

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 181**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2007 E 07804202 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2061501**

54 Título: **Método para tratar trastornos respiratorios**

30 Prioridad:

08.09.2006 GB 0617735
22.11.2006 US 860730 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.09.2015

73 Titular/es:

VOLUTION IMMUNO PHARMACEUTICALS SA
(100.0%)
Place Des Eaux Vives 6
3461-1211 Geneve 3, CH

72 Inventor/es:

HAMER, JOHN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 545 181 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).

Método para tratar trastornos respiratorios

Descripción

5 La presente invención se refiere al uso de agentes que se unen a la proteína del complemento C5 en el tratamiento de enfermedades asociadas con la activación del complemento inapropiada, y en particular en el tratamiento de trastornos respiratorios.

Antecedentes de la Invención

10 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
15 pueden asociarse con procesos beneficiosos y patológicos, el propio sistema del complemento interacciona al menos con 85 rutas biológicas con funciones tan diversas como angiogénesis, activación plaquetaria, metabolismo de glucosa y espermatogénesis [1].

20 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
25 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.

30 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
35 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.

40 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
45 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).

50 Varios modelos experimentales para el asma bronquial han indicado que la C5 y sus componentes activados están implicados en el desarrollo de inflamación de las vías respiratorias y broncoconstricción. Estudios con varios inhibidores de complementos redujeron marcadamente la hiperreactividad de las vías respiratorias o la inflamación de las vías respiratorias en roedores [2, 3, 4].

55 EPOC es un término general, que incluye las condiciones bronquitis crónica y enfisema y se usa para describir vías respiratorias que se han estrechado debido a bronquitis crónica, enfisema o ambos. La COPD afecta principalmente a personas por encima de la edad de 40 y el fumar es la causa de la mayoría de los casos. Los síntomas incluyen una tos persistente, disnea y resuello resultando en una dificultad creciente para respirar.

60 El asma se caracteriza por una combinación de inflamación de las vías respiratorias crónica, obstrucción de las vías respiratorias, e hiperreactividad de las vías respiratorias a varios estímulos. Se piensa que está mediada principalmente por respuestas inmunes adaptativas mediadas por células T CD4+ específicas de alérgenos, citocinas Th2 e IgE específica de alérgenos, que llevan a inflamación pulmonar e hiperreactividad de las vías respiratorias.

65 En la EPOC hay daño permanente a las vías respiratorias. Las vías respiratorias estrechadas están "fijadas" y por lo tanto los síntomas son crónicos. El tratamiento para abrir las vías respiratorias es limitado. En el

asma, hay inflamación en las vías respiratorias que provoca que los músculos en las vías respiratorias se constriñan. Esto provoca que las vías respiratorias se estrechen. Los síntomas tienden a ir y venir y varían en severidad de vez en cuando. El tratamiento para reducir la inflamación y abrir las vías respiratorias habitualmente funciona bien. Tanto el asma como la EPOC se tratan actualmente usando combinaciones variables de broncodilatadores, por ejemplo beta antagonistas como salbutamol y terbutalina y agentes anticolinérgicos como ipratropio y oxitropio; y esteroides como beclometasona, budesonida y fluticasona. Sin embargo, tratamientos mejorados adicionales serían beneficiosos.

Hay una gran necesidad de agentes que mejoren sobre los tratamientos actualmente disponibles para los trastornos respiratorios como la EPOC y el asma.

Resumen de la invención

Por lo tanto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno respiratorio que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un agente que se une al complemento C5.

La invención también proporciona el uso de una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un agente que se une al complemento C5 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno respiratorio.

El trastorno respiratorio de la invención incluye uno o más de asma, incluyendo asma severo y resistente a los esteroides, EPOC, alveolitis del complejo inmune incluyendo aquellas provocadas por la exposición a polvos orgánicos, mohos, alérgenos en el aire, polvo mineral, productos químicos, etc. Dichas condiciones incluyen pero no están limitadas a: pulmón de agricultor, pulmón de criador de palomas o pájaros, fiebre de granero, pulmón de molinero, pulmón del trabajador metalúrgico, fiebre del humidificador, silicosis, neumoconiosis, asbestosis, bisinosis, beriliosis, mesotelioma. Asma, rinitis, alveolitis o enfermedad pulmonar fibrótica difusa provocada por la exposición a drogas sistémicas o inhaladas y agentes químicos incluyendo, pero no limitados a: bleomicina, mitomicina, penicilinas, cefalosporinas, sulfonamidas, aspirina, AINES, tartrazina, inhibidores de la ECA, medios de contraste que contienen yodo, fármacos β bloqueantes no selectivos, suxametonio, hexametonio, tiopental, amiodarona, nitrofurantoína, paraquat, oxígeno, agentes citotóxicos, tetraciclinas, fenitoína, carbamazepina, clorpropamida, hidralazina, procainamida, isoniazida, ácido p-aminosalicílico. Daño pulmonar físico incluyendo pero no limitado a: lesión por aplastamiento, inhalación de humo y gases calientes, lesiones por explosión, lesiones por radiación, neumonitis por aspiración, neumonía lipoidea. Daño pulmonar asociado con trasplante de órganos incluyendo pero no limitado a: trasplante cardíaco, trasplante de pulmón, trasplante de médula ósea. Alveolitis fibrosante criptogénica. Granulomatosis alérgica (síndrome de Churg-Strauss). Granulomatosis de Wegener. Bronqueolitis obliterante. Fibrosis pulmonar intersticial. Fibrosis quística. Manifestaciones respiratorias de enfermedades autoinmunes y del tejido conectivo incluyendo, pero no limitado a: enfermedad reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, poliarteritis nodosa, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, espondilitis anquilosante, síndrome de Caplan. Síndrome de Goodpasture. Proteinosis alveolar pulmonar. Hemosiderosis pulmonar idiopática. Histiocitosis X. Infiltración pulmonar con eosinofilia (PIE) incluyendo pero no limitado a: eosinofilia pulmonar sencilla, eosinofilia pulmonar prolongada, eosinofilia broncopulmonar asmática, aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma, aspergilosis invasiva, eosinofilia pulmonar tropical, síndrome hipereosinofílico, infestación parasitaria. Linfangoioiomatosis (LAM).

Preferiblemente, el trastorno respiratorio es o EPOC o asma.

Preferiblemente, 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 [5].

El CAM está asociado con otros procesos patológicos importantes que incluyen artritis reumatoide [6;7], 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 [12].

C5a se ha convertido en una diana de interés particular en el campo de los trastornos asociados con el complemento [13]. 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 une 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 [14].

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.

De acuerdo con la invención, el agente que se une a C5 no es un anticuerpo monoclonal anti-C5.

El agente que se une a C5 se deriva de un artrópodo hematófago. El término "artrópodo hematófago" incluye a todos los artrópodos que se alimentan de sangre de un huésped apropiado, como insectos, garrapatas, piojos, pulgas y ácaros. Preferiblemente, el agente se deriva de una garrapata, preferiblemente de la garrapata *Ornithodoros moubata*.

De acuerdo con la invención, 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 equivalente funcional de esta proteína. El agente que se une a C5 puede ser una proteína que consiste de los aminoácidos 19 a 168 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2 o puede ser un equivalente funcional de esta proteína.

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 equivalente funcional 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.

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.

La proteína EV576 y la capacidad de esta proteína para inhibir la activación del complemento se ha descrito [20], en el que la proteína EV576 se denomina "proteína OmCI". Ahora se ha descubierto que la proteína EV576 es sorprendentemente eficaz en el tratamiento y prevención de trastornos respiratorios. Los datos presentados en el presente documento demuestran que la proteína EV576 es potente en la modulación del asma agudo en el modelo de asma OVA. Reduce la hiperreactividad de las vías respiratorias a niveles de fondo en todas las dosis probadas, y reduce la infiltración celular en el pulmón. La proteína EV576 representa así una posible terapia humana para el tratamiento y prevención de trastornos respiratorios.

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

De acuerdo con una realización adicional de la invención, el agente puede ser una molécula de ácidos nucleicos que codifica la proteína EV576 o un equivalente funcional de la misma. Por ejemplo, se puede emplear terapia génica para efectuar la producción endógena de la proteína EV576 por las células relevantes en el sujeto, ya sea in vivo o ex vivo. Otro enfoque es la administración de "ADN desnudo" en el que el gen terapéutico se inyecta directamente en la corriente sanguínea o en el tejido muscular.

Preferiblemente, dicha molécula de ácidos nucleicos comprende o consiste de las bases 53 a 507 de la secuencia de nucleótidos de la Figura 2. Esta secuencia de nucleótidos codifica la proteína EV576 de la Figura 2, sin la secuencia señal. Las primeras 54 bases de la secuencia de nucleótidos de la Figura 2 codifican la secuencia señal

de la que no se requiere para complementar la actividad inhibidora. Alternativamente, la molécula de ácidos nucleicos puede comprender o consistir de las bases 1 a 507 de la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 2, que codifica la proteína con la secuencia señal.

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.

En un aspecto, el término "equivalente funcional" se usa en el presente documento para describir homólogos y fragmentos de la proteína EV576 que mantienen su capacidad de unirse a C5, y para prevenir la escisión del complemento C5 por la convertasa C5 en el complemento C5a y el complemento C5b-9. El término "equivalente funcional" también se refiere a moléculas que son estructuralmente similares a la proteína EV576 o que contienen estructura terciaria similar o idéntica, particularmente en el ambiente del sitio activo o sitios activos de la proteína EV576 que se une con C5, como moléculas sintéticas.

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.

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 5 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), 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 los homólogos de la proteína EV576 también están abarcados por el término "equivalentes funcionales" siempre que dichos fragmentos mantengan la capacidad de unirse a C5. Los fragmentos pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos derivados de la secuencia de la proteína EV576 que son menores de 150 aminoácidos, menores de 125 aminoácidos, menores de 100 aminoácidos, menores de 75 aminoácidos, menores de 50 aminoácidos, o incluso menores de 25 aminoácidos o menores, siempre que estos fragmentos mantengan la capacidad de unirse con el 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 equivalente funcional 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 equivalente funcional. 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 [15]. Son ejemplos de dichas propiedades adicionales, una vida media 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 equivalentes funcionales, 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 [16] y [17]. Las formas recombinantes de la proteína EV576 y sus homólogos o fragmentos, son preferentemente formas no glicosiladas.

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 [16] o [18] pueden encontrarse la mayoría de las técnicas generales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunológicas.

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 estén asociados los trastornos respiratorios, como enfermedades sistémicas autoinmunes y del tejido conectivo como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, poliarteritis nodosa y esclerosis sistémica.

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.

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 0,2 mg/kg a 2 mg/kg.

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

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.

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 [19].

El agente puede administrarse mediante cualquier vía de administración conocida. El agente puede administrarse por vía nasal, por inhalación, por ejemplo, usando un inhalador de dosis medida, nebulizador, inhalador de polvo seco o inhalador nasal. El agente puede administrarse por una 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.

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 trastornos respiratorios. Por ejemplo, el agente puede administrarse en combinación con la infusión de un corticosteroide, agente inmunosupresor, agente citotóxico, agente anti-alérgico (por ejemplo antihistamínico), molécula de unión a histamina y serotonina, antagonista de quimioquinas y citoquinas, antimicrobiano, antiparasitario o con tratamiento como hemodiálisis o plasmaféresis. Las combinaciones de tratamientos farmacológicos pueden tener un efecto aditivo o sinérgico sobre el tratamiento de la enfermedad.

La invención proporciona por lo tanto -(i) un agente que se une con C5, preferiblemente la proteína EV576 o un equivalente funcional de la misma y (ii) uno o más de un corticosteroide, agente inmunosupresor, agente citotóxico, agente anti-alérgico (por ejemplo antihistamínico), molécula de unión a histamina y serotonina, antagonistas de quimioquinas y citoquinas, antimicrobiano, antiparasitario para su uso en terapia.

La invención también proporciona el uso de (i) un agente que se une con C5, preferiblemente la proteína EV576 o un equivalente funcional de la misma y (ii) uno o más de un corticosteroide, agente inmunosupresor, agente citotóxico, agente anti-alérgico (por ejemplo antihistamínico), molécula de unión a histamina y serotonina, antagonista de quimioquinas y citoquinas, antimicrobiano, antiparasitario en la fabricación de un medicamento para tratar trastornos respiratorios.

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).

La invención por lo tanto proporciona el uso de un agente que se une a C5, preferiblemente la proteína EV576 o un equivalente funcional de la misma, en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno respiratorio en un sujeto, en el que dicho sujeto ha sido pre-tratado con uno o más de un corticosteroide, agente inmunosupresor, agente citotóxico, agente anti-alérgico (por ejemplo antihistamínico), molécula de unión a histamina y serotonina, antagonista de quimioquinas y citoquinas, antimicrobiano, antiparasitario.

La invención también proporciona el uso de uno o más de un corticosteroide, agente inmunosupresor, agente citotóxico, agente anti-alérgico (por ejemplo antihistamínico), molécula de unión a histamina y serotonina, antagonista de quimioquinas y citoquinas, antimicrobiano, antiparasitario en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno respiratorio en un sujeto en el que dicho sujeto ha sido pre-tratado con un agente que se une a C5, preferiblemente la proteína EV576 o un equivalente funcional de la misma.

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 concurrentemente usados en el tratamiento de otras enfermedades con las que están relacionados los trastornos respiratorios. El agente que se une a C5 puede administrarse simultánea, secuencial o separadamente con el otro fármaco (o fármacos). Por ejemplo, el agente que se une a C5 puede administrarse antes o después de la administración del otro fármaco (o fármacos).

Varios aspectos de la realizaciones de la presente invención se describirán ahora con más detalle a modo de ejemplo. Se apreciará que puede hacerse la modificación del detalle sin salirse del ámbito de la invención.

Breve descripción de las Figuras:

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.

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 EV576 recombinante (rEV576) inhibe el complemento de manera tan eficaz como la proteína EV576 natural. B) Estructura de EV576.

Figura 6: Efecto de rEV576 en un modelo de asma agudo. A) niveles de PenH en ratones después del tratamiento con metacolina. B) Recuentos de células diferenciales de fluido de lavado broncoalveolar (BAL) después de la inducción de PenH.

Figura 7: Efecto de la rEV576 en el modelo de complejo inmune pulmonar. A) la rEV576 reduce la pérdida vascular en alveolitis del complejo inmune. B) la rEV576 inhibe el reclutamiento de neutrófilos en el fluido de lavado broncoalveolar (BAL) y pulmón en alveolitis del complejo inmune. C) secciones de tejido pulmonar demuestran que la rEV576 previene el reclutamiento de neutrófilos que está inducido en el tejido pulmonar por la alveolitis del complejo inmune.

Ejemplos

1. Mecanismo de acción y concentración inhibidora

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 [20].

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.

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.

5 **2. Efecto de la EV576 en un modelo de ratón de plasma**

Se comparó la respuesta a la rEV576 a tres concentraciones diferentes, en ratones OVA-sensibilizados y desafiados con controles tratados con Budesonida y sin sensibilizar/sin desafiar.

10 Se agruparon ratones Balb/c hembra de 5-8 semanas de edad como se muestra en la tabla siguiente:

Grupos de Tratamiento (n=8)	
A	Sin sensibilizar/desafiado/sin tratar
B	Sensibilizado/desafiado/sin tratar
C	Sensibilizado/desafiado/tratado rEV576 a 400 µg por ratón por día (20 mg/kg)
D	Sensibilizado/desafiado/tratado rEV576 a 400 µg por ratón por día (2 mg/kg)
E	Sensibilizado/desafiado/tratado rEV576 a 400 µg por ratón por día (0.2 mg/kg)
F	Sensibilizado/desafiado/tratado budesonida 1 mg en PBS

25 Los ratones en los grupos B-F se sensibilizaron a OVA por inyección intraperitoneal con 10 µg en 200 µl de OVA en alumbre en el día 0 y el día 14. Todos los animales fueron entonces desafiados por exposición a aerosol a un 5% de OVA en DW durante 20 minutos diariamente desde el día 18-23. Además a los ratones en los grupos C-F se les dio tratamientos de rEV576 por aerosolización en los días 21-24, 1 hora antes del desafío OVA. en la finalización (día 24) todos los animales se expusieron a concentraciones aumentadas de metacolina de desde 3,125 mg/ml a 50 mg/ml en PBS en una prueba de desafío de metacolina. Se recogieron los fluidos BAL para la preparación de citocentrífugados para el análisis de células inflamatorias de infiltración.

35 La hiperreactividad de las vías respiratorias se evaluó usando prnH (ver <http://www.buxco.com/Response%20Standard.pdf>). El algoritmo para Penh se deriva de experimentos de pletismografía de cuerpo completo y compara la amplitud media de la parte temprana de la fase espiratoria con la amplitud media de la parte tardía de la fase espiratoria; y la amplitud del pico de la fase espiratoria con la amplitud del pico de la fase inspiratoria.

40 Las respuestas de PenH muestran claramente que la sensibilización con OVA/alumbre seguido por exposición a OVA en aerosol resultó en hiperreactividad de las vías respiratorias; los valores de penH se elevaron a niveles más altos en el Grupo B cuando se compara con el Grupo A. El tratamiento con Budesonida (Grupo F) redujo la respuesta de penH marcadamente con valores medios cayendo por debajo de los vistos en ratones desafiados con aerosol, sin sensibilizar (Grupo A). De manera similar, el tratamiento con rE576 redujo los valores de penH a niveles de fondo o incluso ligeramente por debajo de fondo. Incluso la dosis más baja de rEV576 usada redujo el penH completamente (Figura 6A).

50 También se evaluó la infiltración de células pulmonares en el fluido de lavado fluido de lavado broncoalveolar (BAL). Como se esperaba, la sensibilización llevó a un aumento marcado en los números de células en el BAL y el tipo de célula dominante presente fue eosinófilos. También hubo un ligero aumento en el número de neutrófilos y linfocitos presentes en el BAL de animales sensibilizados en comparación con los que fueron desafiados con aerosol solamente. El tratamiento con Budesonida redujo el número de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos en el BAL en comparación con el grupo sin tratar (B). La disminución en los números de eosinófilos fue menor que la vista en experimentos similares. El tratamiento con rEV576 redujo la infiltración de eosinófilos y neutrófilos al menos tan bien como la budesonida, con una diferencia clara en los números eosinófilos siendo evidente en comparación con ratones sin tratar a todos los niveles de dosis probados. Todos los tratados se asociaron con un ligero aumento en los números de monocitos en el BAL. El número de monocitos fue bajo y estas diferencias son improbable que sean significativas (no se hicieron estadísticas formales) (Figura 6B).

60 Por lo tanto la rEV576 fue potente en la modulación del asma agudo en el modelo OVA. Redujo la hiperreactividad de las vías respiratorias a niveles de fondo en todas las dosis probadas, y fue capaz de reducir la infiltración celular en el pulmón. El efecto de los números de eosinófilos en el pulmón fue menos marcado que el efecto en penH, sugiriendo que sus efectos eran al menos parcialmente independientes de cualquier capacidad de controlar los procesos celulares subyacentes de la reactividad de las vías respiratorias.

65 **3. Efecto de la EV576 en alveolitis inducida del complejo inmune en el pulmón**

Para investigar el efecto de la rEV576 en alveolitis del complejo inmune, ratones macho C57/BL6, de alrededor de 8 semanas y con un peso corporal de alrededor de 25 g, se inyectaron intravenosamente con 300 µg de Ova que contenía un 0,3% de azul de Evans (EB) junto con 0, 50 o 250 µg de rEV573. Inmediatamente después, se aplicaron 150 µg de anticuerpo anti-Ova intranasalmente para cada ratón. \$ horas después de la administración del anticuerpo, se mataron los ratones, y los pulmones fueron perfundidos con una solución isotónica, se realizó el BAL usando Diff-Quick [21]. Los experimentos se realizaron dos veces con grupos de 4 animales cada.

Se investigaron la pérdida vascular, el reclutamiento de neutrófilos en el espacio broncoalveolar (BAL), la actividad de mieloperoxidasa (MPO) en el pulmón y la inflamación en las secciones histológicas.

Como un control positivo se usó un inhibidor de p38 MAPK, para el que se ha mostrado la inhibición de la pérdida vascular inducida por LPS [21]. El inhibidor de p38 MAPK evito el desarrollo de la alveolitis inducida del complejo inmune y el reclutamiento de neutrófilos cuando se dio intranasalmente y parcialmente cuando se dio manera intravenosa.

La rEV576 reduce la pérdida vascular en alveolitis del complejo inmune

La formación de complejos inmunes y su depósito local induce una respuesta inflamatoria aguda. La pérdida vascular se determinó midiendo el azul de Evans perdido al espacio broncoalveolar (BAL). El BAL se privó de células por centrifugación, y la absorción se midió usando un lector de placas ELISA a OD 610 nm.

La REV576 dada a 50 y 250 µg por la vía intravenosa inhibió la pérdida capilar inducida del complejo inmune en el fluido del BAL. el inhibidor de MAPK fue igualmente efectivo a 50 µg (Figura 7a).

La rEV576 inhibe el reclutamiento de neutrófilos en el BAL y el pulmón sobre la alveolitis del complejo inmune

El reclutamiento de neutrófilos inducido del complejo inmune en el BAL se inhibió por la rEV576 dada a 50 µg ($p < 0,05$, $n=4$) y a 250 µg por vía intravenosa. El inhibidor de MAPK no tuvo efecto significativo a 50 µg (datos no mostrados).

Se evaluó la actividad del ensayo de mieloperoxidasa (MPO) en el tejido pulmonar como se describe por Lefort y colaboradores [22]. En resumen, se homogenizó el pulmón congelado durante 30 segundos en 1 ml PBS en hielo frío con un mezclador polytron. El extracto se centrifugó (10000 x g, 10 min a 4° C), y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS-HTAB-EDTA (PBS que contiene 0,5% de HTAB (bromuro de hexadecil-trimetil amonio) y 1 mM de EDTA), se homogenizó durante 30 segundos y se centrifugó. Se colocaron 100 µl del sobrenadante en un tubo, junto con 2 ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, w/Ca²⁺ y Mg²⁺), 200 µl de PBS-HTAB-EDTA, 100 µl de o-dianosidina (1,25 mg/ml de H₂O) y 100 µl de H₂O₂. Después de 15 minutos de incubación a 37° C bajo agitación la reacción se paró por la transferencia en hielo y la adición de 100 µl de NaN₃ (1%). La actividad de MPO se cuantificó como absorbancia a 460 nm.

El reclutamiento de neutrófilos en el pulmón, fue inhibido dependientemente de la dosis por EV576 dada de manera intravenosa en el momento de la reacción del complejo inmune (50 y 250 µg), como se evaluó por las mediciones de MPO en el homogeneizado de tejido pulmonar. El inhibidor de MAPK fue igualmente efectivo a 50 µg (Figura 7B).

Histología pulmonar

El reclutamiento de neutrófilos inducido del complejo inmune en el tejido pulmonar se investigó adicionalmente en secciones de tejido pulmonar. Después del lavado broncoalveolar, el pulmón se extirpó (4 horas después de la administración anti-Ova) y se fijó en un 4% de formaldehído tamponado para análisis microscópico estándar usando H&E. El infiltrado peribronquial se evaluó como una puntuación semi-cuantitativa (0-3) por dos observadores independientes.

La rEV576 dada a 50µg por la vía intravenosa y el inhibidor de MAPK evitaron el reclutamiento de neutrófilos, hemorragia y edema en el pulmón (Figurea 7C).

Estos datos demuestran que la rEV576, administrada de forma intravenosa, es un potente inhibidor de la pérdida capilar, reclutamiento de neutrófilos y hemorragia, en el tejido pulmonar y el BAL, inducida por lesión pulmonar del complejo inmune.

[1] Mastellos, D., et al., Clin Immunol, 2005. 115(3): p. 225-35

[2] Abe et al., J. Immunol. 2001. 167:4651-4660

[3] Lukacs et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2001. 280:L512-L518

[4] Peng et al., The Journal of Clinical Investigation 2005. 115:6:1590-1600

- [5] Guo, R.F. and P.A. Ward, Annu Rev Immunol, 2005, 23: p. 821-52
 [6] Neumann, E., et al., Arthritis Rheum, 2002. 46(4): p. 934-45
 [7] Williams, A.S., et al., Arthritis Rheum, 2004, 50(9): p. 3035-44
 [8] Quigg, R.J., Curr Dir Autoimmun, 2004. 7: p. 165-80
 [9] Papagianni, A.A., et al., Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(1): p. 57-63
 [10] He, C., et al., J Immunol, 2005. 174(9): p. 5750-7
 [11] Mead, R.J., et al., J Immunol, 2002. 168(1): p. 458-65
 [12] Nakashima, S., et al., J Immunol, 2002. 169(8): p. 4620-7
 [13] Mizuno, M. and D.S. Cole, Expert Opin Investig Drugs, 2005. 14(7): p. 807-21
 [14] Allegretti, M., et al., Curr Med Chem, 2005. 12(2): p. 217-36
 [15] Terpe K, Appl Microbiol Biotechnol, 60: 523-33, 2003
 [16] Sambrook et al (2000)
 [17] Fernandez & Hoeffler (1998)
 [18] Ausubel et al: (1991)
 [19] Remington's Pharmaceutical Sciences; Mack Pub. Co., N.J. 1991
 [20] WO2004/106369
 [21] Schnyder-Candrian, S., et. al., J Immunol, 2005. páginas 175-262.
 [22] Lefort, J., et. al., J Immunol, 1998. páginas 161-474.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VARLEIGH LIMITED

<120> MÉTODO PARA TRATAR TRASTORNOS RESPIRATORIOS

<130> P044811EP

<140> PCT/GB2007/003404

<141> 2007-09-10

<150> GB0617735.6

<151> 2006-09-08

<150> US60/860730

<151> 2006-11-22

<160> 2

<170> SeqWin99, versión 1.02

<210> 1

<211> 507

<212> ADN

<213> Ornithodoros moubata

<400> 1

```

atgctggttt tgggtgacct gattttctcc ttttctgcga acatcgcata tgctgacagc 60
gaaagcgact gcaactggaag cgaacctgtt gacgccttcc aagctttcag tgagggcaaa 120
gaggcatatg tcctggtgag gtccacggat cccaaagcga gggactgctt gaaaggagaa 180
ccagccggag aaaagcagga caacacgttg ccggtgatga tgacgtttaa gaatggcaca 240
gactgggctt caaccgattg gacgtttact ttggacggcg caaaggtaac ggcaaccctt 300
ggtaacctaa cccaaaatag ggaagtgggtc tacgactcgc aaagtcacatca ctgccacgtt 360
gacaaggtcg agaaggaagt tccagattat gagatgtgga tgctcgatgc gggagggtt 420
gaagtggag tcgagtgtg ccgtcaaaag cttgaagagt tggcgtctg caggaaccaa 480
atgtatcccc atctcaagga ctgctag 507
    
```

<210> 2

<211> 168

<212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<400> 2

ES 2 545 181 T3

5 Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala Asn Ile Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala
 20 25 30
 Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser
 35 40 45
 10 Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu
 50 55 60
 Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr
 65 70 75 80
 Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val
 85 90 95
 20 Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp
 100 105 110
 Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro
 115 120 125
 Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val
 130 135 140
 30 Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln
 145 150 155 160
 35 Met Tyr Pro His Leu Lys Asp Cys
 165

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> VARLEIGH LIMITED
 <120> MÉTODO PARA TRATAR TRASTORNOS RESPIRATORIOS
 <130> P044811EP
 45 <140> PCT/GB2007/003404
 <141> 2007-09-10
 <150> GB0617735.6
 50 <151> 2006-09-08
 <150> US60/860730
 <151> 2006-11-22
 55 <160> 2
 <170> SeqWin99, versión 1.02
 <210> 1
 60 <211> 507
 <212> ADN
 <213> Ornithodoros moubata
 65 <400> 1

ES 2 545 181 T3

	atgctggttt	tggtgaccct	gatttttctcc	ttttctgcga	acatcgcata	tgctgacagc	60
	gaaagcgact	gcactggaag	cgaacctgtt	gacgccttcc	aagctttcag	tgagggcaaa	120
	gaggcatatg	tcctggtgag	gtccacggat	cccaaagcga	gggactgctt	gaaaggagaa	180
5	ccagccggag	aaaagcagga	caacacgttg	ccggtgatga	tgacgtttta	gaatggcaca	240
	gactgggctt	caaccgattg	gacgtttact	ttggacggcg	caaaggtaac	ggcaaccctt	300
	ggtaacctaa	cccaaaatag	ggaagtggtc	tacgactcgc	aaagtcatca	ctgccacgtt	360
	gacaaggtcg	agaaggaagt	tccagattat	gagatgtgga	tgctcgcgatc	gggagggctt	420
	gaagtgggaag	tcgagtgcctg	ccgtcaaaaag	cttgaagagt	tggcgtctg	caggaaccaa	480
10	atgtatcccc	atctcaagga	ctgctag				507

<210> 2

<211> 168

<212> PRT

15 <213> Ornithodoros moubata

<400> 2

20	Met	Leu	Val	Leu	Val	Thr	Leu	Ile	Phe	Ser	Phe	Ser	Ala	Asn	Ile	Ala
	1				5					10					15	
	Tyr	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Asp	Cys	Thr	Gly	Ser	Glu	Pro	Val	Asp	Ala
				20					25					30		
25	Phe	Gln	Ala	Phe	Ser	Glu	Gly	Lys	Glu	Ala	Tyr	Val	Leu	Val	Arg	Ser
			35					40					45			
30	Thr	Asp	Pro	Lys	Ala	Arg	Asp	Cys	Leu	Lys	Gly	Glu	Pro	Ala	Gly	Glu
		50					55					60				
	Lys	Gln	Asp	Asn	Thr	Leu	Pro	Val	Met	Met	Thr	Phe	Lys	Asn	Gly	Thr
35		65				70					75				80	
	Asp	Trp	Ala	Ser	Thr	Asp	Trp	Thr	Phe	Thr	Leu	Asp	Gly	Ala	Lys	Val
				85					90					95		
40	Thr	Ala	Thr	Leu	Gly	Asn	Leu	Thr	Gln	Asn	Arg	Glu	Val	Val	Tyr	Asp
				100					105					110		
	Ser	Gln	Ser	His	His	Cys	His	Val	Asp	Lys	Val	Glu	Lys	Glu	Val	Pro
45			115					120					125			
	Asp	Tyr	Glu	Met	Trp	Met	Leu	Asp	Ala	Gly	Gly	Leu	Glu	Val	Glu	Val
		130					135					140				
50	Glu	Cys	Cys	Arg	Gln	Lys	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	Asn	Gln
		145				150					155				160	
	Met	Tyr	Pro	His	Leu	Lys	Asp	Cys								
55					165											

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un agente que se une al complemento C5 para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno respiratorio, en el que el agente que se une al complemento C5 es una proteína que comprende o consiste de los aminoácidos 19 a 168 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o es un homólogo o fragmento de la misma que mantiene su capacidad para unirse a C5.
- 10 **2.** El agente para el uso de 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.
- 15 **3.** El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1- 2, en el que el agente se une a C5 con un valor de Cl_{50} menor de 0,2 mg/ml.
- 20 **4.** El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente deriva de un artrópodo hematófago.
- 25 **5.** El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el agente que se une a C5 es una proteína que comprende o consiste de una secuencia de aminoácidos con más del 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.
- 30 **6.** El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que el agente que se une a C5 es una proteína que comprende o consiste de los aminoácidos 1 a 168 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o su equivalente funcional de esta proteína.
- 35 **7.** El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que el agente se administra como una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína como se enumera en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 40 **8.** El agente para el uso de la reivindicación 7 en el que la molécula de ácidos nucleicos comprende o consiste de las bases 55 a 507 de la secuencia de nucleótidos en la SEQ ID NO: 1.
- 45 **9.** El agente para el uso de la reivindicación 8 en el que la molécula de ácidos nucleicos comprende o consiste de las bases 1 a 507 de la secuencia de nucleótidos en la SEQ ID NO: 1.
- 50 **10.** El agente para el uso de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el sujeto a ser tratado es un mamífero, preferiblemente un humano.
- 55 **11.** El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el agente se administra en una dosis suficiente para unirse lo máximo posible al C5 disponible en el sujeto, más preferiblemente, a todo el C5 disponible.
- 60 **12.** El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el agente que se une a C5 se administra como parte del régimen de tratamiento que también implica la administración de un fármaco adicional para el tratamiento de trastornos respiratorios.
- 65 **13.** El agente para el uso de la reivindicación 12 en el que el fármaco adicional se selecciona de uno o más del grupo consistente de un esteroide como beclometasona, budesonida y fluticasona, un beta agonista como salbutamol y terbutalina, un agente anticolinérgico como ipratropio y oxitropio, agente inmunosupresor, agente citotóxico, agente anti-alérgico (por ejemplo, antihistamínico), molécula de unión a histamina y serotonina, antagonista de quimioquinas y citoquinas, un antimicrobiano, o un agente antiparasitario.
- 14.** El agente para el uso de la reivindicación 12 o la reivindicación 13 en el que el agente que se une a C5 se administra simultánea, secuencial o separadamente con el uno o más fármacos adicionales.
- 15.** El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el que el trastorno respiratorio se selecciona del grupo consistente de asma, EPOC, alveolitis del complejo inmune; asma, rinitis, alveolitis o enfermedad pulmonar fibrótica difusa causada por la exposición a los fármacos y agentes químicos sistémicos o inhalados; daño pulmonar físico; neumonitis por aspiración; neumonía lipoidea; daño pulmonar asociado con el trasplante de órganos; alveolitis fibrosante criptogénica; granulomatosis alérgica; granulomatosis de Wegener; bronqueolitis obliterante; fibrosis pulmonar intersticial; fibrosis quística; manifestaciones respiratorias de enfermedades autoinmunes y del tejido conectivo; síndrome de Goodpasture; proteinosis alveolar pulmonar; hem siderosis pulmonar idiopática; histiocitosis X; infiltración pulmonar con eosinofilia o linfangioleiomiomatosis.
- 16.** El agente para el uso de acuerdo con la reivindicación 15 en el que:
 - a) el asma es severo y asma resistente a los esteroides;
 - b) la alveolitis del complejo inmune es la provocada por la exposición a polvos orgánicos, mohos, alérgenos

en el aire, polvo mineral o productos químicos, incluyendo pulmón de agricultor, pulmón de criador de palomas o pájaros, fiebre de granero, pulmón de molinero, pulmón del trabajador metalúrgico, fiebre del humidificador, silicosis, neumoconiosis, asbestosis, bisinosis, beriliosis o mesotelioma;

c) el asma, rinitis, alveolitis o enfermedad pulmonar fibrótica difusa está provocada por la exposición a bleomicina, mitomicina, penicilinas, sulfonamidas, cefalosporinas, aspirina, AINES, tartrazina, inhibidores de la ECA, medios de contraste que contienen yodo, fármacos β bloqueantes no selectivos, suxametonio, hexametonio, tiopentona, amiodarona, nitrofurantoína, paraquat, oxígeno, agentes citotóxicos, tetraciclinas, fenitoína, carbamazepina, clorpropamida, hidralazina, procainamida, isoniazida, ácido p-aminosalicílico;

d) el daño pulmonar físico es lesión por aplastamiento, inhalación de humo y gases calientes, lesiones por explosión o lesiones por radiación

e) el daño pulmonar está asociado con trasplante cardíaco, trasplante de pulmón o trasplante de médula ósea

f) las manifestaciones respiratorias de enfermedades autoinmunes y del tejido conectivo incluyen enfermedad reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, poliarteritis nodosa, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, espondilitis anquilosante o síndrome de Caplan; o

g) la infiltración pulmonar con eosinofilia es eosinofilia pulmonar sencilla, eosinofilia pulmonar prolongada, eosinofilia broncopulmonar asmática, aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma, aspergilosis invasiva, eosinofilia pulmonar tropical, síndrome hipereosinofílico o infestación parasitaria.

17. El agente para el uso de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el trastorno respiratorio se selecciona del grupo consistente de asma, y EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

FIG. 1

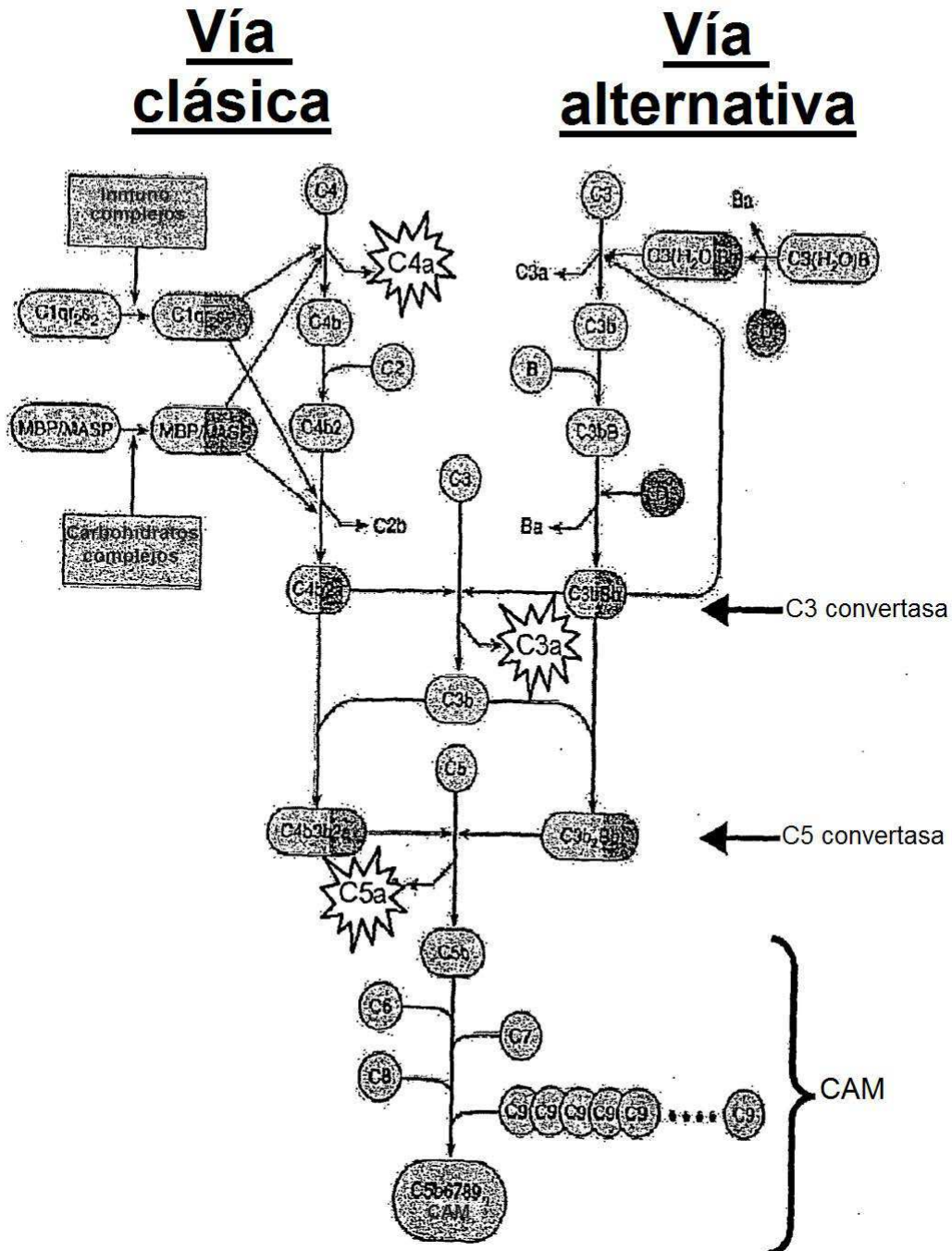


FIG. 2

ATGCTGGTTTTGGTGACCCCTGATTTTCTCCTTTTCTGCGAACATCGCATATGCTGACAGC 60
M L V L V T L I F S F S A N I A Y A D S 20
 GAAAGCGACTGCACTGGAAGCGAACCTGTTGACGCCCTTCCAAGCTTTCAAGTGAGGGCAA 120
 E S D C T G S E P V D A F Q A F S E G K 40
 GAGGCATATGTCCTGCTGAGGTCCACGGATCCCAAAGCGAGGACTGCTTGAAAGGAGAA 180
 E A Y V L V R S T D P K A R D C L K G E 60
 CCAGCCGAGAAAGCAGGACAACACGTTGCCGGTGATGATGACGTTTAAAGAAATGGCACA 240
 P A G E K Q D N T L P V M M T F K N G T 80
 GACTGGGCTTCAACCGATTGGACGTTTACTTTGGACGGCGCAAAGGTAACGGCAACCCTT 300
 D W A S T D 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
 GACAAGGTCGAGAAGGAGTTCAGATTATGAGATGTGGATGCTCGATCGGGAGGGCTT 420
 D K V E K E V P D Y E M W M L D A G G L 140
 GAAGTGGAAGTCGAGTCTGCCGTCAAAGCTTGAAGAGTTGGCGTCTGGCAGGAACCAA 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

ES 2 545 181 T3

FIG. 3A

Cromatografía de intercambio aniónico

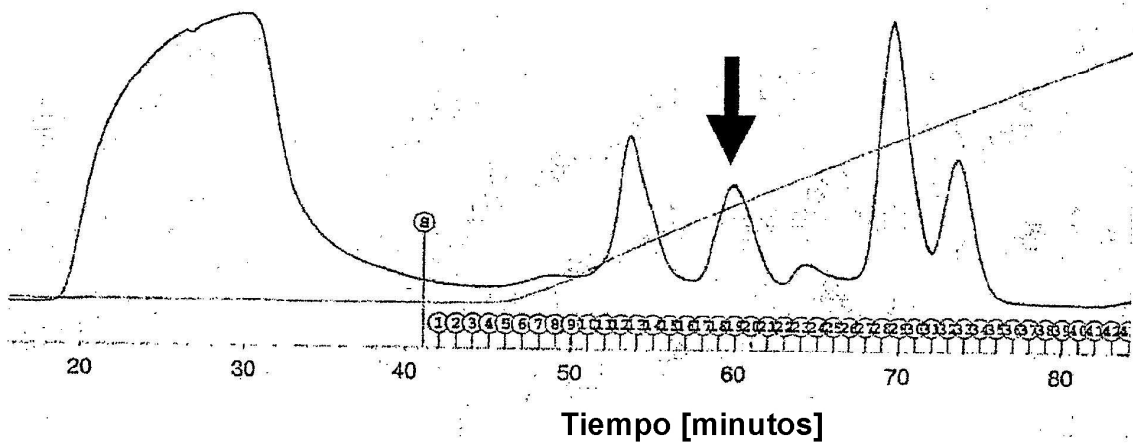


FIG. 3B

Ensayo hemolítico clásico de fracciones

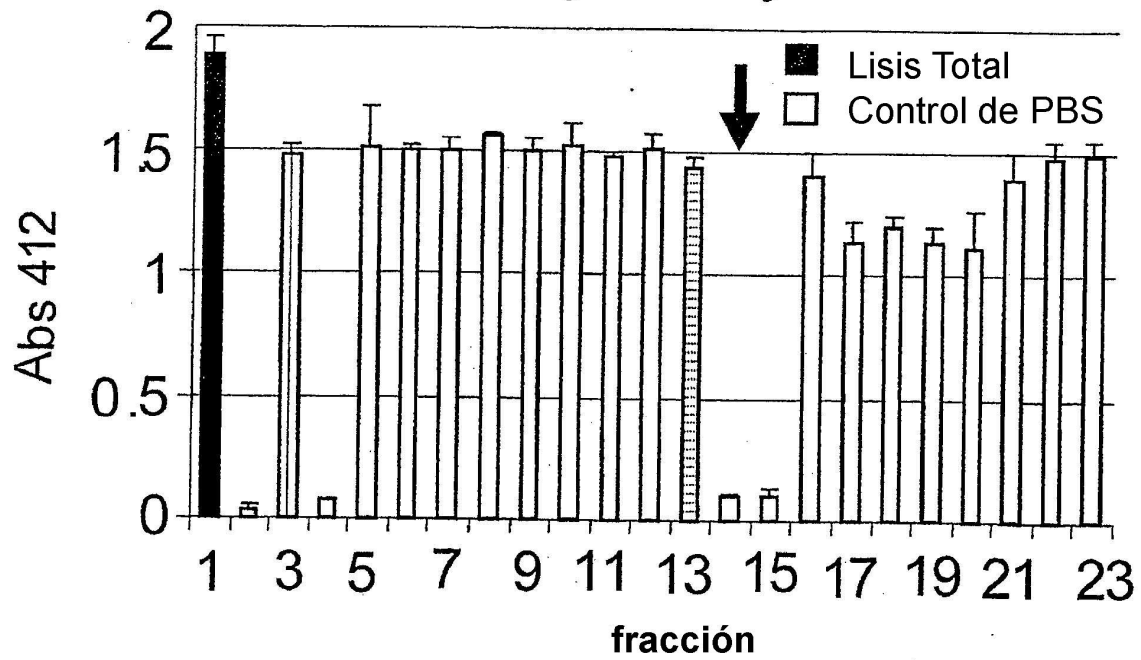


FIG. 3C

SDS - PAGE reductora

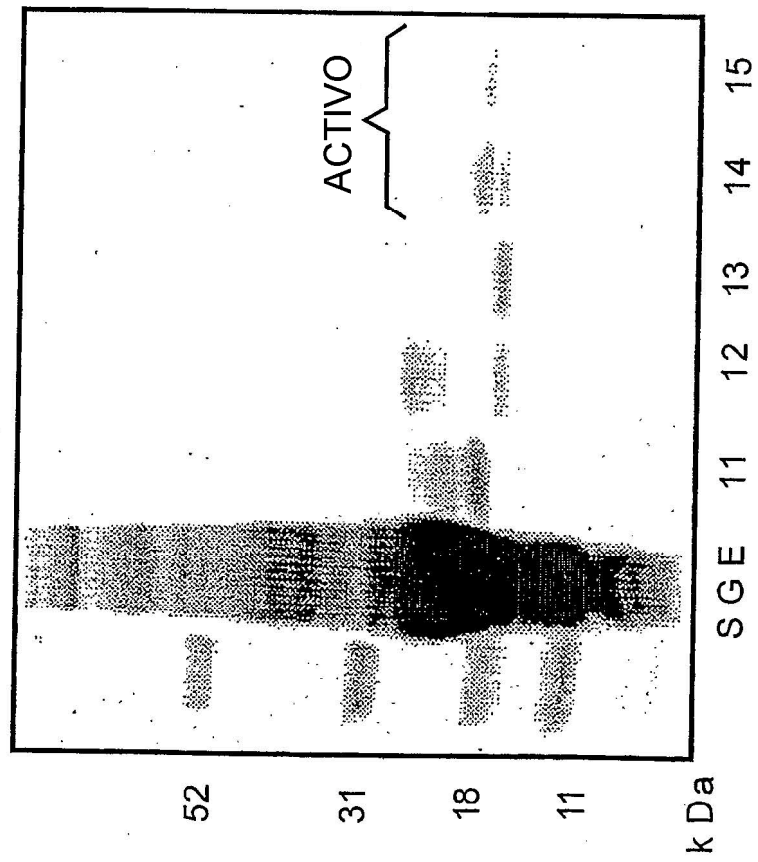


FIG. 3D

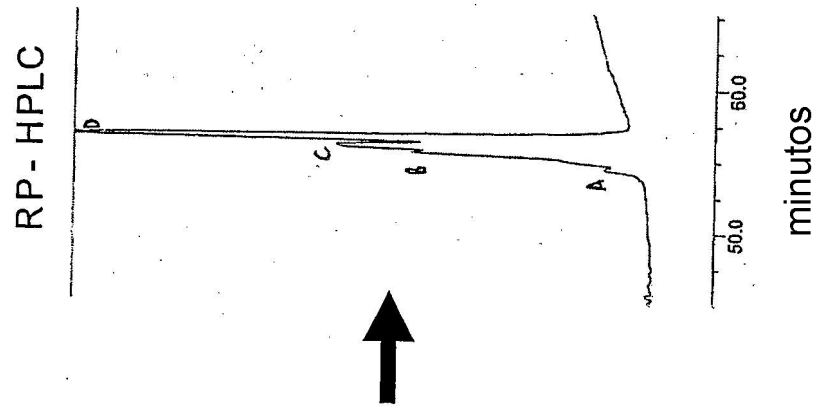
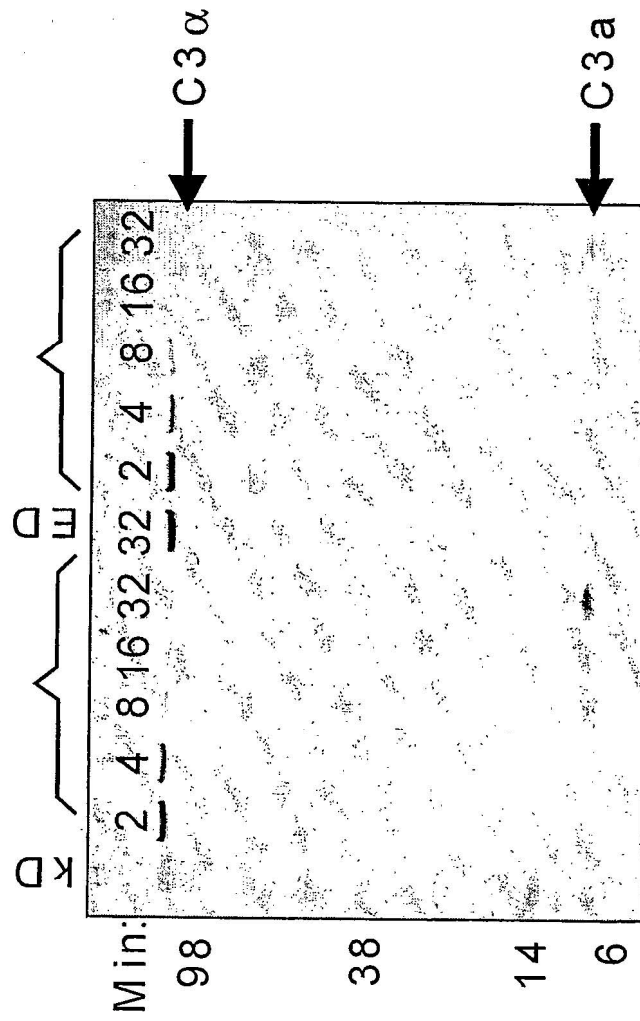


FIG. 4A

Sin efecto sobre la producción de C3a



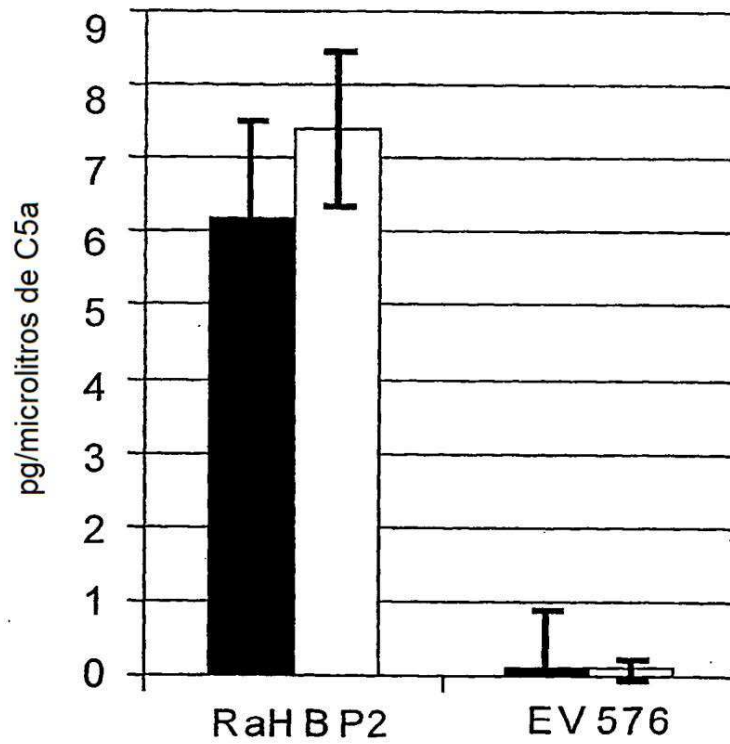
Curso temporal, ensayo
hemolítico clásico

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

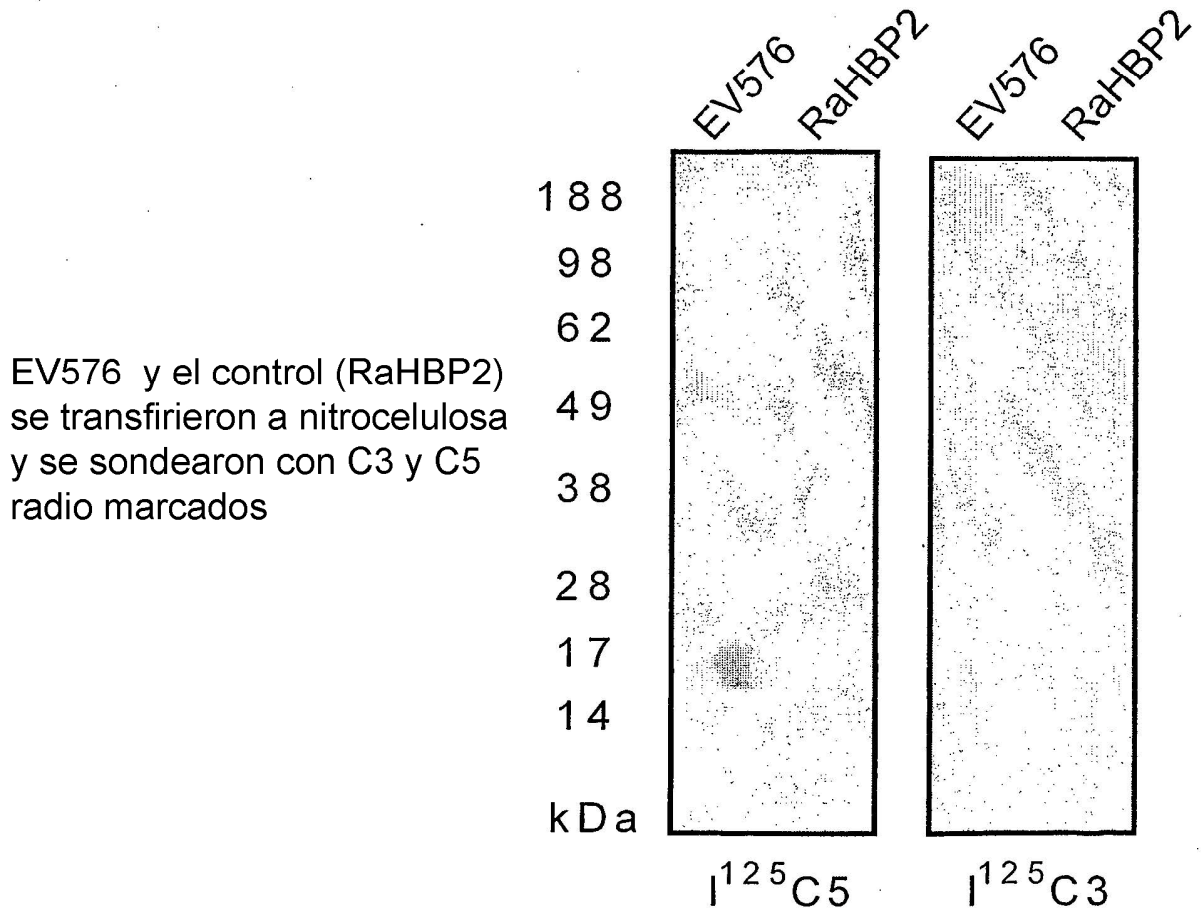


FIG. 5A EV576 recombinante

Actividad de la proteína recombinante y natural

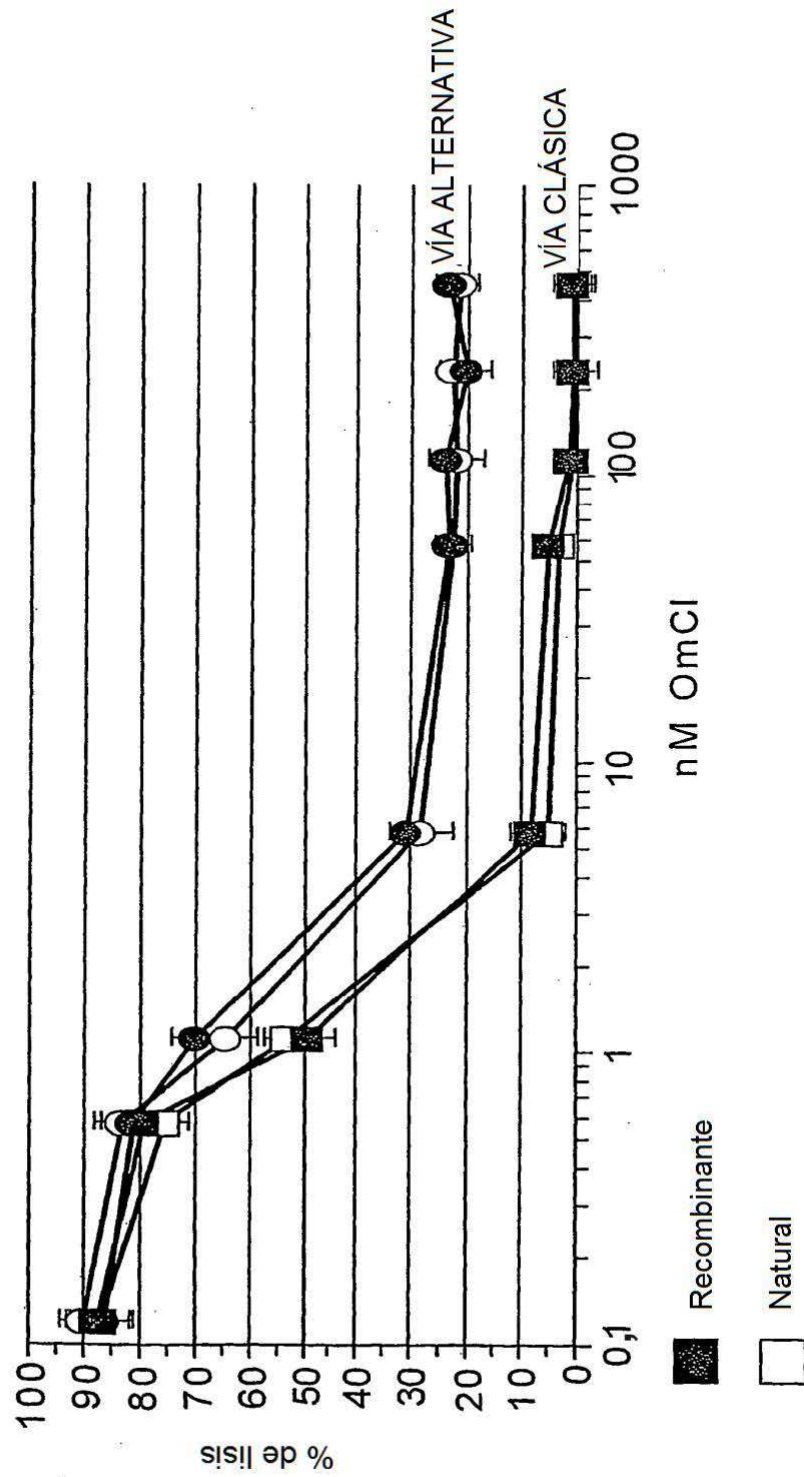
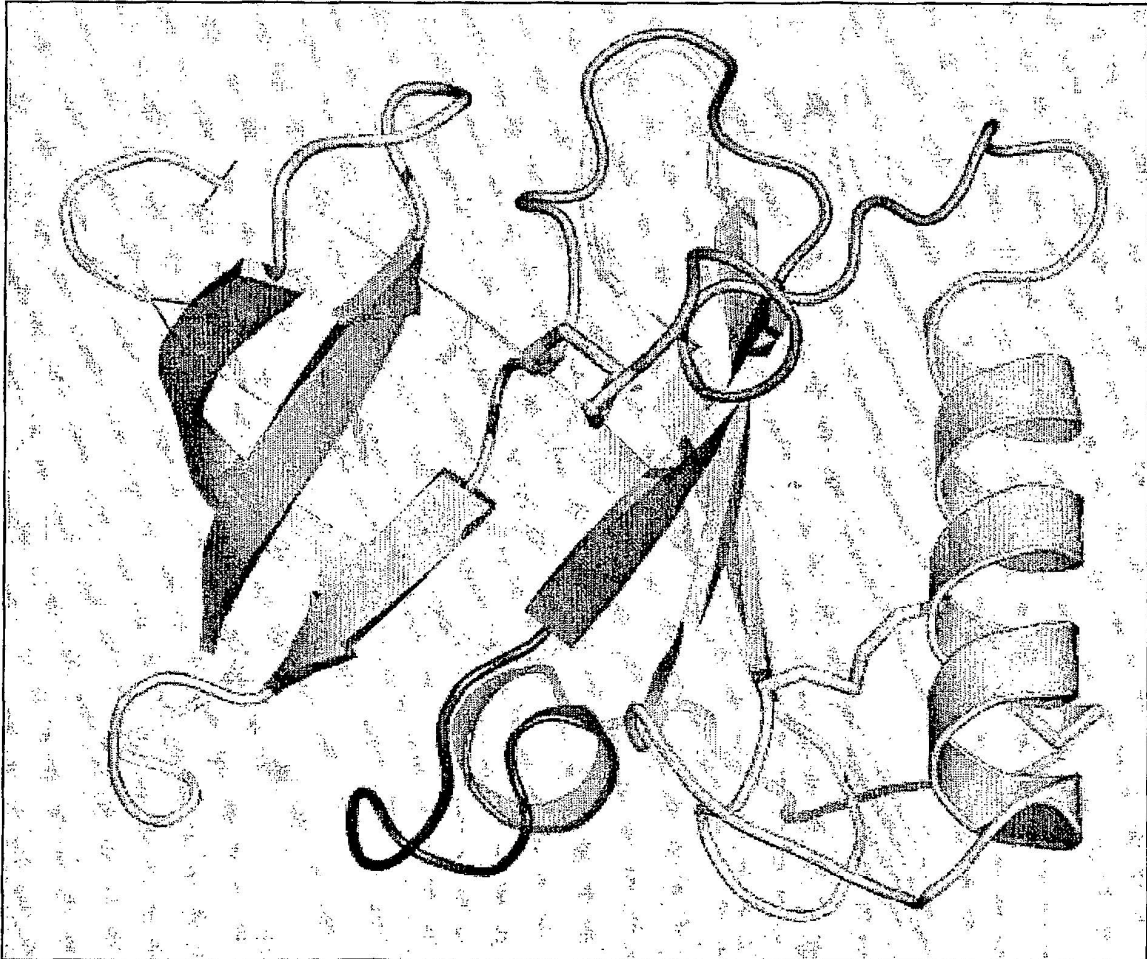


FIG. 5B

Estructura



La EV576 es un miembro lejano de la familia de las lipocalinas. Tiene un 46% de identidad aa con la moubatina, un inhibidor de la agregación de plaquetas de *O. moubata*

Niveles de PenH en ratones EVOL002 después del tratamiento con metacolina

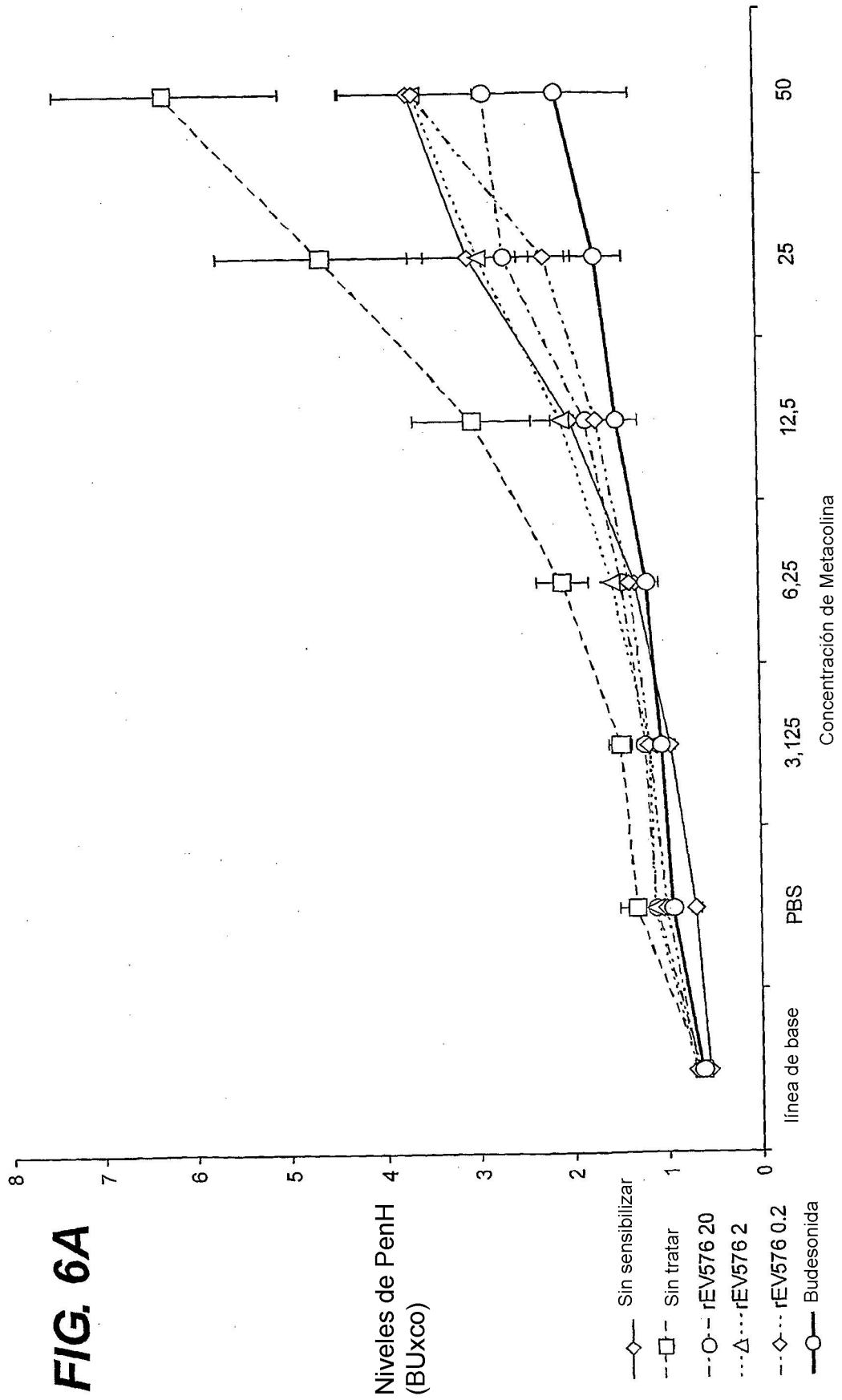


FIG. 6B

Recuentos Celulares Diferenciales de BAL
después de la inducción de PenH

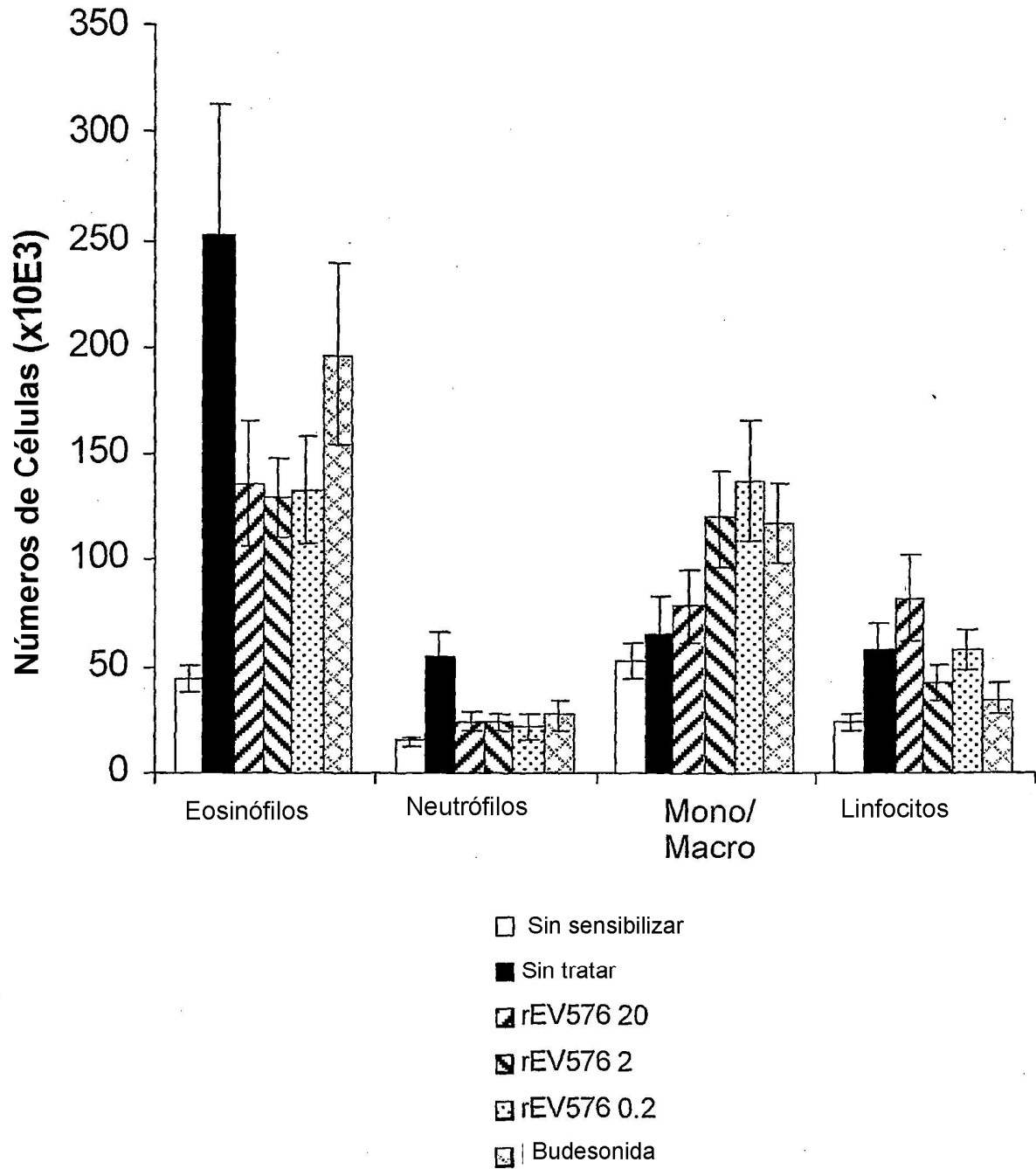


FIG. 7A

reacción del complejo

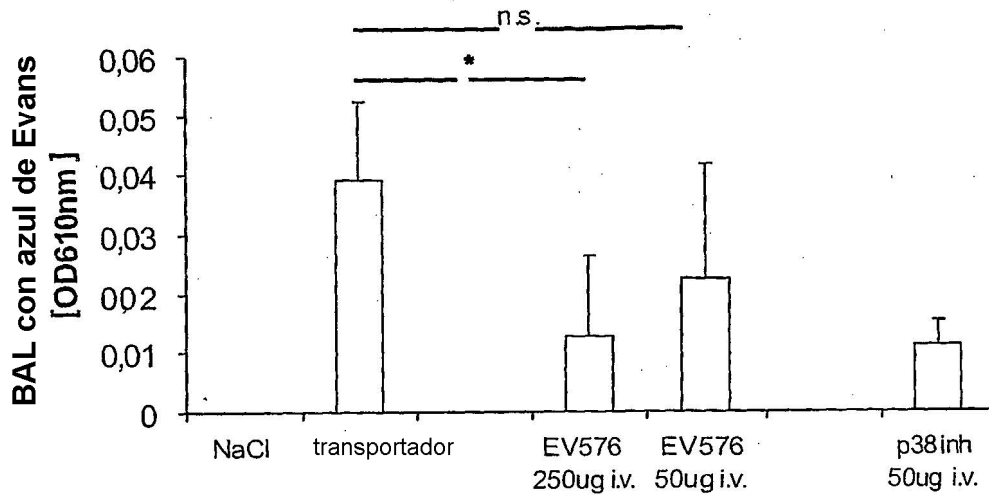


FIG. 7B

reacción

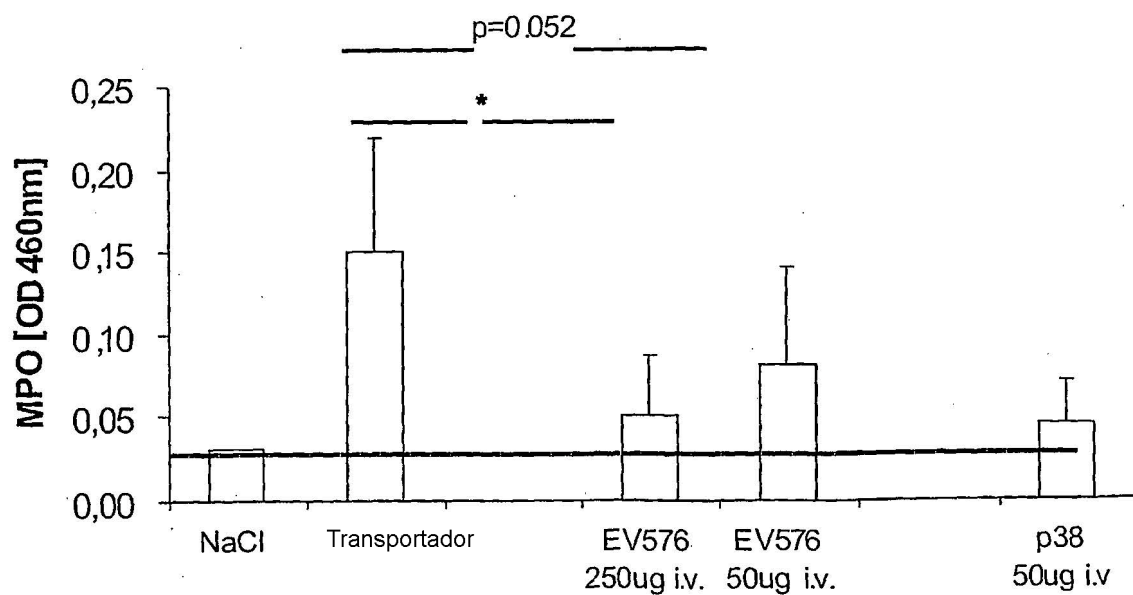
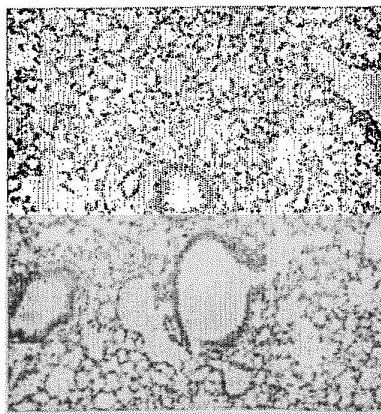
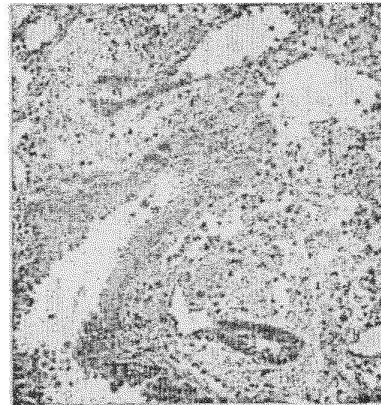


FIG. 7C

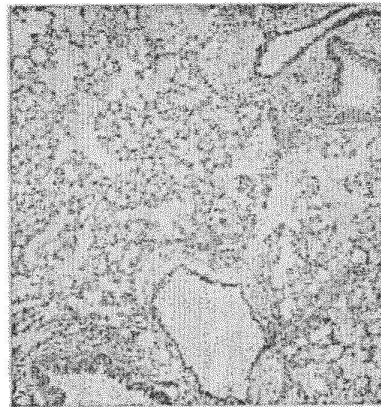
NaCl



Transportador



EV576



p38 Inh.

