



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 370**

51 Int. Cl.:
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05789623 .5**
96 Fecha de presentación : **28.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1797120**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Pentraxina larga PTX3 desialidada y desglucosilada.**

30 Prioridad: **08.10.2004 IT RM04A0489**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2011

73 Titular/es: **SIGMA-TAU INDUSTRIE
FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare 47
00144 Roma, IT**

72 Inventor/es: **De Santis, Rita;
Salvatori, Giovanni;
Carminati, Paolo y
Inforzato, Antonio**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 370 T3

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

DESCRIPCIÓN

Pentraxina larga PTX3 desialidada y desglucosilada

La presente invención se refiere a pentraxina larga PTX3 totalmente desglucosilada funcionalmente activa.

5 En particular, la presente invención se refiere a pentraxina larga PTX3 totalmente desglucosilada funcionalmente activa y pentraxina larga PTX3 desialidada, procedimientos para su preparación, composiciones farmacéuticas que contienen estas sustancias y su uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades en las que se indica el uso de pentraxina larga PTX3, particularmente enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, incluyendo enfermedades autoinmunes y enfermedades causadas por infarto tisular, enfermedades de hueso y cartílago, así como para el tratamiento de trastornos de fertilidad femenina y vacunas autólogas para el tratamiento de tumores.

Antecedentes de la invención

15 La pentraxina PTX3 larga se identifica por exploración diferencial de una bibliotecas de fagos de ADNc compuesta de células endoteliales humanas (HUVEC) sometida a tratamiento con IL1 β (Breviario, y col., 1992, J. Biol. Chem., 267: 22190-22197). Su secuencia de nucleótidos se desvela en la base de datos de NCBI con el número de acceso X63613. El ADNc de PTX3 codifica una proteína de 381 restos aminoácidos caracterizada por un péptido señal para la secreción (restos 1-17), por un dominio N-terminal (restos 18-178) y por un dominio C-terminal (restos 179-381). El gen de pentraxina PTX3 larga humana se localiza en el cromosoma 3 en la región q25.2 y se caracteriza por 3 exones localizados en 6,72 kb de ADN genómico.

20 La PTX3 recombinante, purificada del sobrenadante de células CHO infectadas de forma estable con el vector plasmídico pSG5h-PTX3 que contiene el ADNc humano de PTX3, analizada por SDS-PAGE en condiciones reductoras, presenta un peso molecular aparente de 45 kDa (Bottazzi, y col., J. Biol. Chem., 1997; 272: 32817-32823). Su secuencia de aminoácidos muestra un sitio de glucosilación potencial en el resto 220. El tratamiento de PTX3 con N-glucosidasa F conduce a la reducción de su peso molecular a aproximadamente 42 kDa (estimado por SDS-PAGE) de acuerdo con el valor calculado basándose en la secuencia de aminoácidos sola.

25 Este resultado confirma que PTX está N-glucosilada con una contribución de azúcar que constituye aproximadamente el 12 % del peso molecular. El análisis de la proteína analizada por SDS-PAGE en condiciones no reductoras produjo un peso molecular de aproximadamente 450 kDa (Bottazzi, y col., J. Biol. Chem., 1997; 272: 32817-32823). Estos resultados indican claramente que PTX3 se organiza principalmente en una estructura decamérica a través de la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre los restos de cisteína de los monómeros individuales.

30 Sin embargo, el protocolo de desglucosilación propuesto en el artículo anteriormente mencionado no permite la preparación de una PTX3 funcionalmente activa, a la vista del hecho de que, para que esto se realice, son necesarias tanto desnaturalización como reducción de los puentes disulfuro de la proteína.

35 La proteína obtenida de acuerdo con el procedimiento de Bottazzi y col. no puede usarse como un medicamento, habiendo perdido sus características funcionales. No se sugiere, sin embargo, el uso de la pentraxina desglucosilada.

La presente invención resuelve el problema proporcionando pentraxina PTX3 desglucosilada funcionalmente activa.

Para una revisión de las pentraxinas, véase H. Gewurz, y col., Current Opinion in Immunology, 1995, 7:54-64.

Se conocen bien usos previos de PTX3.

40 La solicitud de patente internacional WO 99/32516, presentada en nombre del presente solicitante, desvela pentraxina PTX3 larga y su uso para la terapia de enfermedades infecciosas o inflamatorias o tumores.

El documento WO 02/38169 desvela el uso de pentraxina PTX3 larga para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades asociadas con activación anómala del factor de crecimiento FGF-2.

45 El tratamiento de enfermedades autoinmunes mediante el uso de pentraxina PTX3 larga de desvela en el documento WO 02/36151.

El documento WO 03/011326 desvela el uso de pentraxina PTX3 larga para el tratamiento de infertilidad femenina.

El documento WO 03/084561 desvela el uso de pentraxina PTX3 larga para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores asociados con activación anómala del factor de crecimiento FGF-8.

50 El documento WO 03/072603 desvela el uso de pentraxina PTX3 larga para la preparación de vacunas autólogas para el tratamiento de tumores.

PTX3 comparte con las pentraxinas cortas CRP y SAP la capacidad de unirse a C1q, un componente del sistema de complemento. La unión de PTX3 a C1q se satura con una K_d de $7,4 \times 10^{-8}$ M. Estudios cinéticos de la interacción biomolecular entre PTX3 y C1q llevados a cabo usando el BIAcore ha hecho posible medir una K_{on} de $2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y una K_{off} de $4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (Bottazzi, y col., J. Biol. Chem., 1997; 272: 32817-32823).

- 5 El análisis comparativo de la homología de secuencia entre PTX3 y pentraxinas cortas ha revelado una homología sustancial del dominio C-terminal de PTX3 con la secuencia completa de CRP y SAP (Breviario, y col., 1992, J. Biol. Chem., 267: 22190-22197). Tanto CRP como SAP compiten por la unión de C1q a PTX3, lo que sugiere que las pentraxinas reconocen la misma región en C1q y que el dominio C-terminal de PTX3 es el sitio de unión de C1q. Estudios *in vitro* han mostrado que PTX3 activa la ruta de complemento clásica.
- 10 Pruebas experimentales y clínicas muestran que anomalías funcionales del complemento se asocian con una mayor propensión a infección por patógenos, demostrando de este modo una función esencial de este sistema inmune innato en la protección contra infecciones (Roos, y col., 2002, Immunobiol., 205: 595-609). En el campo médico, por lo tanto, existe una necesidad fuertemente percibida de fármacos capaces de estimular y amplificar la respuesta inmune para infecciones microbianas mediadas por complemento.
- 15 Además, los expertos en el campo están buscando fármacos que son crecientemente activos y capaces de actuar en sinergia con otros fármacos.

Descripción de la invención

Se ha descubierto ahora sorprendentemente que la retirada de ácido siálico del extremo de la cadena de glucósido o la retirada completa del grupo glucósido de PTX3 produce un aumento altamente significativo en la capacidad de esta proteína para activar la ruta de complemento clásica.

También se ha descubierto que PTX3 desprovisto de ácido siálico (desialidado) y PTX3 desglucosilado son agentes útiles para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas, particularmente de infecciones fúngicas, bacterianas o virales a una dosis inferior que la usada con PTX3 no modificada. También se ha descubierto que PTX3 desprovista de ácido siálico (desialidada) y PTX3 desglucosilada son útiles en la prevención o tratamiento de enfermedades ya tratadas con PTX3 de origen natural, particularmente enfermedades inflamatorias, incluyendo enfermedades autoinmunes, tumores, enfermedades debidas a activación anómala del factor de crecimiento FGF-2, trastornos de la fertilidad femenina, enfermedades de hueso y cartilago y para la preparación de vacunas autólogas para el tratamiento de tumores.

También se ha descubierto que la PTX3 tanto desglucosilada funcionalmente activa como desialidada pueden usarse ventajosamente para la vacunación preventiva contra patógenos, mostrando una tendencia a favorecer una respuesta inmune de tipo adaptativo.

Un objeto de la presente invención es por lo tanto pentraxina PTX3 larga desglucosilada funcionalmente activa.

Otro objeto de la presente invención es la pentraxina PTX3 larga desialidada.

Otro objeto de la presente invención comprende procedimientos para la preparación de las proteínas anteriormente mencionadas.

Otro objeto de la presente invención comprende composiciones farmacéuticas que contienen pentraxina PTX3 desglucosilada funcionalmente activa o desialidada, como el principio activo y al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso de PTX3 larga desglucosilada funcionalmente activa o desialidada, o uno de sus análogos o derivados funcionales, para la preparación de un medicamento capaz de unirse a complemento, particularmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano, fúngico, protozoario o viral.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso de PTX3 larga desglucosilada funcionalmente activa o desialidada como adyuvante para la vacunación preventiva contra patógenos y antígenos.

La invención se desvelará ahora en detalle, también con la ayuda de ejemplos y figuras, en las que:

La Figura 1 muestra la movilidad electroforética de pentraxina funcionalmente activa desglucosilada con Endoglucosidasa F3.

La Figura 2 muestra la movilidad electroforética de pentraxina desialidada con Sialidasa A.

Las Figuras 3A y 3B ilustran el ensayo de unión de pentraxina larga desglucosilada funcionalmente activa y desialidada, respectivamente, a C1q.

La Figura 4 ilustra el ensayo de activación del complemento.

Descripción detallada de la invención

- Lo que se entiende por “la pentraxina PTX3 larga desglucosilada funcionalmente activa o desialidada” es cualquier PTX3, independientemente de su origen natural (humano o no humano) o recombinante. Estas pentraxinas PTX3 se describen en la bibliografía: véase, por ejemplo, las referencias de patente del presente solicitante y las referencias bibliográficas citadas en las mismas.
- La pentraxina PTX3 larga desglucosilada funcionalmente activa o desialidada preferida es la humana, cuya secuencia se desvela en el documento WO 99/32516.
- El procedimiento para la preparación de pentraxina desglucosilada funcionalmente activa comprende la desglucosilación total de pentraxina PTX3 larga.
- La pentraxina PTX3 larga de partida es una proteína conocida y los procedimientos para obtenerla también se conocen.
- Cualquier procedimiento de desglucosilación es adecuado para el fin, a condición de que no induzca ninguna pérdida o alteración sustancial de la actividad de pentraxina.
- En una realización preferida de la invención el procedimiento comprende tratar pentraxina PTX3 larga con la endoglucosidasa EndoF3.
- Como alternativa, la presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de pentraxina PTX3 larga desglucosilada funcionalmente activa que comprende el cultivo de células que expresan pentraxina PTX3 larga en presencia de un inhibidor de glucosilación. Un inhibidor preferido es tunicamicina. Las células que expresan pentraxina se conocen en el campo y pueden obtenerse fácilmente basándose en el conocimiento general del experto en la materia. Los ejemplos de tales células son células transfectadas con el ADNc de PTX3 humana, tales como células CHO (Ovario de Hámster Chino).
- De forma similar, cualquier procedimiento de desialidación proteica es adecuado para el fin, a condición de que el procedimiento no induzca ninguna pérdida o alteración sustancial de la actividad de pentraxina. Un posible ejemplo es el uso de desialidasa A.
- De forma similar, puede usarse cualquier procedimiento de ingeniería proteica adecuado para el fin, tal como, por ejemplo, la producción de PTX3 recombinante mutagenizada por destrucción de los sitios de glucosilación, a condición de que el procedimiento no induzca ninguna pérdida o alteración sustancial de la actividad de pentraxina.
- La presente invención proporciona el uso de pentraxina PTX3 desialidada y desglucosilada funcionalmente activa como un medicamento.
- Lo que se entiende por enfermedad infecciosa es una enfermedad causada por infecciones bacterianas, fúngicas, protozoarias o virales.
- Son ejemplos de enfermedades autoinmunes lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (MS), artritis, diabetes, tiroiditis, anemia hemolítica, orquitis atrófica, enfermedad de Goodpasture, retinopatía autoinmune, trombocitopenia autoinmune, miastenia grave, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica agresiva, colitis ulcerosa, dermatitis, glomerulonefritis crónica, síndrome de Sjögren, síndrome de Reite, miositis, esclerosis sistémica y poliartritis.
- Lo que se entiende por infarto tisular es infarto cardíaco o cerebral.
- Lo que se entiende por tratamiento de fertilidad femenina es cualquier uso de PTX3 desglucosilada funcionalmente activa o desialidada para mejorar la fertilidad de mujeres que requieren dicho tratamiento.
- En particular, la presente invención proporciona el uso de pentraxina PTX3 larga desialidada o desglucosilada funcionalmente activa para la preparación de un medicamento capaz de unirse a complemento.
- Una aplicación preferida se refiere a un medicamento para prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas.
- En particular, el agente infeccioso en dichas enfermedades es una bacteria, hongo, protozoo o virus.
- Una realización preferida de la invención se refiere al hongo *Aspergillus* y particularmente a *Aspergillus fumigatus*.
- Otro aspecto de la invención es un medicamento para el tratamiento de infecciones fúngicas, que comprende una combinación de pentraxina PTX3 larga desialidada o desglucosilada funcionalmente activa y un antifúngico, preferentemente de la clase anfotericina, tal como anfotericina B, particularmente como desoxicolato o en una formulación liposomal. La formulación es un objeto adicional de la presente invención.
- También se ha descubierto que pentraxina PTX3 larga desialidada y/o desglucosilada funcionalmente activa es útil como un adyuvante para la preparación de un medicamento para vacunación preventiva contra patógenos o

antígenos seleccionados y esto constituye un objeto adicional de la presente invención.

La vacuna que contiene la proteína desialidada y/o desglucosilada funcionalmente activa como un adyuvante puede usarse ventajosamente contra un agente patógeno, tal como una bacteria, hongo, protozoo o virus o uno de sus antígenos.

- 5 En una realización preferida de la invención, el agente patógeno es un hongo, particularmente *Aspergillus* y más particularmente, *Aspergillus fumigatus*, así como uno de sus antígenos.

Además de contener pentraxina PTX3 larga desialidada y/o desglucosilada funcionalmente activa como un adyuvante, la vacuna de acuerdo con la presente invención se prepara con procedimientos completamente convencionales conocidos por el experto en la materia y por lo tanto no requiere explicación adicional.

- 10 Se proporcionan a continuación varios ejemplos que ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

Preparación de PTX3 desglucosilada funcionalmente activa

- 15 PTX3, purificada del sobrenadante de células CHO transfectadas de forma estable con el vector plasmídico pSG5hPTX3 que contiene el ADNc humano de PTX3 (como se desvela en Bottazzi, y col., J. Biol. Chem. 1997; 272: 32817-32823), se trató con la endoglucosidasa EndoF3 para la retirada de la cadena glucosídica completa menos el resto de N-acetilglucosamina unido a la asparagina 220.

- 20 En particular, se incubó PTX3 con Endoglucosidasa F3 conocida por su hidrolización selectiva del enlace glucósido β (1 \rightarrow 4) entre los dos restos de GlcNac presentes en el núcleo de oligosacáridos del tipo complejo N-enlazado bi y triantenario. La endoglucosidasa F3 manifiesta su actividad catalítica máxima a valores de pH ácidos. Basándose en las características de solubilidad de PTX3 se optimizó el uso de un tampón fosfato a pH 5,5. La Endoglucosidasa F3 usada en el experimento viene del ADNc de *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* expresado en *E. coli* como proteína recombinante (Sigma Aldrich código E2264). La hidrólisis enzimática de los azúcares de la PTX3 purificada se evaluó por medio de su variación de movilidad electroforética en SDS-PAGE (véase Figura 1). Se añadieron aproximadamente 10 μ g de PTX3 en 7 μ l de agua estéril con 2 μ l de tampón fosfato a pH 5,5 (5x) (NaH₂PO₄ 250 mM) y con 1 μ l de Endoglucosidasa F3 tomada de la solución madre (Sigma Aldrich). La mezcla se incubó a 37 °C durante 12 horas. La reacción puede cambiarse de escala a 1 mg de PTX3.

- 25 La PTX3 desglucosilada funcionalmente activa obtenida de este modo se purificó por cromatografía de filtración en gel (Superose 6 PHARMACIA) para los fines de retirar las enzimas glucosídicas y los azúcares. La filtración en gel de SDS-PAGE se realizó como se desvela en Bottazzi y col., J. Biol. Chem. 1997; 272: 32817-32823

30 Ejemplo 2

Preparación de PTX3 desglucosilada funcionalmente activa

- Las células CHO productoras de PTX3 descritas en el Ejemplo 1 se trataron con un inhibidor de glucosilación de las proteínas, tal como, por ejemplo, tunicamicina (Sigma Aldrich).

- 35 La PTX3 desglucosilada funcionalmente activa obtenida de este modo se purificó como se desvela en Bottazzi y col. J. Biol Chem 1997; 272: 32817-32823.

Cualquier otro procedimiento conocido para la desglucosilación de proteínas o para la producción de proteínas desglucosiladas que no altere su capacidad funcional es adecuado para los fines de la presente invención.

Ejemplo 3

Preparación de PTX3 desialidada

- 40 Se usó PTX3 purificada del sobrenadante de CHO transfectadas de forma estable con el vector plasmídico pSG5h-PTX3 que contenía el ADNc humano de PTX3.

- 45 La PTX3 se trató con Sialidasa A. La Sialidasa A [α (2 \rightarrow 3,6,8,9) neuraminidasa] usada vino del ADNc de *Arthrobacter ureafaciens* expresado en *E. coli* como proteína recombinante (SIGMA Aldrich código N8271). La desialidación de PTX3 también se evaluó por medio de análisis de la variación de su movilidad electroforética por SDS-PAGE (véase Figura 2).

La PTX3 desialidada obtenida de este modo se purificó por cromatografía de filtración en gel (Superose 6 PHARMACIA) para los fines de retirar las enzimas glucosídicas y los azúcares.

Cualquier otro procedimiento conocido para la desialidación de proteínas o para la producción de proteínas desialidadas que no altere su capacidad funcional es adecuado para los fines de la presente invención.

Ejemplo 4Ensayo de unión de PTX3 desglucosilada funcionalmente activa a C1q

5 Se trataron placas Maxisorp (NUNC) con C1q 0,5 µg/ml (CALBIOCHEM) para los fines de absorber la proteína en la superficie interior de los pocillos. Después de lavados posteriores en tampón fosfato (GIBCO) los pocillos se incubaron en tampón fosfato durante 1 hora con PTX3 desglucosilada funcionalmente activa a las dosificaciones indicadas en la Figura 3.

Las cantidades relativas de PTX3 unida a C1q se determinaron usando un anticuerpo policlonal anti-PTX3 biotinilado, Estreptavidina-HRP (PHARMACIA) y tinción con TMB.

10 La PTX3 desglucosilada funcionalmente activa mostró unión a C1q que era aproximadamente 4 veces mayor que la de PTX3 no tratada con glucosidasa (Figura 3A).

Ejemplo 5Ensayo de unión de PTX3 desialidada con C1q

El ensayo de unión de PTX3 desialidada con C1q se realizó en las mismas condiciones experimentales descritas en el ejemplo anterior y a las dosificaciones indicadas en la Figura 3B.

15 En este caso también la PTX3 desialidada mostró unión a C1q que era aproximadamente 2 veces mayor que la de PTX3 no tratada con desialidasa (Figura 3B).

Ejemplo 6Evaluación de la capacidad de PTX3 desialidada para activar la ruta del complemento clásica

20 Se absorbió PTX3 desialidada en placas Maxisorp de 96 pocillos a una concentración de 5 µg/ml (tampón carbonato 0,1 M pH 9,6). Posteriormente, se trataron los pocillos con suero humano (NHS) como una fuente de complemento a diferentes porcentajes de dilución. La cantidad de C4 depositada en las placas como resultado de la activación de complemento se midió usando el anticuerpo anti-C4 (C4-4⁰) como se desvela en Nauta y col. en Eur. J. Immunology, 2003, 33: 465-473.

25 La cantidad de C4 depositado en la plaqueta con PTX3 desialidada adsorbida fue de aproximadamente 8 veces mayor que la de la plaqueta con la PTX3 control adsorbida (Figura 4). El resultado muestra que la PTX3 desialidada es más activa que la PTX3 no modificada en su capacidad de activación del complemento.

Ejemplo 7Evaluación de la capacidad de PTX3 desglucosilada funcionalmente activa para activar la ruta del complemento clásica

30 Se ensayó la PTX3 desglucosilada en las mismas condiciones experimentales usadas para PTX3 desialidada descritas en el Ejemplo 6.

Los resultados obtenidos fueron comprables con los obtenidos con PTX3 desialidada.

35 Con respecto a los aspectos relacionados con la aplicabilidad industrial, la PTX3 desialidada o desglucosilada, o sus derivados peptídicos o peptidomiméticos, estarán en forma de composiciones farmacéuticas en las que los principios activos se solubilizan y/o transportan por excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como agua estéril, carboximetilcelulosa u otros excipientes conocidos por los expertos en la materia.

Los ejemplos de composiciones farmacéuticas que pueden usarse para PTX3 desialidada o desglucosilada funcionalmente activa son los mismos que los desvelados para pentraxina PTX3 larga (en el documento WO 99/32516).

40 Son ejemplos adicionales de composiciones farmacéuticas las que permiten administración oral o parenteral mediante las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, rectal o vaginal. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el fin son comprimidos y cápsulas rígidas o blandas, supositorios, óvulos, polvos, soluciones, suspensiones, jarabes o formas sólidas para la preparación de líquidos extemporáneos. Las composiciones para administración parenteral son, por ejemplo, todas las formas inyectables intramusculares, intravenosas y subcutáneas, en forma de soluciones, suspensiones o emulsiones. También deberían mencionarse las formas liposomales. También se incluyen formas para la liberación controlada del principio activo, como formas de administración oral, comprimidos revestidos con capas apropiadas, polvos microencapsulados, complejos de ciclodextrina, formas de liberación prolongada, por ejemplo subcutáneas o como inyección o implantes de liberación prolongada. Las composiciones para administración de aerosol pueden constituir una forma de administración preferida.

50

La dosis diaria dependerá del criterio del médico de cuidados primarios basándose en el peso, edad y condición general del paciente.

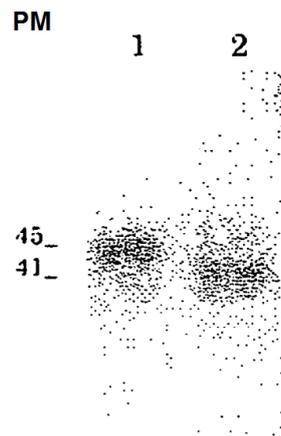
- 5 Debería observarse que la preparación de dichas composiciones farmacéuticas, incluyendo las formas de liberación lenta, pueden realizarse usando las técnicas habituales e instrumentos con los que los farmacéuticos y expertos en tecnología farmacéutica son muy familiares. Como referencia, el experto en el campo puede dirigirse a la bibliografía habitual, tal como, por ejemplo, la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. N. Y. Con respecto a las vacunas, se dirige al lector a la bibliografía específica, por ejemplo, solicitudes de patente internacional WO 03/011903 y PCT/IT03/00162.

REIVINDICACIONES

1. Pentraxina PTX3 larga desglucosilada funcionalmente activa.
2. Pentraxina PTX3 larga desialidada.
- 5 3. Pentraxina PTX3 larga de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es de origen natural humano o no humano o recombinante.
4. Procedimiento de preparación de pentraxina PTX3 larga desglucosilada de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la desglucosilación de pentraxina PTX3 larga.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha desglucosilación se lleva a cabo con endoglucosidasa EndoF3.
- 10 6. Procedimiento para la preparación de pentraxina PTX3 larga desglucosilada de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el cultivo de células que expresan pentraxina PTX3 larga en presencia de un inhibidor de glucosilación.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 en el que dicho inhibidor es tunicamicina.
- 15 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha desglucosilación se obtiene por mutagénesis del sitio de glucosilación de PTX3.
9. Procedimiento para la preparación de pentraxina PTX3 larga desialidada de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende la desialidación de pentraxina PTX3 larga.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha desialidación se lleva a cabo con Sialidasa A.
- 20 11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en el que la pentraxina PTX3 larga desglucosilada es purificada.
12. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en el que la pentraxina PTX3 larga desialidada es purificada.
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que dicha purificación se realiza por cromatografía de filtración en gel.
- 25 14. Composición farmacéutica que contiene pentraxina PTX3 larga desglucosilada de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 en una mezcla con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Composición farmacéutica que contiene pentraxina PTX3 larga desialidada de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 en una mezcla con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 16. Uso de pentraxina PTX3 larga desglucosilada de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 o de pentraxina larga desialidada de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para la preparación de un medicamento.
17. Uso de pentraxina PTX3 larga desglucosilada de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 o de pentraxina larga desialidada de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para la preparación de un medicamento capaz de unirse a complemento.
- 35 18. Uso de pentraxina PTX3 larga desglucosilada de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 o de pentraxina larga desialidada de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades en las que el uso de pentraxina PTX3 larga está indicado.
19. Uso de pentraxina PTX3 larga desglucosilada de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 o de pentraxina larga desialidada de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas.
- 40 20. Uso de pentraxina PTX3 larga desglucosilada de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 o de pentraxina larga desialidada de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluyendo enfermedades autoinmunes, tumores, enfermedades debidas a activación anómala del factor de crecimiento FGF-2, trastornos de fertilidad femenina, infarto tisular y enfermedades de hueso o cartílago.
- 45 21. Uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicha enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (MS), artritis, diabetes, tiroiditis, anemia hemolítica, orquitis atrófica, enfermedad de Goodpasture, retinopatía autoinmune, trombocitopenia autoinmune, miastenia grave, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica agresiva, colitis ulcerosa, dermatitis, glomerulonefritis crónica, síndrome de Sjögren, síndrome de Reiter, miositis, esclerosis sistémica y poliartritis.

22. Uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicho infarto tisular se selecciona del grupo que consiste en infarto cardíaco y cerebral.
23. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que en dichas enfermedades el agente infeccioso es una bacteria, hongo, protozoo o virus.
- 5 24. Uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicho hongo es un *Aspergillus*.
25. Uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que dicho hongo es *Aspergillus fumigatus*.
26. Combinación de pentraxina PTX3 larga desglucosilada funcionalmente activa y/o pentraxina PTX3 larga desialidada con un agente antifúngico.
- 10 27. Combinación de acuerdo con la reivindicación 26 en la que dicho agente antifúngico pertenece a la clase de anfotericina.
28. Combinación de acuerdo con la reivindicación 27 en la que dicha anfotericina es anfotericina B, particularmente como desoxicolato o en formulación liposomal.
29. Composición farmacéutica que contiene la combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26-28 en una mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 30. Uso de la combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26-28 para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de infecciones fúngicas.
31. Uso de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el hongo en dicha infección es un *Aspergillus*.
32. Uso de acuerdo con la reivindicación 31, en el que dicho hongo es *Aspergillus fumigatus*.
- 20 33. Uso de pentraxina PTX3 larga desglucosilada de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 o de pentraxina PTX3 larga desialidada de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 como un adyuvante para la preparación de un medicamento para vacunación preventiva contra patógenos o antígenos.
34. Uso de acuerdo con la reivindicación 33, en el que dicho patógeno es una bacteria, hongo, protozoo o virus o dicho antígeno deriva de una bacteria, hongo, protozoo o virus.
- 25 35. Uso de acuerdo con la reivindicación 34, en el que dicho hongo es *Aspergillus fumigatus* o dicho antígeno deriva de *Aspergillus fumigatus*.
36. Vacuna **caracterizada porque** contiene pentraxina PTX3 larga desialidada y/o desglucosilada funcionalmente activa como un adyuvante.

FIGURA 1



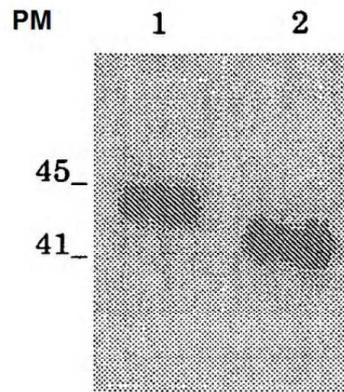
Leyenda:

PM = Peso molecular

1 = PTX3 glucosilada

2 = PTX3 desglucosilada con Endoglucosidasa F3

FIGURA 2



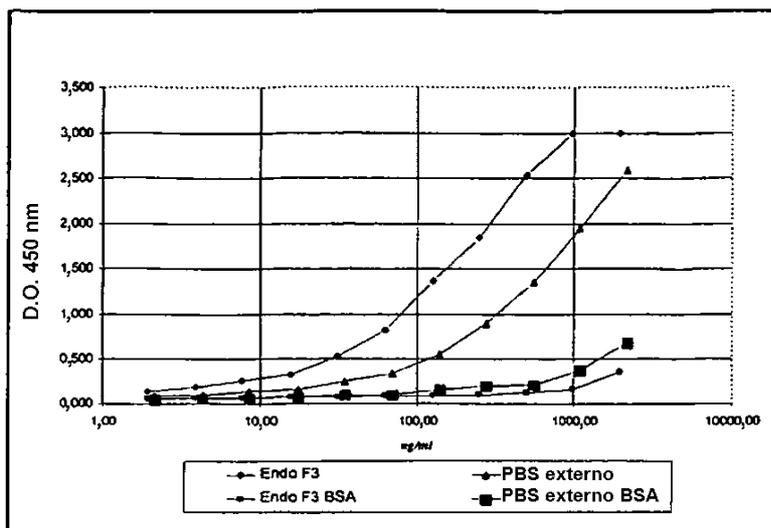
Leyenda:

PM = Peso molecular

1 = PTX3 glucosilada

2 = PTX3 desialidada con Sialidasa A

FIGURA 3A



LEYENDA para la Figura 3A: Ensayo de unión de PTX3 con C1q.

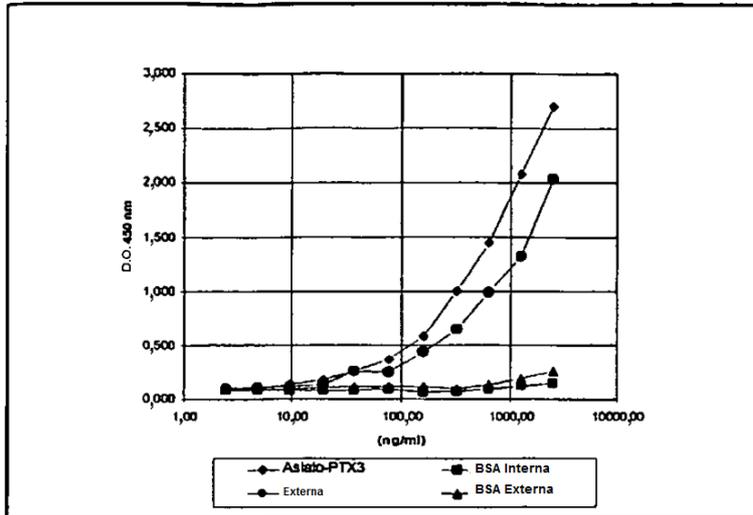
Endo F3: PTX3 totalmente desglucosilada con Endo F3;

Endo F3 BSA: albúmina de suero bovino tratada con Endo F3;

PBS Externo: PTX3 no modificada;

PBS Externo BSA: albúmina de suero bovino no sometida a tratamiento con Endo F3.

FIGURA 3B



LEYENDA para la Figura 3B: Ensayo de unión de PTX3 con C1q.

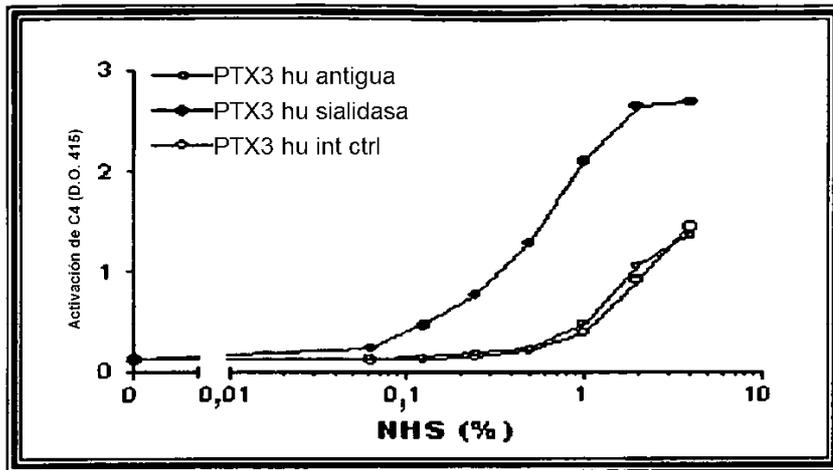
Asialo PTX3: PTX3 desialidada;

Externa: PTX3 no modificada;

BSA Interna: albúmina de suero bovino tratada con Sialidasa;

BSA Externa: albúmina de suero bovino no tratada con Sialidasa.

FIGURA 4



LEYENDA para la Figura 4: Ensayo de activación del complemento medida como deposición de C4.

PTX3 hu antigua: PTX3 no modificada;

PTX3 hu sialidasa: PTX3 desialidada;

PTX3 hu int ctrl: PTX3 tratada con los mismos tampones y en las mismas condiciones de temperatura que PTX3 desialidada, pero no tratada con Sialidasa A.