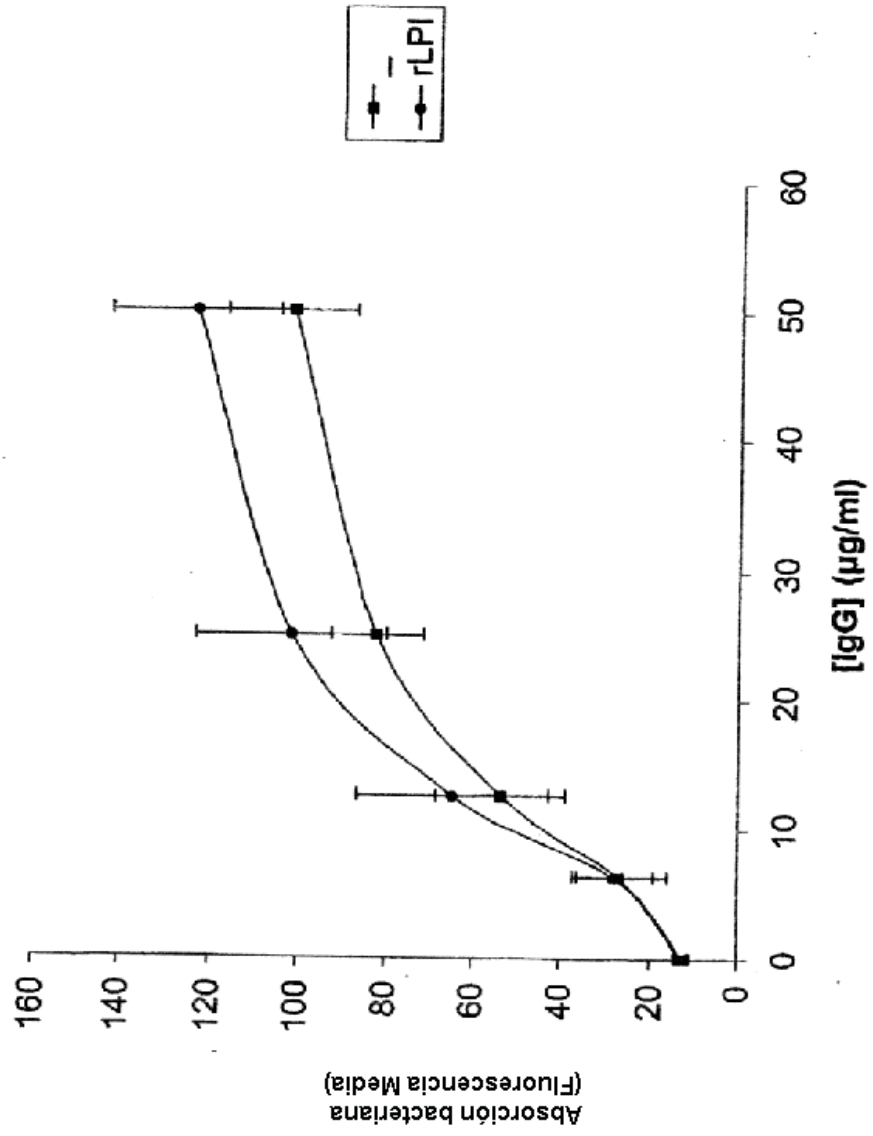
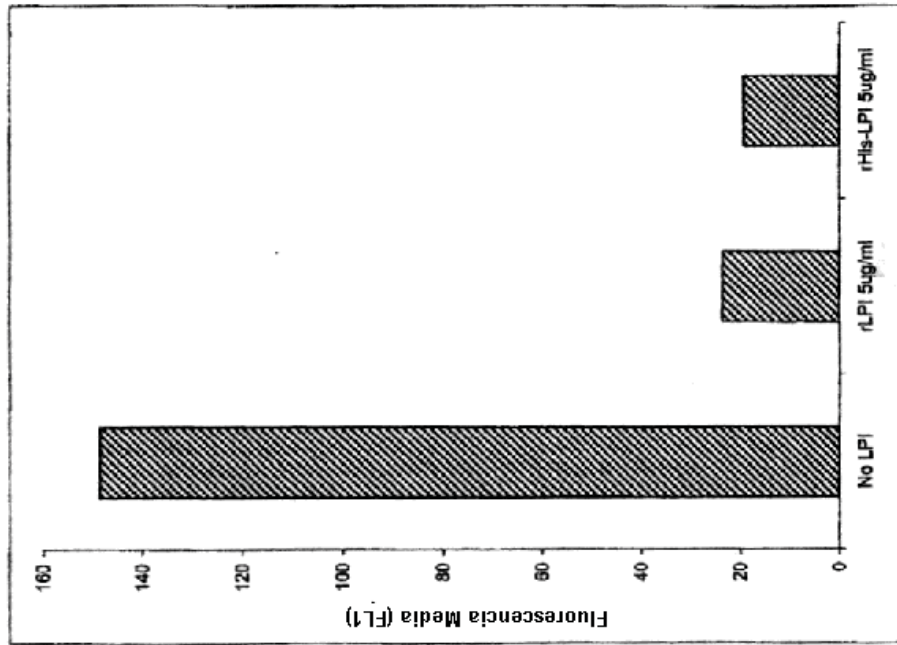


Figura 7

Figura 8



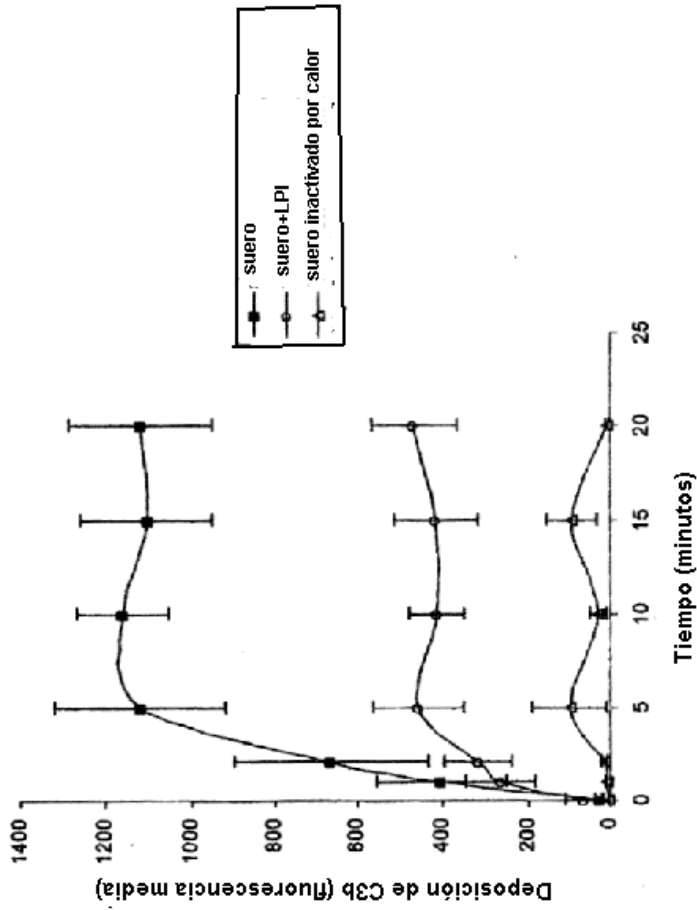


Figura 9

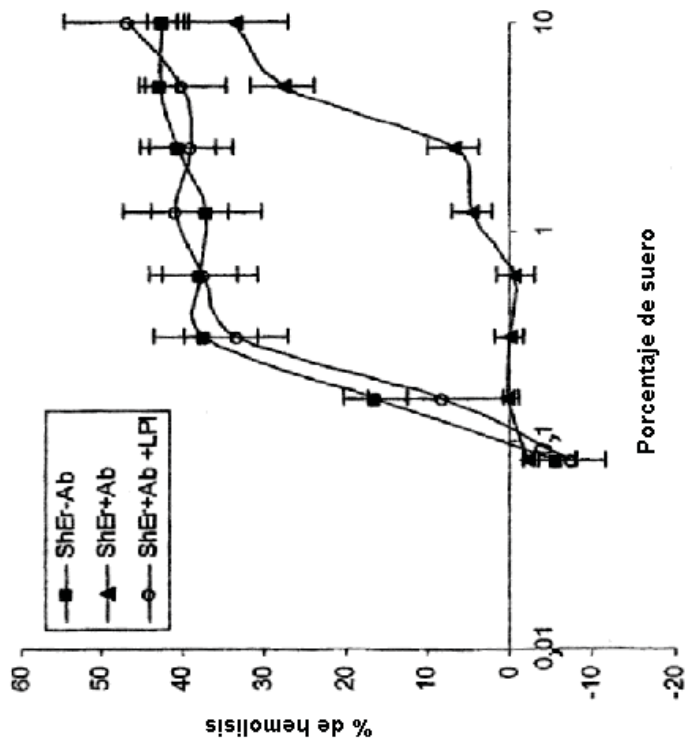


Figura 10

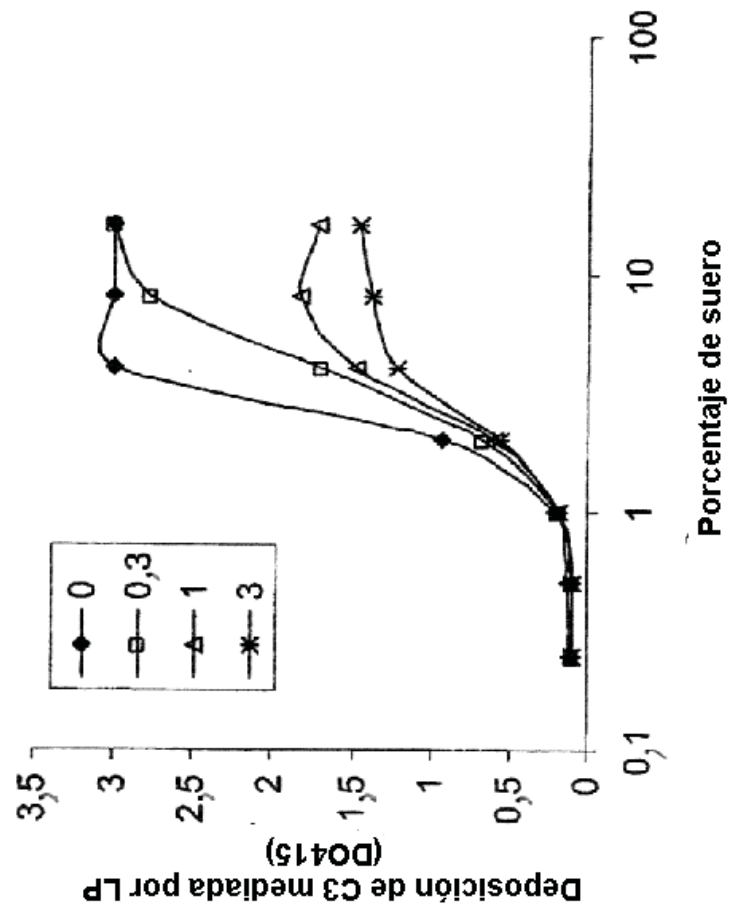
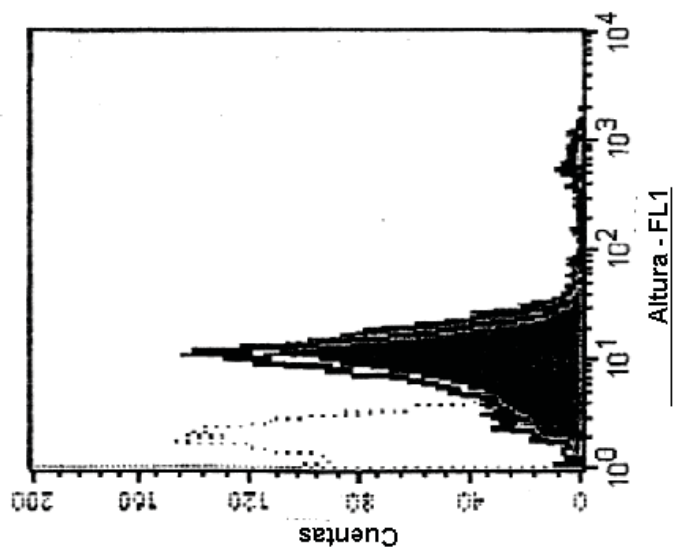


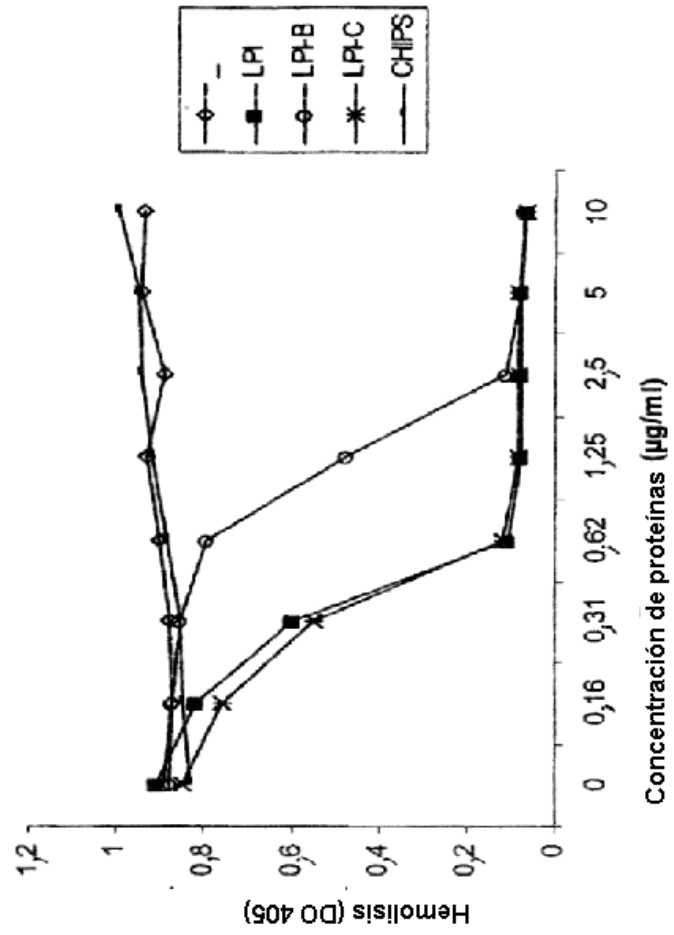
Figura 11

Figura 12

12A



12B



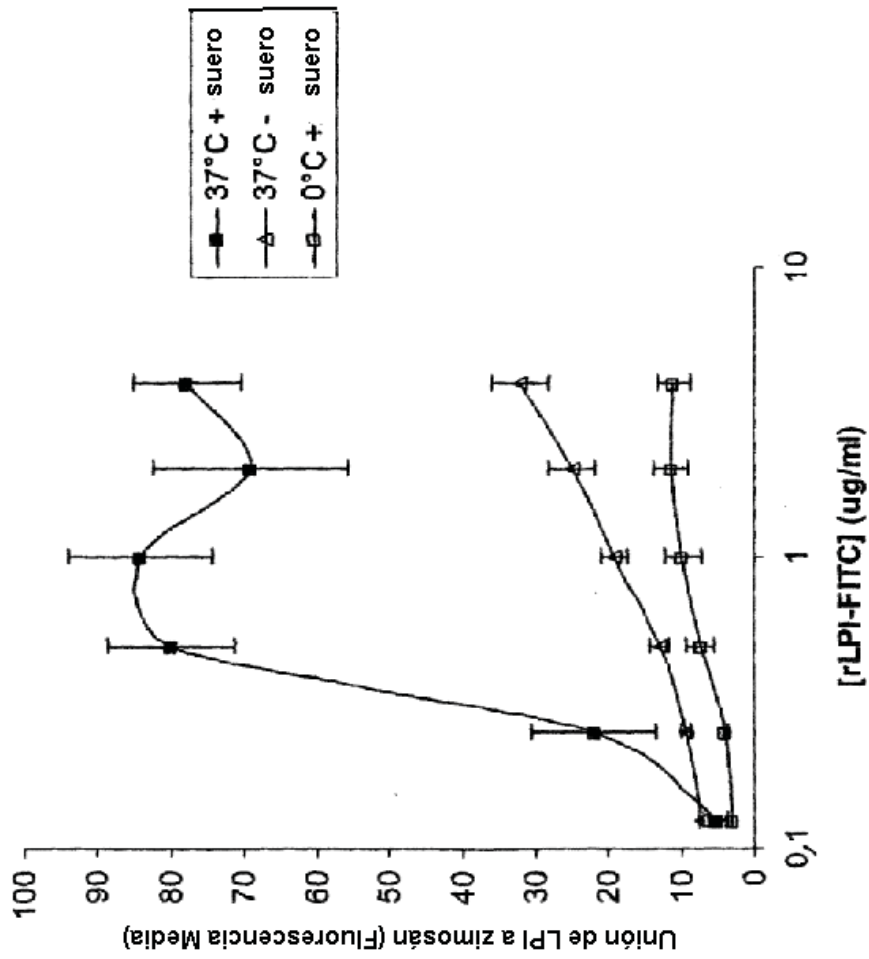


Figura 13

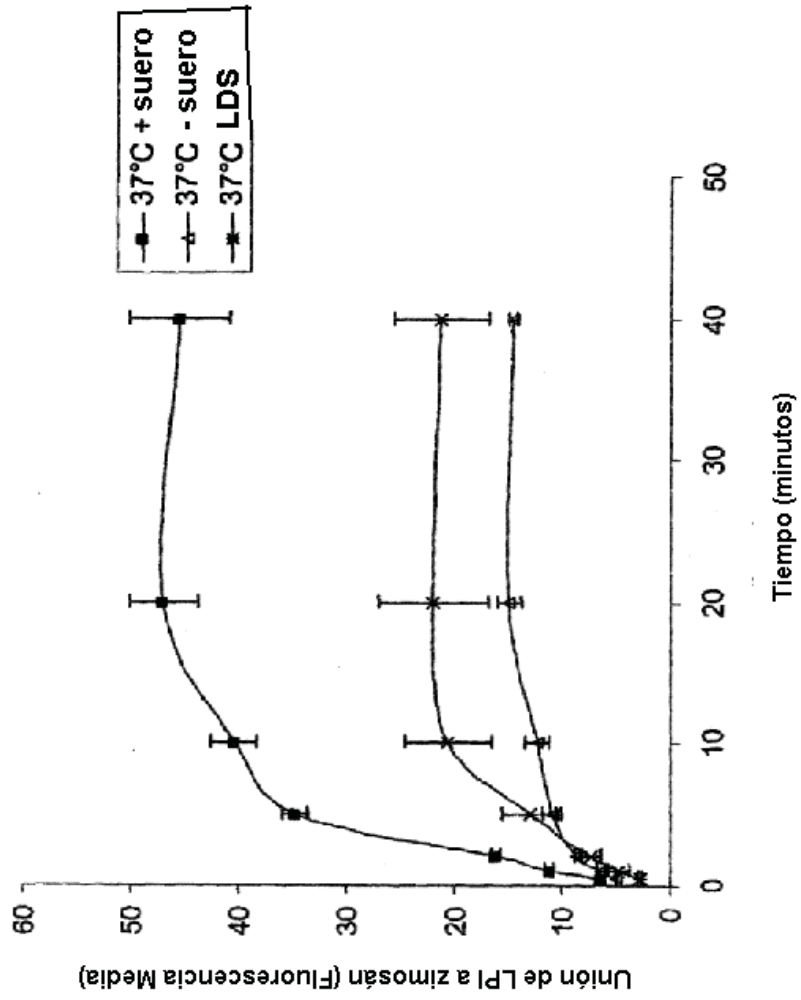
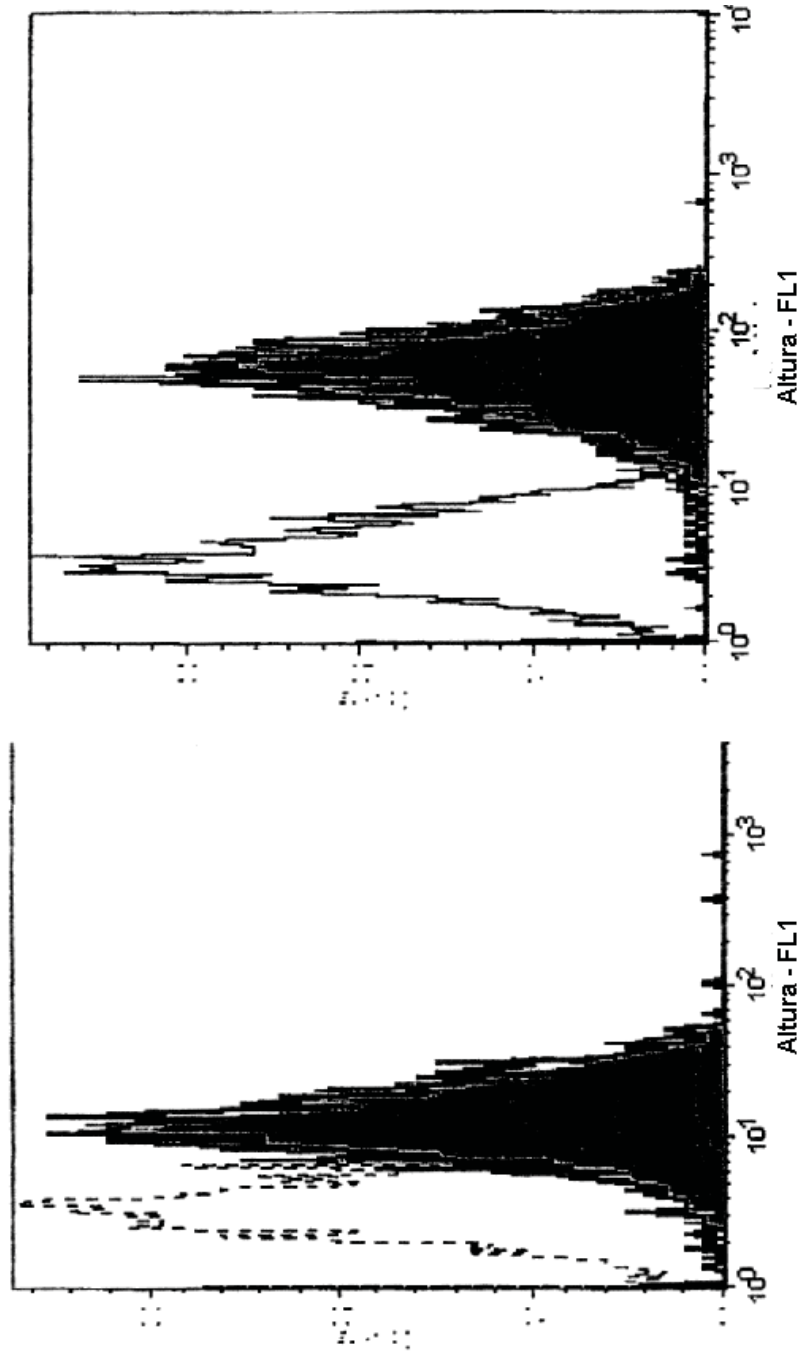


Figura 14

Figura 15



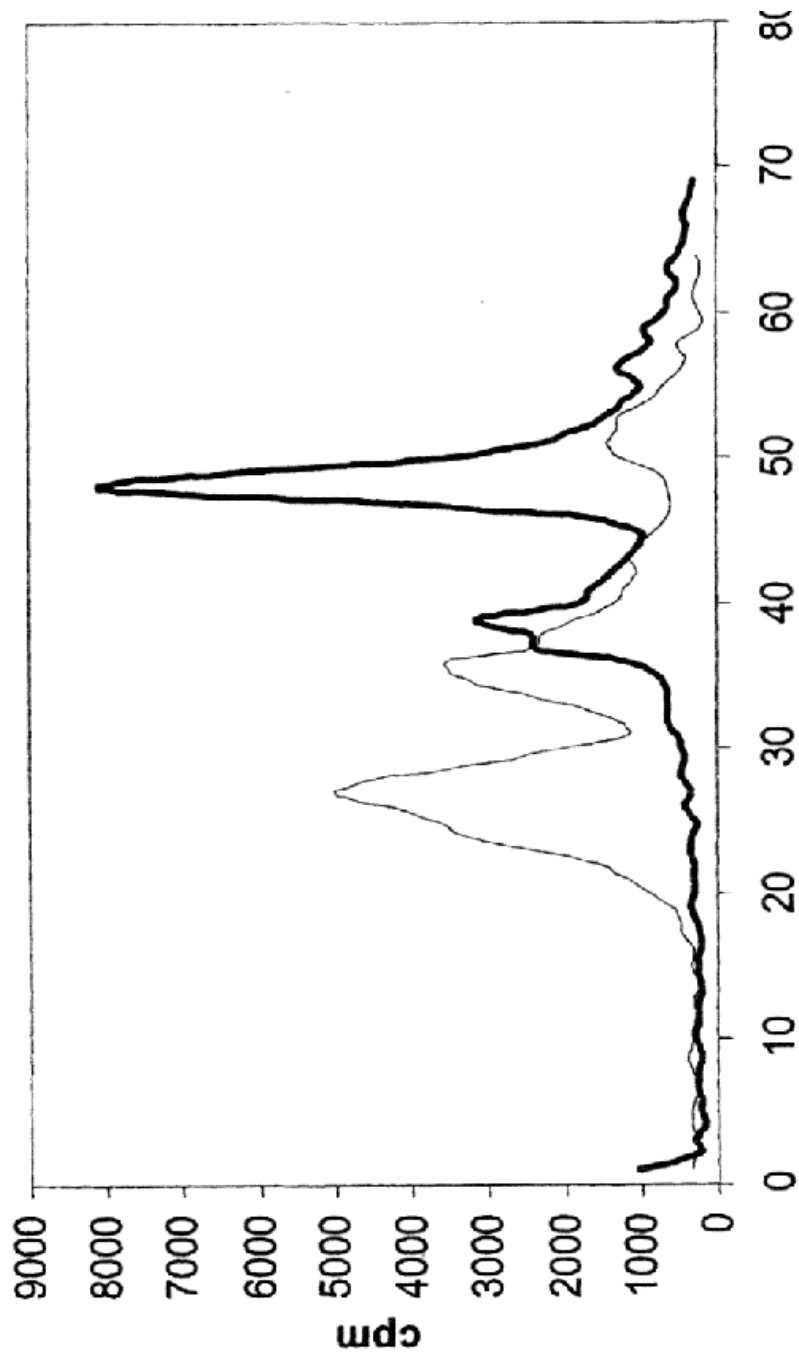
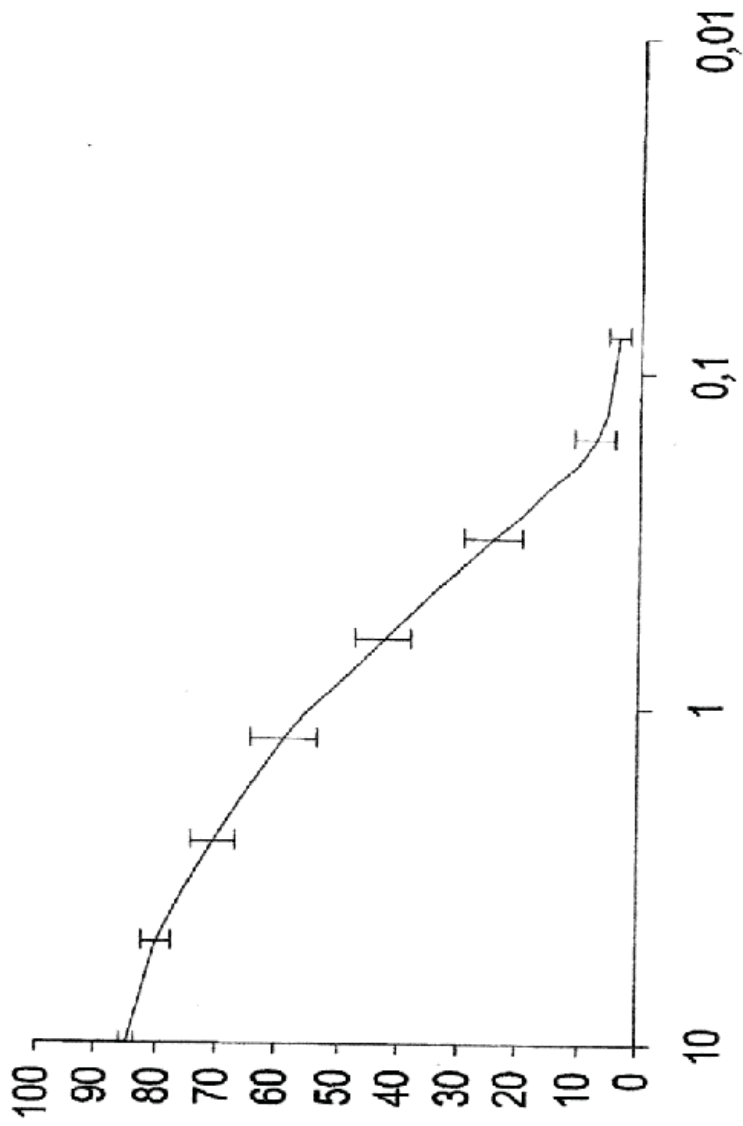


Figura 16

Figura 17



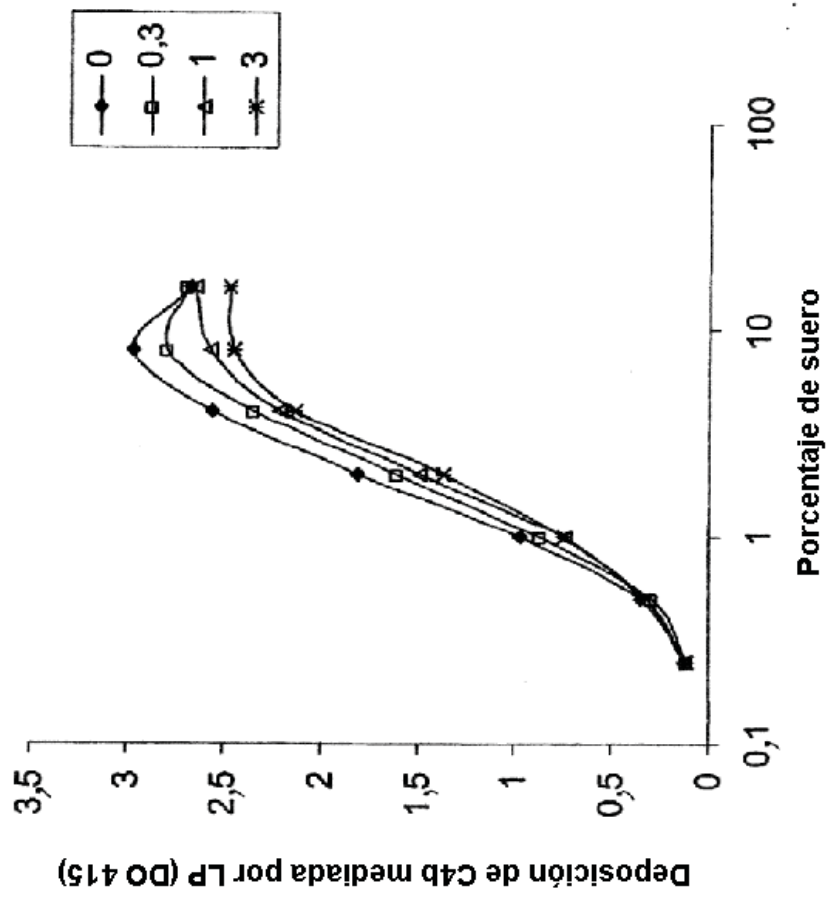


Figura 18

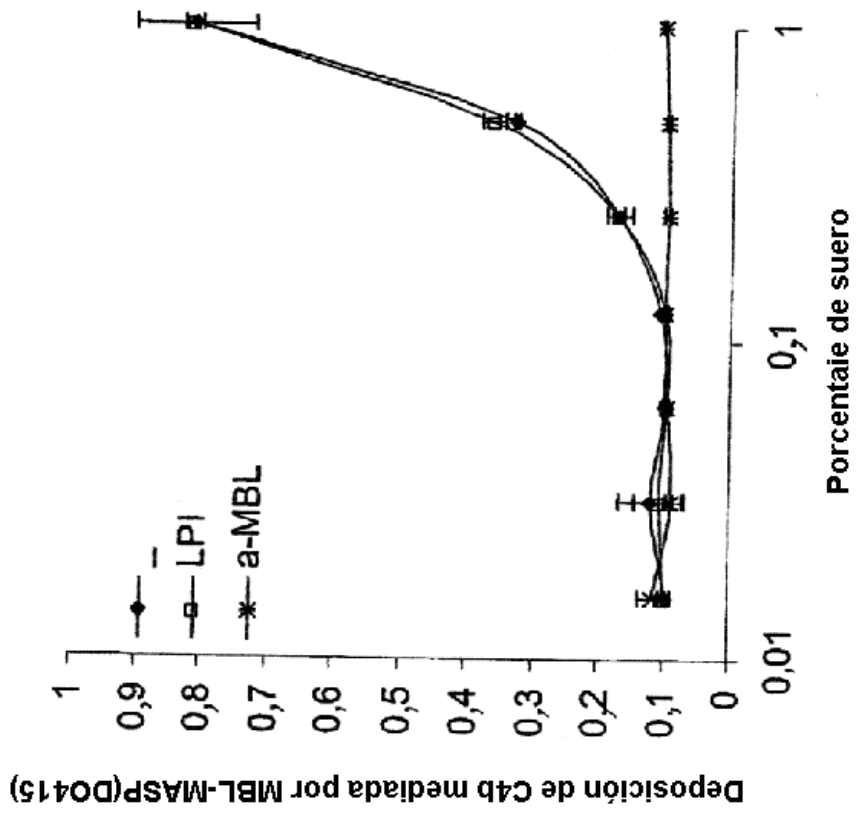
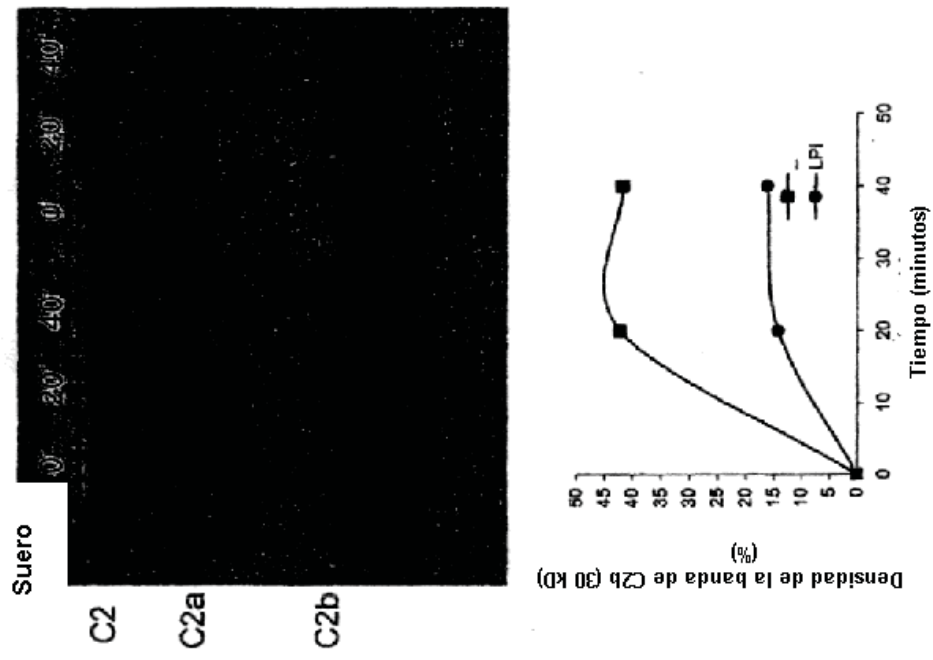


Figura 19

Figure 20



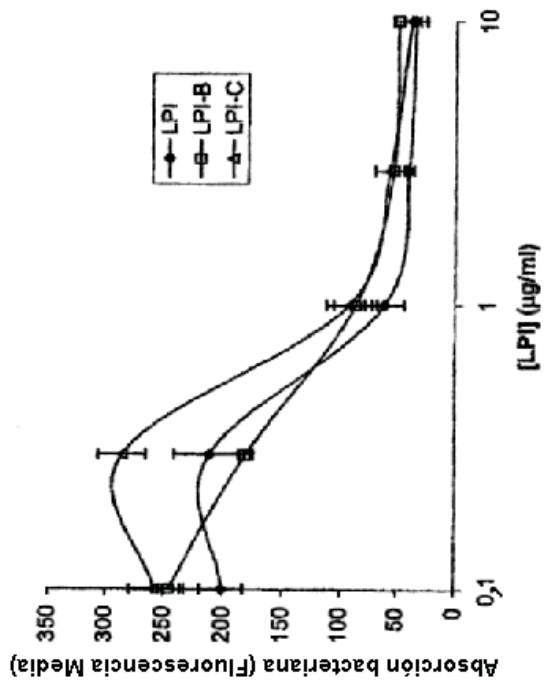
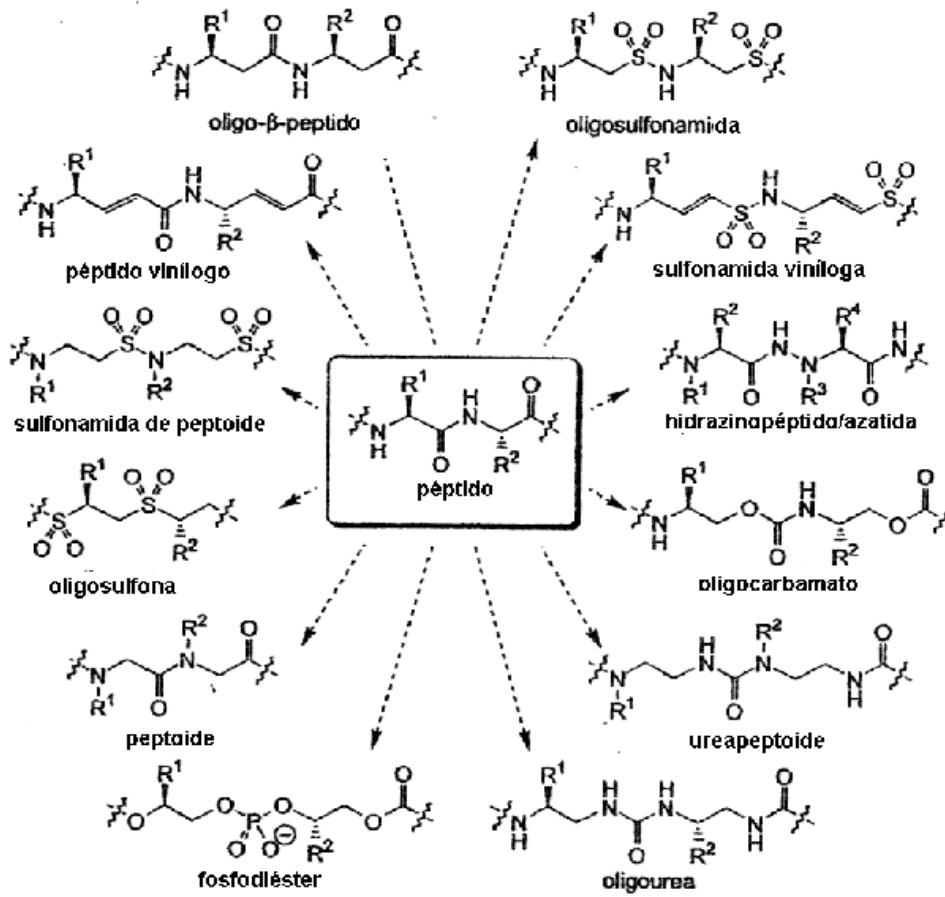


Figura 21



Estructuras de peptidomiméticos oligómeros comparadas con la estructura de péptidos

Figura 22