

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 900**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 25/02** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2007 E 07804199 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2012 EP 2061485**

54 Título: **Péptidos EV576 para su uso en el tratamiento del síndrome de Guillain-Barré**

30 Prioridad:

**08.09.2006 GB 0617734**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.03.2013**

73 Titular/es:

**VARLEIGH IMMUNO PHARMACEUTICALS (VIP)  
LTD (100.0%)  
Landmark Fiduciaire (Suisse) SA, 6 Place des  
Eaux-Vives, Case Postale 3461  
1211 Geneva 3, CH**

72 Inventor/es:

**HAMER, JOHN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 397 900 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

Péptidos EV576 para su uso en el tratamiento del síndrome de Guillain-Barré

La presente invención se refiere al uso de agentes como se reivindica en las reivindicaciones 1-11.

**Antecedentes de la invención**

5 El sistema del complemento es una parte esencial del mecanismo de defensa natural del organismo contra la invasión de cuerpos extraños y también está implicado en el proceso inflamatorio. Más de 30 proteínas en el suero y en la superficie celular están implicadas en la función y regulación del sistema del complemento. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que, al igual que los ~ 35 componentes conocidos del sistema del complemento que pueden asociarse con procesos beneficiosos y patológicos, el propio sistema del complemento interacciona al menos con 85  
10 rutas biológicas con funciones tan diversas como angiogénesis, activación plaquetaria, metabolismo de glucosa y espermatogénesis [1].

El sistema del complemento se activa por la presencia de antígenos extraños. Existen tres vías de activación: (1) la vía clásica que se activa por complejos de IgM e IgG o por reconocimiento de carbohidratos; (2) la vía alternativa que se activa por superficies no propias (desprovistas de moléculas reguladoras específicas) y por endotoxinas bacterianas; y (3) la vía de la lectina que se activa por la unión de lectina que une manosa (MBL, mannose-binding lectin) a restos de manosa en la superficie de un patógeno. Las tres vías comprenden cascadas de sucesos en paralelo que dan como resultado la producción de la activación del complemento a través de la formación de C3 y C5 convertasas similares en la superficie celular dando como resultado la liberación de mediadores de inflamación aguda (C3a y C5a) y la formación de un complejo de ataque a la membrana (CAM). En la Figura 1 se muestran las cascadas en paralelo implicadas en las vías clásica y alternativa.  
15  
20

En determinadas circunstancias el complemento puede activarse de manera no apropiada lo que conduce a una destrucción tisular local no deseable. Se ha demostrado que la activación no apropiada del complemento desempeña una función en una amplia diversidad de enfermedades y trastornos incluyendo pancreatitis aguda, enfermedad de Alzheimer, encefalomiелitis alérgica, alotrasplante, asma, síndrome de distrés respiratorio en adultos, lesiones por quemaduras, enfermedad de Crohn, glomerulonefritis, anemia hemolítica, hemodiálisis, angioedema hereditario, lesiones por isquemia-reperfusión, disfunción sistémica orgánica múltiple, esclerosis múltiple, miastenia grave, ictus isquémico, infarto de miocardio, soriasis, artritis reumatoide, choque séptico, lupus eritematoso sistémico, ictus, síndrome de filtración vascular, rechazo de trasplante y respuestas inmunitarias inapropiadas en cirugías de derivación cardiopulmonar. De esta manera, la activación no apropiada del sistema del complemento ha sido una diana para la intervención terapéutica durante muchos años y numerosos inhibidores del complemento que dirigen diferentes partes de la cascada del complemento se encuentran en desarrollo para su uso terapéutico.  
25  
30

En el ictus isquémico y en el infarto de miocardio, el cuerpo reconoce como extraño el tejido muerto en el cerebro o en el corazón y activa el complemento ocasionando más daño local. De manera similar, en cirugías de derivación cardiopulmonar, el cuerpo reconoce como extrañas las superficies plásticas de los aparatos, activa el complemento y puede dar como resultado daño vascular. En enfermedades autoinmunes, el cuerpo puede, erróneamente, reconocerse así mismo como extraño y activar el complemento con daño tisular local (por ejemplo destrucción de articulaciones en artritis reumatoide y debilidad muscular en miastenia grave).  
35

En el sistema nervioso periférico, diversos tipos de neuropatía son en origen autoinmunes y se han detectado anticuerpos circulantes contra mielina y células de Schwann [2]. El complemento está implicado como un efector en la desmielinización inflamatoria observada en un modelo de neuritis alérgica experimental (NAE) para el síndrome de Guillain-Barré, una neuropatía desmielinizante humana adquirida mediada inmunológicamente [3].  
40

Los trastornos del sistema nervioso periférico pueden ser crónicos y aparecen muy lentamente durante diversos meses o años. Un ejemplo de una enfermedad de este tipo es la polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, conocida como PDIC. Algunas veces los trastornos del sistema nervioso periférico son agudos y aparecen rápidamente durante algunos años, por ejemplo la polirradiculoneuropatía desmielinizante post-infecciosa, conocida mejor como síndrome de Guillain-Barré (SGB). Antiguamente, la PDIC se conocía "SGB crónico" y se consideraba como una afección relacionada con el SGB.  
45

El SGB es una afección poco frecuente (la prevalencia es de 1-2 por 100.000 o ~3.000 casos en los Estados Unidos al año). Aproximadamente la mitad de los casos del SGB se producen después de una infección bacteriana o viral. El SGB es un trastorno autoinmune en el que el organismo produce anticuerpos que dañan la vaina de mielina que rodea los nervios periféricos. La vaina de mielina es una sustancia adiposa que rodea los axones, que aumenta la velocidad a la cual viajan las señales a lo largo de los nervios.  
50

Una vez que estos anticuerpos reaccionan con el antígeno (la vaina de mielina) el sistema del complemento se activa y se produce C5. C5 se degrada a C5a y C5b que se convierte en C5b-9 (el complejo de ataque a la membrana). C5a atrae a los leucocitos y C5b-9 abre las paredes de los vasos sanguíneos para permitir que los leucocitos penetren en los tejidos. Los leucocitos adecuadamente estimulados liberan citocinas destructoras causando daño local a los nervios.  
55

Clínicamente, el SGB se caracteriza por debilidad y entumecimiento u hormigueo en las piernas y brazos, y por una posible pérdida de movimiento y sensibilidad en las piernas, brazos, parte superior del cuerpo y rostro. Los primeros síntomas del SGB son normalmente el entumecimiento u hormigueo (parestesia) en los pies y en los dedos, con debilidad progresiva en los brazos y piernas en los siguientes días. Algunos pacientes padecen sólo parestesia en sus pies y piernas; otros solo padecen los síntomas en un lado del cuerpo.

Los síntomas pueden permanecer en esta fase, produciendo solo una leve dificultad al caminar, necesitando muletas o un bastón para caminar. Sin embargo, algunas veces la enfermedad avanza, conduciendo a una parálisis completa de las piernas y brazos. Aproximadamente una cuarta parte del tiempo, la parálisis continúa hasta el pecho y paraliza los músculos respiratorios, llevando al paciente a depender de un respirador. Si los músculos de la deglución también se ven afectados, puede necesitarse una sonda.

El SGB se considera una emergencia médica y la mayoría de los pacientes ingresan en cuidados intensivos rápidamente después del diagnóstico. Aunque el SGB puede mejorar espontáneamente, existen diversos tratamientos que facilitan la recuperación. La mayoría de los pacientes con SGB y PDIC se tratan con plasmaféresis (intercambio de plasma sanguíneo) o con grandes dosis de inmunoglobulina. En casos extremos se ha usado la filtración del líquido cefalorraquídeo. La ventilación, la plasmaféresis y la inmunoglobulina son extremadamente costosas.

Por tanto hay una gran necesidad de agentes que mejoren los tratamientos actualmente disponibles para trastornos del sistema nervioso periférico tales como la PDIC y el SGB.

### **Sumario de la invención**

La invención proporciona un agente que se une al complemento C5 para su uso en el tratamiento o prevención de una polirradiculoneuropatía desmielinizante post-infecciosa (síndrome de Guillain Barré), en el que el agente que se une a C5 es una proteína que comprende o consiste en los aminoácidos 19 a 168 de la secuencia de aminoácidos indicada en la Figura 2 o es un homólogo o fragmento del mismo que conserva su capacidad para unirse a C5.

La polirradiculoneuropatía desmielinizante post-infecciosa (síndrome de Guillain Barré), también denominada SGB en el presente documento, de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en, síndrome de Miller Fisher, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (PDIA), polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC).

Preferentemente, el SGB es una polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

Preferentemente, el agente actúa impidiendo la escisión del complemento C5 por la C5 convertasa en el complemento C5a y en el complemento C5b-9.

La proteína del complemento C5, denominado también en el presente documento C5, se escinde por la enzima C5 convertasa, en si misma formada a partir de C3a, en un producto anterior de la vía alternativa (Figura 1). Los productos de esta escisión incluyen una anafilatoxina C5a y un complejo lítico C5b-9 conocido también como complejo de ataque a la membrana (CAM). C5a es un péptido muy reactivo implicado en muchos procesos inflamatorios patológicos incluyendo quimiotaxis de neutrófilos y eosinófilos, activación de neutrófilos, permeabilidad capilar aumentada e inhibición de apoptosis de neutrófilos [4].

El CAM está asociado con otros procesos patológicos importantes que incluyen artritis reumatoide [5;6], glomerulonefritis proliferativa [7], nefropatía membranosa idiopática [8], proteinuria [9], desmielinización después de lesión axonal aguda [10] y es también responsable de rechazo de injerto agudo después de xenotrasplante [11].

C5a se ha convertido en una diana de interés particular en el campo de los trastornos asociados con el complemento [12]. Aunque C5a presenta muchas asociaciones patológicas bien reconocidas, los efectos de su reducción en seres humanos parecen estar limitados. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales y moléculas pequeñas que se unen e inhiben a C5a o a receptores de C5a para tratar diversas enfermedades autoinmunes. Sin embargo, estas moléculas no impiden la liberación del CAM.

Por el contrario, la administración de un agente que se una a C5, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, inhibe la formación tanto del péptido C5a como del CAM. Sorprendentemente, se ha descubierto que la inhibición tanto de C5a como del CAM reduce los síntomas clínicos asociados con trastornos en el sistema nervioso periférico. Adicionalmente, como el C5 es un producto posterior de las vías clásica y alternativa del complemento, la inhibición de C5 está menos probablemente asociada con riesgos de infección concomitante que existen cuando se dirigen a productos anteriores en la cascada [13].

La capacidad de un agente para unirse a C5 puede determinarse mediante ensayos convencionales *in vitro* conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante transferencia de western después de incubación de la proteína sobre el gel con C5 marcado. Preferentemente, el agente de acuerdo con la invención se une a C5 con un valor de  $CI_{50}$  menor de 0,2 mg/ml, preferentemente menor de 0,1 mg/ml, preferentemente menor de 0,05 mg/ml, preferentemente menor de 0,04 mg/ml, preferentemente menor de 0,03 mg/ml, preferentemente 0,02 mg/ml, preferentemente menor

de 1 µg/ml, preferentemente menor de 100 ng/ml, preferentemente menor de 10 ng/ml, más preferentemente aún, menor de 1 ng/ml.

5 Preferentemente, el agente que se une a C5 deriva de un artrópodo hematófago. La expresión "artrópodo hematófago" incluye a todos los artrópodos que se alimentan de sangre de un huésped apropiado, tales como insectos, garrapatas, piojos, pulgas y ácaros. Preferentemente, el agente deriva de una garrapata, preferentemente de la garrapata *Ornithodoros moubata*.

10 El agente que se une a C5 es una proteína que comprende los aminoácidos 19 a 168 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2 o es un homólogo o un fragmento de esta proteína que conserva su capacidad para unirse a C5. El agente que se une a C5 puede ser una proteína que consiste en los aminoácidos 19 a 168 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2 o puede ser un homólogo o un fragmento de esta proteína que conserva su capacidad para unirse a C5.

15 De acuerdo con una realización alternativa, la proteína usada de acuerdo con esta realización de la invención puede comprender o consistir en los aminoácidos 1 a 168 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2 o puede ser un homólogo o un fragmento de la misma que conserva su capacidad para unirse a C5. Los primeros 18 aminoácidos de la secuencia de la proteína proporcionada en la Figura 2 forman una secuencia de señal que no es necesaria para la actividad de unión a C5 y por tanto pueden suministrarse opcionalmente, por ejemplo, para determinar la eficacia de la producción de la proteína recombinante.

20 La proteína que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2, denominada también como proteína EV576 en el presente documento, se aisló de las glándulas salivares de la garrapata *Ornithodoros moubata*. La proteína EV576 es un miembro lejano de la familia de las lipocalinas y es el primer miembro de la familia de las lipocalinas que demuestra inhibir la activación del complemento. La proteína EV576 inhibe las vías alternativa, clásica y de la lectina del complemento uniéndose a C5 e impidiendo su escisión, mediante la C5 convertasa, en el Complemento C5a y Complemento C5b - 9, inhibiendo así la acción tanto del péptido C5a como la del CAM. La expresión "proteína EV576", como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia proporcionada en la Figura 2 con o sin la secuencia de señal.

25 La proteína EV576 y la capacidad de esta proteína para inhibir la activación del complemento se ha descrito [19], en el que la proteína EV576 se denomina "proteína Om-CI". Ahora se ha descubierto que la proteína EV576 es sorprendentemente eficaz en el tratamiento y prevención del SGB. Los datos presentados en el presente documento demuestran que la proteína EV576 reduce el grado de enfermedad clínica incluso cuando se proporciona durante la fase de enfermedad activa en neuritis autoinmune experimental (NAE) en ratas. La proteína EV576 representa así una posible terapia humana para el tratamiento y prevención del SGB.

30 La sorprendente eficacia de EV576 en el tratamiento del SGB parece deberse al hecho de que actúa uniéndose a C5, inhibiendo así la formación de C5a y del CAM.

35 Se ha demostrado que la proteína EV576 se une a C5 e impide su escisión por la C5 convertasa en suero de rata, de ratón y de ser humano, con un valor de  $CI_{50}$  de aproximadamente 0,2 mg/ml. Preferentemente, equivalentes funcionales de la proteína EV576 que conservan la capacidad de unirse a C5 con valores de  $CI_{50}$  menores de 0,2 mg/ml, preferentemente menores de 0,1 mg/ml, preferentemente menores de 0,05 mg/ml, preferentemente menores de 0,02 mg/ml, preferentemente menores de 1 µg/ml, preferentemente menores de 100 ng/ml, preferentemente menores de 10 ng/ml, más preferentemente aún, menores de 1 ng/ml. Homólogos y fragmentos de la proteína EV576 conservan su capacidad para unirse a C5 e impedir la escisión del complemento C5 por la C5 convertasa en el complemento C5a y en el complemento C5b-9.

40 El término "homólogo" pretende incluir referencias con respecto a parálogos y ortólogos de la secuencia de la proteína EV576 que se identifica explícitamente en la Figura 2, incluyendo, por ejemplo, la secuencia de la proteína EV576 de otras especies de garrapatas, que incluyen *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *A. americanum*, *A. cajennense*, *A. hebraeum*, *Boophilus microplus*, *B. annulatus*, *B. decoloratus*, *Dermacentor reticulatus*, *D. andersoni*, *D. marginatus*, *D. variabilis*, *Haemaphysalis inermis*, *Ha. leachii*, *Ha. punctata*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Hy. dromedarii*, *Hy. marginatum marginatum*, *Ixodes ricinus*, *L. persulcatus*, *L. scapularis*, *L. hexagonus*, *Argas persicus*, *A. reflexus*, *Ornithodoros erraticus*, *O. moubata moubata*, *O. m. porcinus* y *O. savignyi*. El término "homólogo" también pretende incluir la secuencia equivalente de la proteína EV576 de especies de mosquitos, incluyendo los géneros *Culex*, *Anopheles* y *Aedes*, particularmente *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae*; especies de pulgas, tales como *Ctenocephalides felis* (la pulga del gato); tábanos; moscas de arena; moscas negras; moscas del sueño; piojos; ácaros; sanguijuelas y platelmintos. Se piensa que la proteína EV576 natural se encuentra en *O. moubata* en otras tres formas de aproximadamente 18 kDa y el término "homólogo" pretende incluir estas formas alternativas de EV576.

55 Los expertos en la materia conocerán procedimientos para la identificación de homólogos de la secuencia de EV576 proporcionada en la Figura 2. Por ejemplo, pueden identificarse homólogos mediante la búsqueda de homología de bases de datos de secuencias tanto públicas como privadas. De manera conveniente, pueden usarse bases de datos disponibles públicamente, aunque serán igualmente útiles las bases de datos privadas o las que se

encuentran disponibles en el mercado, particularmente si contienen datos no representados en las bases de datos públicas. Las bases de datos principales son lugares donde se depositan los datos principales de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos y pueden estar disponibles pública o comercialmente. Los ejemplos de bases de datos principales disponibles públicamente incluyen la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), la base de datos EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), la base de datos DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), la base de datos de proteínas SWISS-PROT (<http://expasy.hcuge.ch/>), las bases de datos PIR (<http://pir.georgetown.edu/>), TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), TIGR (véase <http://www.tigr.org/tdb/index.html>), la base de datos NRL-3D (<http://www.nbrfa.georgetown.edu/>), la Base de Datos de Proteínas (<http://www.rcsb.org/pdb/>), la base de datos NRDB (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/nrdb/README>), la base de datos OWL (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/OWL/>) y las bases de datos secundarias PROSITE (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>), PRINTS (<http://iupab.leeds.ac.uk/bmb5dp/prints.html>), Profiles ([http://ulrec3.unil.ch/software/PFSCAN\\_form.html](http://ulrec3.unil.ch/software/PFSCAN_form.html)), Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam/>), Identify (<http://dna.stanford.edu/identify/>) y las bases de datos Blocks (<http://www.blocks.fhcrc.org>). Los ejemplos de bases de datos disponibles en el comercio o privadas incluyen PathoGenome (Genome Therapeutics Inc.) y PathoSeq (Incyte Pharmaceuticals Inc.).

Típicamente, se considera que una identidad mayor del 30% entre dos polipéptidos (preferentemente, sobre una región especificada tal como el sitio activo) es una señal de equivalencia funcional y por tanto una señal de que dos proteínas son homólogas. Preferentemente, las proteínas que son homólogas tienen un grado de identidad de secuencia con la secuencia de la proteína EV576, identificada en la Figura 2, mayor del 60%. Los homólogos más preferidos tienen grados de identidad mayores del 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99%, respectivamente con la secuencia de la proteína EV576 proporcionada en la Figura 2. El porcentaje de identidad, contemplado en el presente documento, se determina usando el programa BLAST, versión 2.1.3, utilizando los parámetros por defecto especificados por el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [matriz Blosum 62; penalización por apertura de hueco=11 y penalización por extensión de hueco=1].

Los homólogos de la secuencia de la proteína EV576, proporcionada en la Figura 2, incluyen mutantes que contienen sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos de la secuencia de tipo silvestre, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 o más aminoácidos, siempre que dichos mutantes conserven la capacidad de unirse a C5. Por tanto, los mutantes incluyen proteínas que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas que no afectan a la función o actividad de la proteína de una manera adversa. Este término también pretende incluir variantes biológicas naturales (por ejemplo, variantes alélicas o variaciones geográficas dentro de especies a partir de las cuales derivan las proteínas EV576). También pueden diseñarse mutantes con capacidad mejorada para unirse a C5 a través de mutación sistemática o dirigida de restos específicos en la secuencia de la proteína.

Los fragmentos de la proteína EV576 y de homólogos de la proteína EV576 conservan la capacidad de unirse a C5. Los fragmentos pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos derivados de la secuencia de la proteína EV576 que tienen menos de 150 aminoácidos, menos de 125 aminoácidos, menos de 100 aminoácidos, menos de 75 aminoácidos, menos de 50 aminoácidos o incluso 25 aminoácidos o menos, siempre que estos fragmentos conserven la capacidad de unirse al complemento C5. Como fragmentos de este tipo no solo se incluyen fragmentos de la proteína EV576 de *O. moubata*, que se identifica explícitamente en el presente documento en la Figura 2, sino también fragmentos de homólogos de esta proteína, como se ha descrito anteriormente. Tales fragmentos de homólogos poseerán típicamente una identidad mayor del 60% con fragmentos de la secuencia de la proteína EV576 proporcionada en la Figura 2, aunque fragmentos más preferidos de homólogos presentarán grados de identidad mayores del 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99%, respectivamente con fragmentos de la secuencia de la proteína EV576 proporcionada en la Figura 2. Los fragmentos con mejora pueden, por supuesto, diseñarse de manera razonable por mutación sistemática o fragmentación de la secuencia de tipo silvestre seguido de ensayos de actividad apropiados. Los fragmentos pueden presentar afinidad similar o mayor para C5 como EV576 y pueden tener el mismo valor, o mayor, de  $CI_{50}$  para C5.

Un homólogo o fragmento de la proteína EV576 que conserva su capacidad de unirse a C5 usado de acuerdo con la invención puede ser una proteína de fusión, obtenida, por ejemplo, clonando un polinucleótido que codifica la proteína EV576 en fase de lectura con respecto a las secuencias codificantes para una secuencia de proteína heteróloga. Cuando en el presente documento se utiliza el término "heterólogo", pretende designar cualquier polipéptido que no sea la proteína EV576 o su homólogo o fragmento. A continuación se indican ejemplos de secuencias heterólogas, que pueden estar comprendidas en las proteínas de fusión solubles tanto en el extremo N como en el extremo C: dominios extracelulares de proteínas unidos a membrana, regiones constantes de inmunoglobulina (región Fc), dominios de multimerización, dominios de proteínas extracelulares, secuencias de señal, secuencias exportadoras, o secuencias que permiten la purificación por cromatografía de afinidad. Muchas de estas secuencias heterólogas se encuentran disponibles comercialmente en plásmidos de expresión ya que estas secuencias normalmente se incluyen en las proteínas de fusión para proporcionar propiedades adicionales sin deteriorar significativamente la actividad biológica específica de la proteína fusionada con éstas [14]. Son ejemplos de dichas propiedades adicionales, una semivida más prolongada en los líquidos corporales, la localización extracelular o un procedimiento de purificación más fácil según lo permitido por un marcador tal como un marcador de histidina o de HA.

La proteína EV576 y sus homólogos o fragmentos, pueden prepararse de manera recombinante mediante la expresión en una célula huésped. Dichos procedimientos de expresión son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen con detalle en [15] y [16]. Las formas recombinantes de la proteína EV576 y sus homólogos o fragmentos, son preferentemente formas no glicosiladas.

5 Las proteínas y fragmentos de la presente invención también pueden prepararse usando técnicas convencionales de química de proteínas. Por ejemplo, los fragmentos de proteína pueden prepararse por síntesis química. Los procedimientos para la generación de proteínas de fusión son convencionales en la técnica y serán conocidos por el lector cualificado. Por ejemplo, en [15] o [17] pueden encontrarse la mayoría de las técnicas generales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunológicas.

10 El sujeto al cual se administra el agente que se une a C5 en el procedimiento o uso de la invención es preferentemente un mamífero, preferentemente un ser humano. El sujeto al cual se administra el agente que se une a C5 también puede padecer una enfermedad adicional con la que esté asociado el SGB.

15 El agente se administra en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de agente que es necesaria para tratar o mejorar una enfermedad diana. La expresión "cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de agente que es necesaria para prevenir una enfermedad diana.

20 Preferentemente, la dosis del agente es suficiente para unirse tanto como sea posible en función de la cantidad de C5 que esté disponible en el sujeto, más preferentemente, toda la cantidad de C5 disponible. Preferentemente, la dosis administrada del agente es al menos dos veces la dosis molar necesaria para unir toda la cantidad de C5 disponible en el sujeto. La dosis administrada del agente puede ser 2,5 veces, 3 veces o 4 veces la dosis molar necesaria para unir toda la cantidad de C5 disponible en el sujeto. Preferentemente, la dosis es de 0,0001 mg/kg (masa de fármaco en comparación con la masa del paciente) a 20 mg/kg, preferentemente de 0,001 mg/kg a 10 mg/kg y más preferentemente de 0,1 mg/kg a 1 mg/kg.

25 La frecuencia a la cual se requiere administrar la dosis dependerá de la semivida del agente implicado. Cuando el agente es la proteína EV576 o un homólogo o fragmento de la misma, la dosis puede administrarse como una infusión continua, en dosis embolada o diariamente, dos veces al día o cada dos, tres, cuatro días, cinco, seis, siete, 10, 15 ó 20 días o más.

30 La dosificación exacta y la frecuencia de dosis también pueden depender del estado del paciente en el momento de la administración. Los factores que pueden tenerse en cuenta al determinar la dosificación incluyen, la gravedad de la patología en el paciente, la salud general del paciente, la edad, peso, sexo, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinaciones de fármacos, sensibilidad de la reacción y la tolerancia o la respuesta del paciente a la terapia.

La cantidad exacta puede determinarse por experimentación rutinaria, pero en última instancia puede determinarse en función del criterio del médico tratante.

35 El agente se administrará generalmente como parte de un transportador farmacéuticamente aceptable. La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, incluye genes, polipéptidos, anticuerpos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y partículas virales inactivas o incluso cualquier otro agente, siempre que el transportador no induzca de por sí efectos de toxicidad u ocasione la producción de anticuerpos que sean dañinos para el individuo que recibe la composición farmacéutica. Los transportadores farmacéuticamente aceptables también pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, etanol o sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH y similares. El transportador farmacéutico empleado variará por tanto dependiendo de la vía de administración. Los transportadores pueden permitir que las composiciones farmacéuticas se formulen en comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones para facilitar la toma por parte del paciente. Un análisis meticuloso sobre transportadores farmacéuticamente aceptables se encuentra disponible en [18].

40 El agente puede administrarse mediante cualquier vía de administración conocida. El agente puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o puede administrarse en el espacio intersticial de un tejido). Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas, agujas e hipopulverizaciones.

En una realización, el agente se administra por vía intravenosa a una dosis de 13 mg/kg seguido de una dosis cada 12 horas de 4 mg/kg por vía intraperitoneal.

55 El agente que se une a C5 puede administrarse solo o como parte de un régimen de tratamiento que también implique la administración de otros fármacos normalmente usados en el tratamiento de pacientes con SGB. Por ejemplo, el agente puede administrarse en combinación con la infusión de inmunoglobulina o en combinación con tratamiento de plasmaféresis. Las combinaciones de tratamientos farmacológicos pueden tener un efecto aditivo o

sinérgico sobre el tratamiento de la enfermedad.

Por tanto, para su uso en terapia, la invención proporciona - (i) un agente que se une a C5, preferentemente la proteína EV576 o un homólogo o fragmento de la misma, y (ii) inmunoglobulina.

5 La invención también proporciona el uso de - (i) un agente que se une a C5, preferentemente la proteína EV576 o un homólogo o fragmento y (ii) inmunoglobulina, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del SGB.

El agente que se une a C5 puede administrarse con el otro fármaco (o fármacos) de manera simultánea, secuencial o por separado. Por ejemplo, el agente que se une a C5 puede administrarse antes o después de la administración del otro fármaco (o fármacos).

10 La invención proporciona así el uso de un agente que se une a C5, preferentemente la proteína EV576 o un homólogo o fragmento de la misma, para su uso en un sujeto el tratamiento del SGB, en el que dicho sujeto se ha tratado previamente con una inmunoglobulina. La invención también proporciona el uso de una inmunoglobulina para su uso en un sujeto en el tratamiento del SGB en el que dicho sujeto se ha tratado previamente con un agente que se une a C5, preferentemente la proteína EV576 o un homólogo o fragmento de la misma.

15 El agente que se une a C5 también puede administrarse como parte de un régimen de tratamiento que también implica la administración de otros fármacos normalmente usados en el tratamiento de otras enfermedades con las que el SGB está asociado. El agente que se une a C5 puede administrarse con el otro fármaco (o fármacos) de manera simultánea, secuencial o por separado. Por ejemplo, el agente que se une a C5 puede administrarse antes o después de la administración del otro fármaco (o fármacos).

#### **Breve descripción de las Figuras:**

20 **Figura 1:** Diagrama esquemático de las vías clásica y alternativa de la activación del complemento. Los componentes enzimáticos se indican en color gris oscuro. Las anafilatoxinas se incluyen en estrellas radiantes.

**Figura 2:** Secuencia primaria de EV576. La secuencia de señal se indica subrayada. Los restos de cisteína se indican en negrita. En la parte derecha se indica el número de nucleótidos y de aminoácidos.

25 **Figura 3:** Purificación de EV576 a partir de extractos de glándulas salivales (EGS). A) Cromatografía de intercambio aniónico. B) Ensayo hemolítico clásico de fracciones. C) SDS-PAGE reductora. D) RP-HPLC.

**Figura 4:** Mecanismo de acción de EV576. A) Sin efecto sobre la producción de C3a. B) Impide la producción de C5a. C) Se une directamente a C5.

**Figura 5:** EV576 recombinante. A) La proteína EV576 recombinante (rEV576) inhibe el complemento de manera tan eficaz como la proteína EV576 natural. B) Estructura de EV576.

30 **Figura 6:** Efecto de rEV576 en un modelo de neuritis autoinmune experimental. A) Pérdida de peso en animales tratados con rEV576 en comparación con animales control. B) Puntuaciones clínicas en animales tratados con rEV576 en comparación con animales control.

#### **Ejemplos**

##### **1. Mecanismo de acción y concentración inhibidora**

35 La proteína EV576 se purificó a partir de extractos de glándulas salivares de la garrapata blanda *Ornithodoros moubata* por SDS-PAGE y RP-HPLC de fracciones de extractos de glándulas salivares que se observó que contenían actividad inhibidora del complemento mediante ensayos hemolíticos clásicos (Figura 3) como se desvela en [19].

40 La proteína EV576 inhibe las vías tanto clásica como alternativa de seres humanos y cobayas. En la rata no tiene efecto sobre la producción de C3a (Figura 4A) pero impide la escisión de C5a a partir de C5 (Figura 4B).

La capacidad de EV576 para inhibir las vías tanto clásica como alternativa del complemento se debe a la unión de la molécula al complemento C5, el precursor de C5a y C5b – 9. La proteína EV576 se une directamente a C5 (Figura 4C) con un valor de  $Cl_{50}$  de  $\approx 0,02$  mg/ml. El mecanismo de unión exacto y las funciones accesorias (si hubiere) desempeñadas por factores séricos se están investigando.

45 La proteína EV576 recombinante (rEV576) con sitios de glicosilación eliminados (que por otro lado están glicosilados en el sistema de expresión de levaduras) es tan activa como la proteína natural no glicosilada (Figura 5A).

La estructura de EV576 confirma que es un miembro lejano de la familia de las lipocalinas (Figura 5B), que tiene una identidad del 46% con la moubatina, un inhibidor de la agregación plaquetaria de *O. moubata*. Las lipocalinas son un extenso grupo de proteínas de garrapatas blandas cuyas funciones, con raras excepciones, se desconocen.

## 2. Efecto de EV576 en neuritis autoinmune experimental

De acuerdo con el procedimiento descrito en la referencia [20], se indujo neuritis autoinmune experimental (NAE) en ratas.

5 El día 0, a ratas Lewis, se inyectaron 170 µg de proteína P0 de mielina del sistema nervioso periférico, péptido 106-124 y 1,5 mg de *Mycobacterium tuberculosis* con adyuvante incompleto de Freund. El día 11, después de la inoculación, el 93% de los animales tuvieron una puntuación de 2 sobre el grado de puntuación clínica. La gravedad de paresia (parálisis/debilidad) se clasificó de la siguiente manera: 0 = sin enfermedad; 1 = cola flácida; 2 = paraparesia moderada; 3 = paraparesia grave; y 4 = tetraparesia o muerte. El día 11, se inyectó a las ratas con a) 3 mg/rata, por vía intravenosa, seguido de 1 mg/rata, por vía intraperitoneal, a intervalos de 12 horas durante 7 días, b) 0,3 mg/rata, por vía intravenosa, seguido de 0,1 mg/rata, por vía intraperitoneal, a intervalos de 12 horas durante 7 días o c) PBS. Los grupos de control no recibieron tratamiento. El tratamiento se limitó a 7 días y después se detuvo. A continuación, se realizó un seguimiento de los animales hasta el día 38 en el que los animales se sometieron a eutanasia. Se evaluó a las ratas con respecto a cambios en el peso y grado clínico.

15 Todos los animales perdieron peso durante los 10 primeros días del tratamiento. El peso se recuperó desde los días 17-18 hasta el día 38 en el que los animales recuperaron el peso corporal original (Figura 6a). No hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento.

20 El día 11, el 93% de los animales tuvieron una puntuación clínica de 2 con una puntuación media de 2,17. El tratamiento se produjo desde el día 11 hasta día 18. Los días 17 y 18, ambos grupos de tratamiento activo (es decir, grupos tratados con dosis altas y bajas de rEV576), mostraron puntuaciones clínicas más bajas estadísticamente significativas que las del grupo no tratado ( $P < 0,001$ ) y que las del grupo tratado con PBS ( $P < 0,01$ ). No hubo diferencias entre los dos grupos de tratamiento activo (es decir, dosis altas y bajas de rEV576) (Figura 6).

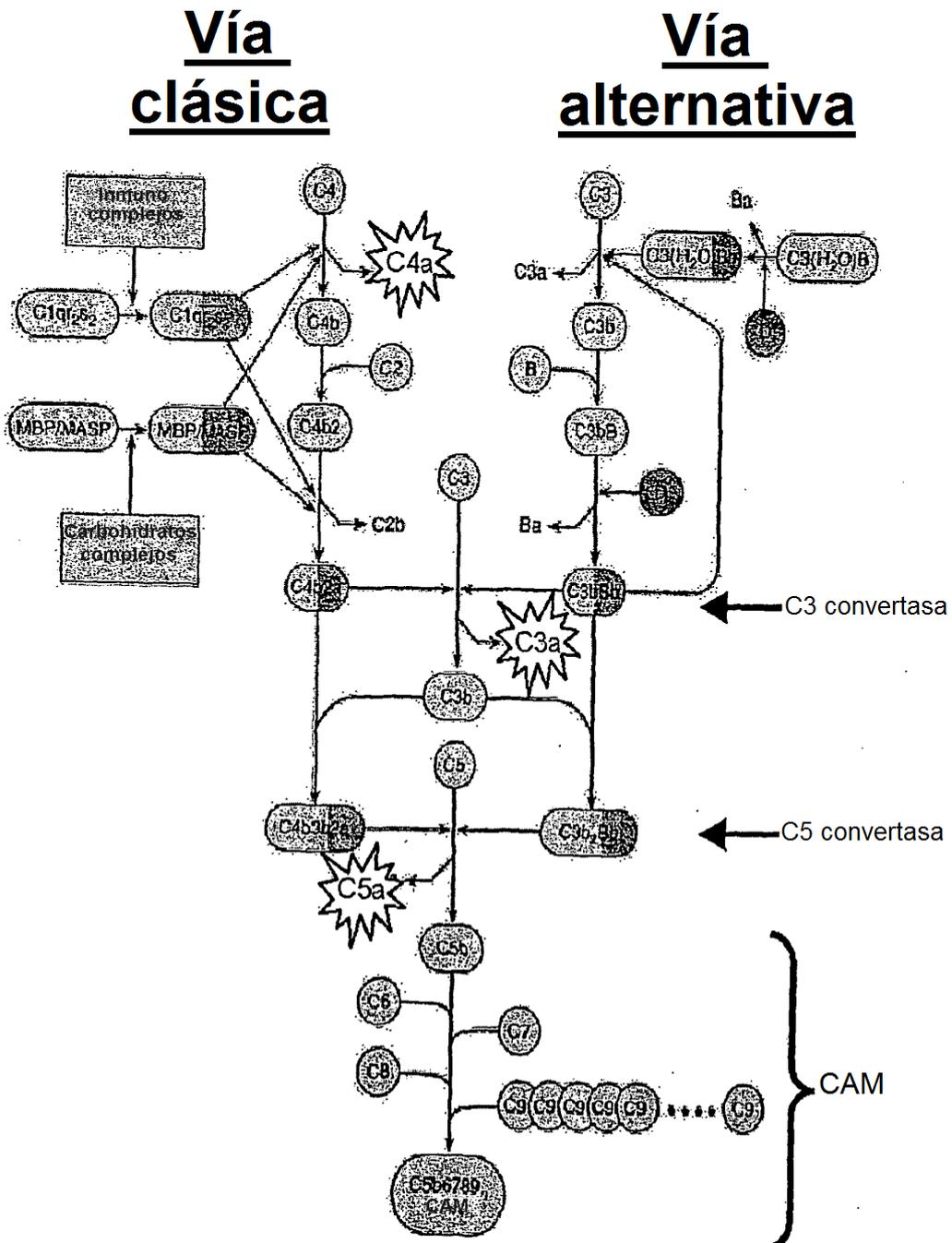
25 Por tanto, la proteína rEV576 administrada por inyección iv/ip reduce el grado de enfermedad clínica incluso cuando se administra durante la fase de enfermedad activa (es decir, a una puntuación clínica de 2). Un tratamiento precoz puede mostrar mayor efecto. Por tanto, la proteína rEV576 representa una posible terapia humana para trastornos del sistema nervioso periférico tales como el SGB y la PDIC.

- [1] Mastellos, D., y col., Clin Immunol, 2005. 115(3): págs. 225-35
- [2] Kwa., y col., Brain 2003. 126, 361-375
- [3] Stoll, y col., Ann Neurol 1991. 30: 147-155
- 30 [4] Guo, R.F. y P.A. Ward, Annu Rev Immunol, 2005. 23: págs. 821-52
- [5] Neumann, E., y col., Arthritis Rheum, 2002. 46 (4): págs. 934-45
- [6] Williams, A.S., y col., Arthritis Rheum, 2004. 50 (9): págs. 3035-44
- [7] Quigg, R.J., Curr Dir Autoimmun, 2004. 7: págs. 165-80
- [8] Papagianni, A. A., y col., Nephrol Dial Transplant, 2002. 17(1): págs. 57-63
- 35 [9] He, C., y col., J Immunol, 2005. 174(9): págs. 5750-7
- [10] Mead, R.J., y col., J Immunol, 2002. 168(1): págs. 458-65
- [11] Nakashima, S., y col., J Immunol, 2002. 169(8): págs. 4620-7
- [12] Mizuno, M. y D.S. Cole, Expert Opin Investig Drugs, 2005. 14(7): págs. 807-21
- [13] Allegretti, M., y col. Curr Med Chem, 2005. 12 (2): págs. 217-36
- [14] Terpe K, Appl Microbiol Biotechnol, 2003. 60: 523-33
- 40 [15] Sambrook y col (2000)
- [16] Fernandez & Hoeffler (1998)
- [17] Ausubel y col. (1991)
- [18] Remington's PharCAMEutical Sciences; CAMk Pub. Co., N.J. 1991
- [19] Documento WO2004/106369
- 45 [20] Zhu, J. y col. Acta Neurologica Scandinavica, 1994. 90: págs. 19-25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un agente que se une al complemento C5 para su uso en el tratamiento o prevención de una polirradiculoneuropatía desmielinizante post-infecciosa (síndrome de Guillain Barré), en el que el agente que se une a C5 es una proteína que comprende, o consta de, los aminoácidos 19 a 168 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2 o es un homólogo o un fragmento de la misma que conserva su capacidad para unirse a C5.
2. El agente de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el agente actúa para impedir la escisión de complemento C5, mediante la C5 convertasa, en el complemento C5a y en el complemento C5b-9.
- 10 3. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el agente se une a C5 con un valor de  $CI_{50}$  menor de 0,2 mg/ml.
4. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente deriva de un artrópodo hematófago.
- 15 5. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente que se une a C5 es una proteína que comprende, o consta de, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad superior al 60% con la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2.
6. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente que se une a C5 es una proteína que comprende, o consta de, los aminoácidos 1 a 168 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2.
- 20 7. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sujeto a tratar es un mamífero, preferentemente un ser humano.
8. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el agente se administra por vía intravenosa según una dosis de 13 mg/kg, seguido de una dosis cada 12 horas de 4 mg/kg por vía intraperitoneal.
- 25 9. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el agente que se une a C5 se administra como parte de un régimen de tratamiento que también implica la administración de inmunoglobulina para el tratamiento de una polirradiculoneuropatía desmielinizante post-infecciosa (síndrome de Guillain Barré).
10. El agente de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que el agente que se une a C5 se administra con la inmunoglobulina de manera simultánea, secuencial o por separado.
- 30 11. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la polirradiculoneuropatía desmielinizante post-infecciosa (síndrome de Guillain Barré) se selecciona del grupo que consiste en, síndrome de Miller Fisher, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (PDIA) y polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC).

FIG. 1

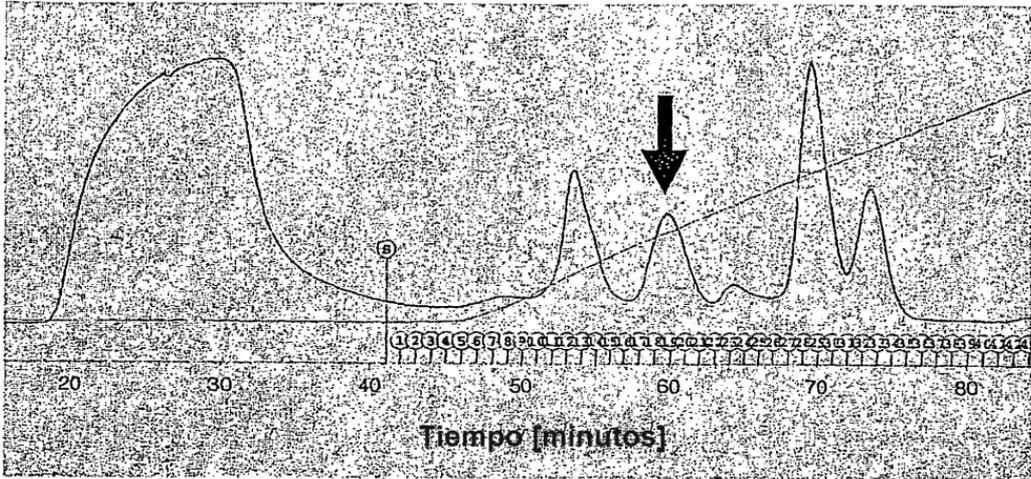


**FIG. 2**

ATGCTGGTTTGGTGACCCCTGATTTTCTCCTTTTCTGCCAACATCGCATATGCTGACAGC 60  
M L V L V T L I F S F S A N I A Y A D S 20  
 GAAAGCGACTGCACCTGGAAGCGAACCTGTTGACGCCTTCCAAAGCTTTCAGTGAGGGCAA 120  
 E S D C T G S E P V D A F Q A F S E G K 40  
 GAGGCATATGTCCTGGTGAGGTCCACGGATCCCAAAGCGAGGACTGCTTGAAAGGAGAA 180  
 E A Y V L V R S T D P K A R D C L K G E 60  
 CCAGCCGGAGAAAAGCAGGACAACACGTTGCCGGTGATGATGACGTTTAAAGAAATGGCACA 240  
 P A G E K Q D N T L P V M T F K N G T 80  
 GACTGGGCTTCAACCGATTGGACGTTTACTTTGGACGGCGCAAAGGTAACGGCAACCCCTT 300  
 D W A S T D W T F T L D G A K V T A T L 100  
 GGTAACCTAACCCAAAATAGGGAAGTGGTCTACGACTCGCAAAGTCATCACTGCCACGTT 360  
 G N L T Q N R E V V Y D S Q S H H C H V 120  
 GACAAGGTCGAGAAGGAAGTCCAGATTATGAGATGTGGATGCTCGATGCGGGAGGGCTT 420  
 D K V E K E V P D Y E M W M L D A G G L 140  
 GAAGTGGGAAGTCGAGTGCCTGCCGTCAAAGCTTGAAGAGTTGGCGTCTGGCAGGAACCAA 480  
 E V E V E C C R Q K L E E L A S G R N Q 160  
 ATGTATCCCCATCTCAAGGACTGCTAG 507  
 M Y P H L K D C \* 168

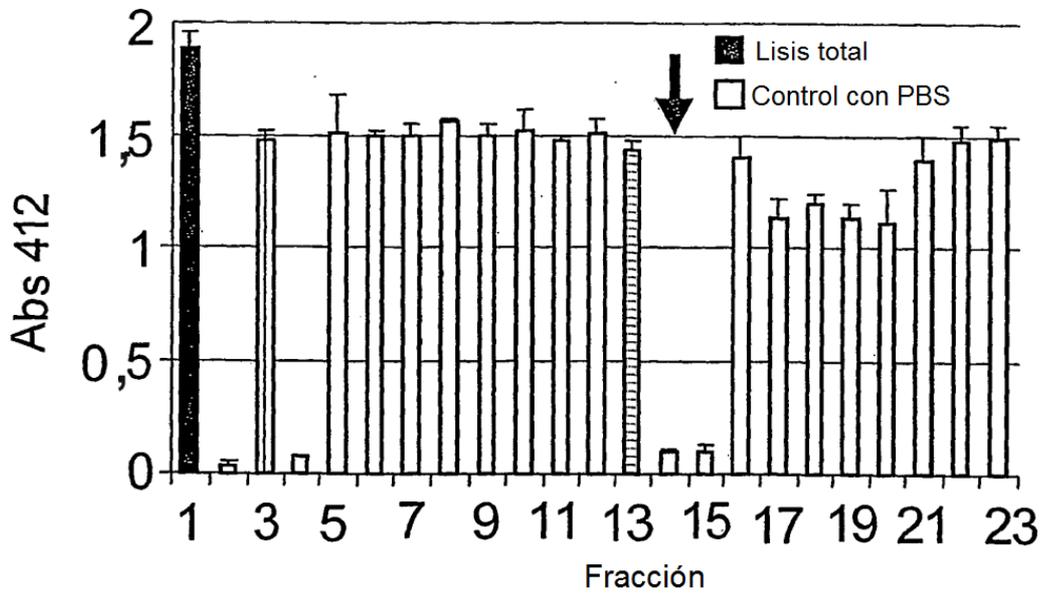
**FIG. 3A**

Cromatografía de intercambio aniónico

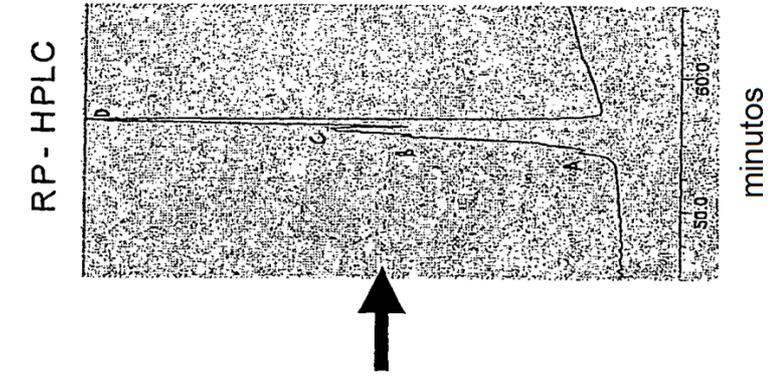


**FIG. 3B**

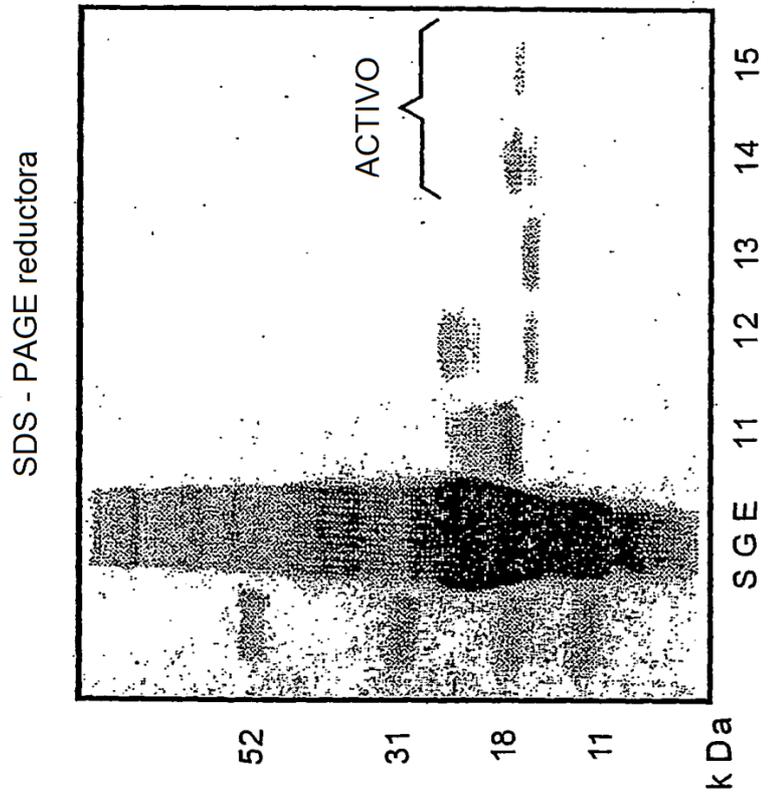
Ensayo hemolítico clásico de fracciones



**FIG. 3D**

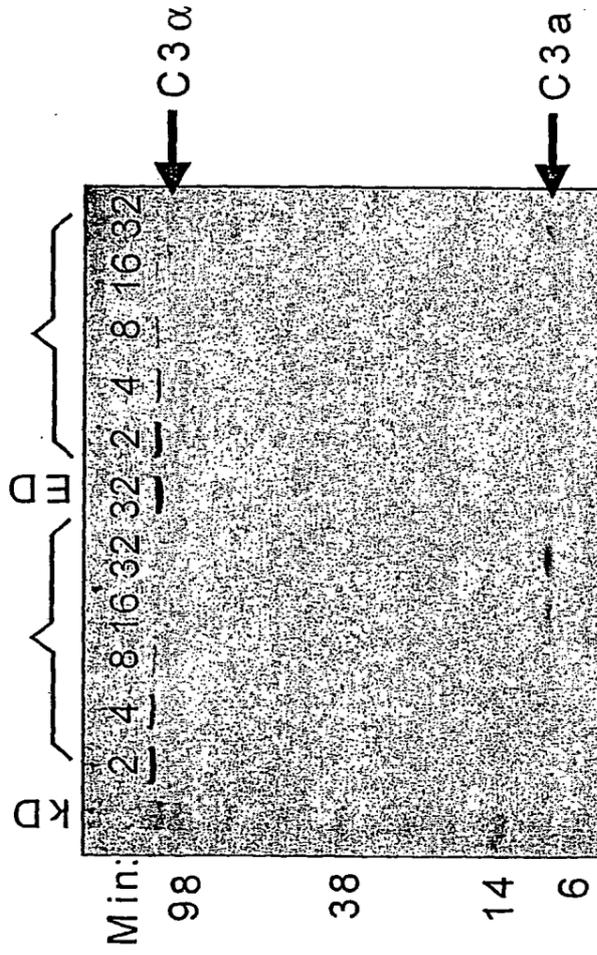


**FIG. 3C**



# FIG. 4A

Sin efecto sobre la producción de C3a



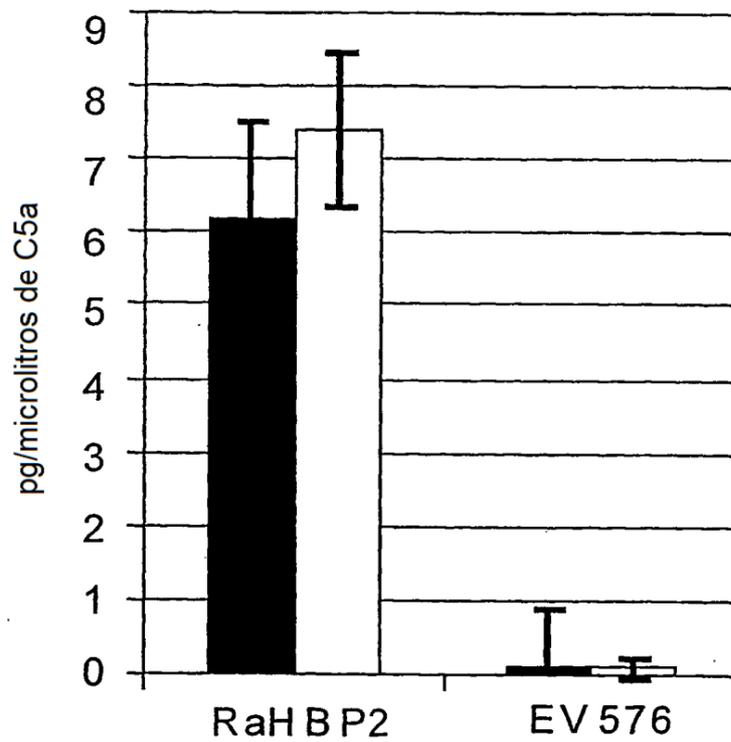
Evolución, ensayo hemolítico clásico

Inmunotransferencia con anticuerpo anti-C3a humano

### FIG. 4B

Impide la producción de C5a

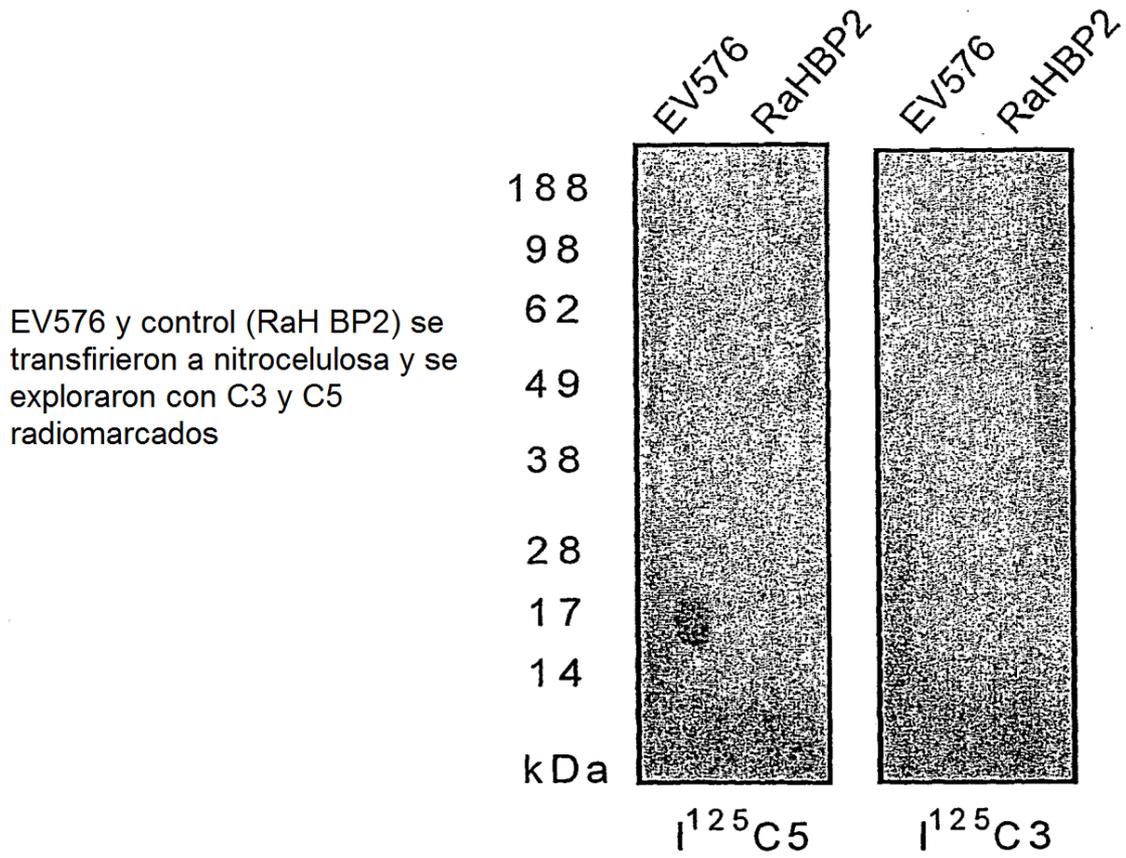
□ clásica  
■ alternativa



En los ensayos hemolíticos la [C5a] se midió usando un kit de ELISA

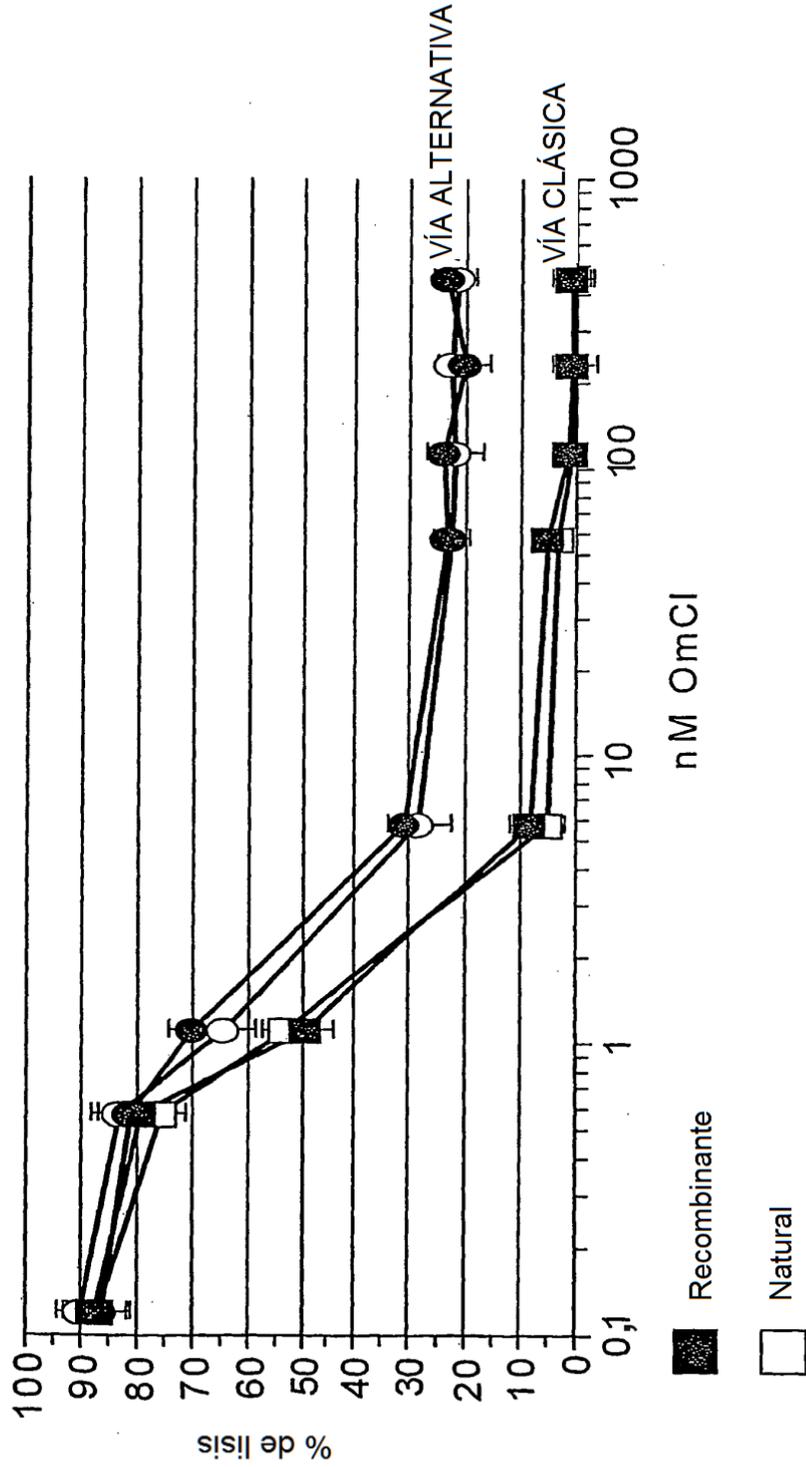
### FIG. 4C

Se une directamente a C5



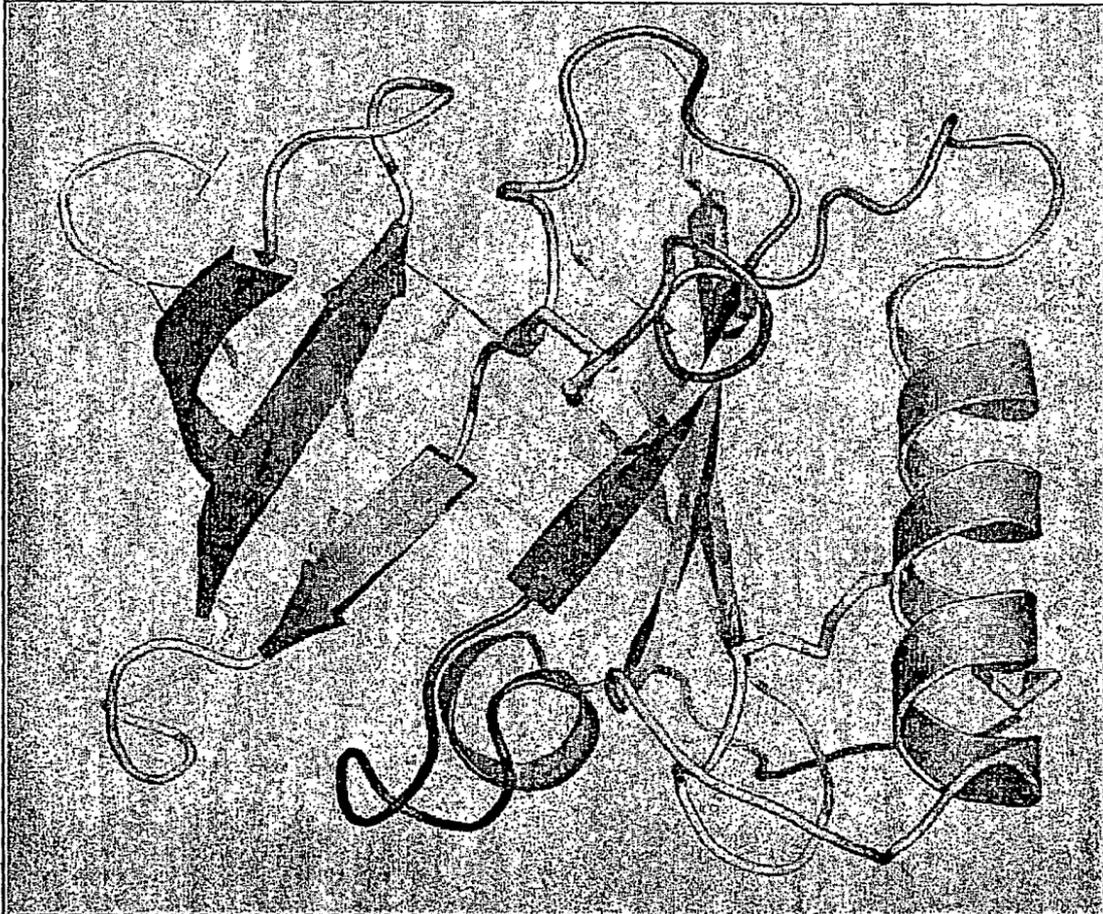
**FIG. 5A** EV576 recombinante

Actividad de la proteína recombinante y natural



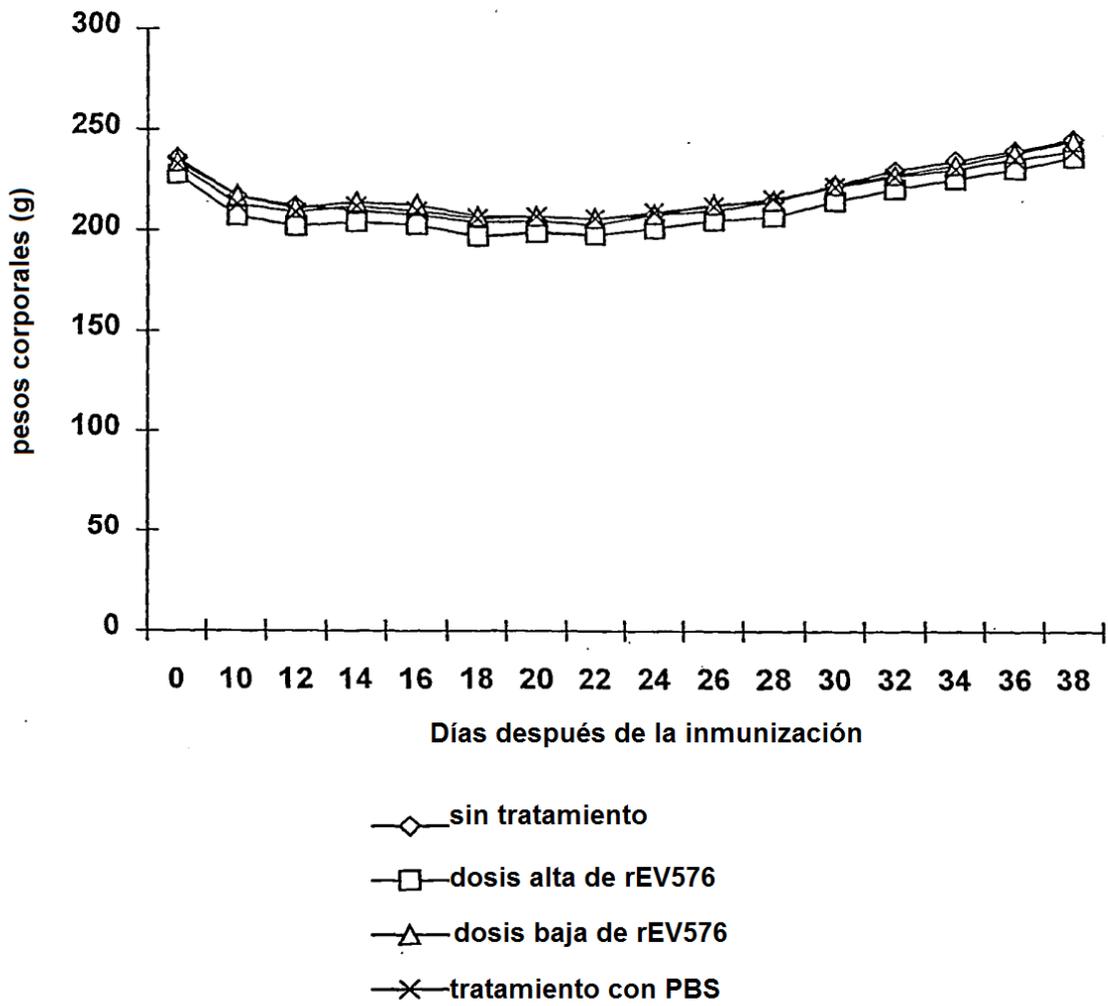
**FIG. 5B**

Estructura

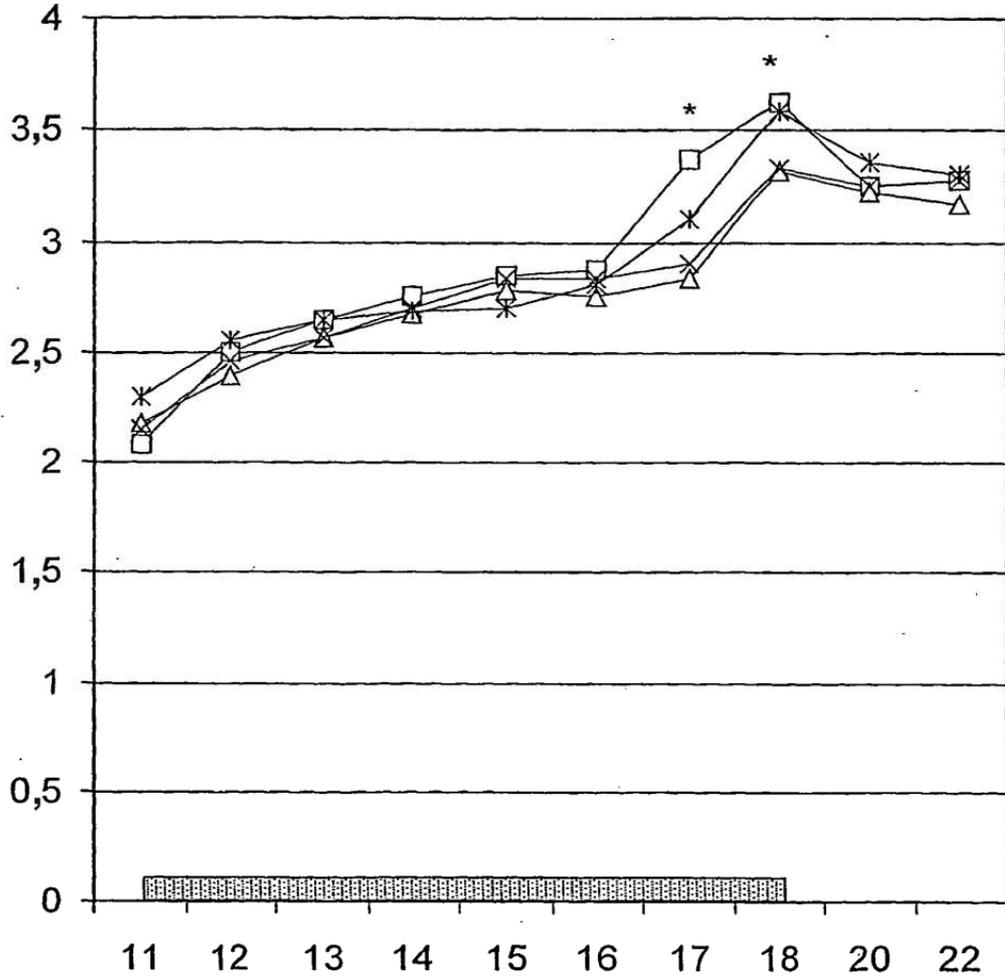


La proteína EV576 es un miembro lejano de la familia de las lipocalinas. Tiene una identidad de aa (aminoácidos) del 46% con la moubatina, un inhibidor de la agregación plaquetaria de *O. moubata*.

**FIG. 6A**  
**PÉRDIDA DE PESO**



**FIG. 6B**  
**PUNTUACIONES CLÍNICAS**



- puntuaciones clínicas sin tratamiento
- △ puntuaciones clínicas con dosis altas de rEV576
- × puntuaciones clínicas con dosis bajas de rEV576
- \* puntuaciones clínicas con tratamiento con PBS

La gravedad de paresia se clasificó de la siguiente manera:

- 0 = sin enfermedad;
- 1 = cola flácida
- 2 = paraparesia moderada
- 3 = paraparesia grave
- 4 = tetraparesia o muerte

▨ Tratamiento

\* P < 0,01 grupos de tratamiento activo frente a PBS  
P < 0,001 grupos de tratamiento activo frente a no tratado